

**Maligne Transformation
gingivaler Epithelzellen
durch
*Porphyromonas gingivalis***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Tatjana Hoppe

aus Bad Neuenahr-Ahrweiler

Bonn, 2017

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. Jochen Winter
 2. Gutachter: Prof. Dr. Erwin A. Galinski
- Tag der Promotion: 24.05.2017
Erscheinungsjahr: 2017

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Erkenntnisse einer bakteriell-induzierten chronischen Entzündung (Parodontitis) in Bezug auf eine orale Tumorgenese zu gewinnen. Dazu wurde der Einfluss des parodontopathogenen Bakteriums *Porphyromonas gingivalis* auf eine maligne Transformation gingivaler Epithelzellen untersucht. Zu diesem Zweck wurde als biologisches Untersuchungssystem ein *in vitro*-Zellkulturmodell mit der immortalisierten gingivalen Epithelzelllinie OKF6/hTERT-1 verwendet. Analysen zur Aufklärung des Wirkmechanismus von *P. gingivalis* auf die eingesetzten Epithelzellen ergaben, dass das Bakterium über einen Cadherin-Wechsel von E- zu N-Cadherin und die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges mit daraus resultierender Inhibition von GSK3- β und Stabilisierung von β -Catenin und Snail zu einer Transition von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp führt. Erste Ergebnisse hinsichtlich der Genexpression von Sox2, Nanog und Oct3/4 lassen außerdem die Vermutung zu, dass zusätzlich Zellen mit Stammzeleigenschaften generiert werden.

Weitere relevante Ergebnisse deuten darauf hin, dass *P. gingivalis* charakteristische Tumormerkmale in den OKF6/hTERT-1-Zellen ausbildet. Aufgrund einer verstärkten Synthese und Aktivierung der Matrixmetalloprotease-9 durch das pathogene Bakterium wird die Invasivität der Zellen gefördert. Die aberrante Aktivierung des mTOR-Signalweges, einhergehend mit der Sekretion von TGF- β 1, führt zu einer erhöhten Proliferation der Zellen. Durch ein vermehrtes Vorkommen von VEGF im Extrazellularraum wird die Neovaskularisierung der Endothelzellen in der Tumor-Mikroumgebung gefördert. Ferner verursacht *P. gingivalis* eine Suppression der Inflammation-Aktivierung in THP-1-Makrophagen, was zur Ausbildung eines tolerogenen Milieus führt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit decken zelluläre Veränderungen auf, anhand derer *P. gingivalis* onkogen auf Epithelzellen der Gingiva wirken kann. Insgesamt leisten die vorliegenden Ergebnisse einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Wirkung von *P. gingivalis* auf die Manifestation einer malignen Transformation epithelialer Zellen und liefern darüber hinaus möglicherweise eine Grundlage für die Erschließung effektiver therapeutischer Strategien der chronischen Parodontitis und eines oralen Plattenepithelkarzinoms.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	viii
1 Einleitung	1
1.1 Infektionen als Auslöser für Krebs	1
1.2 Merkmale einer Krebserkrankung	3
1.3 Epithelial-mesenchymale Transition in der Tumorentwicklung	7
1.3.1 An der EMT beteiligte Signalwege	9
1.3.1.1 Die Rolle von β -Catenin in der EMT	9
1.3.1.2 Die Rolle von Akt in der EMT	10
1.3.2 Bakterien als Auslöser einer EMT	13
1.4 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	14
1.4.1 Die Gattung <i>Porphyromonas</i>	14
1.4.2 <i>P. gingivalis</i> als Leitkeim der Parodontitis	14
1.4.3 Pathogenese der Parodontitis	15
1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	16
2 Material	17
2.1 Geräte	17
2.2 Chemikalien und Reagenzien	18
2.3 Verbrauchsmaterialien	21
2.4 Antikörper	21
2.5 Kits	22
2.6 Oligonukleotide	23
2.7 Software	26
2.8 Bakterienstämme und Nährmedien	26
2.9 Zelllinien	26

3	Methoden	27
3.1	Mikrobiologische Methoden	27
3.1.1	Stammhaltung	27
3.1.2	Flüssigkultivierung	27
3.1.3	Photometrische Messung der optischen Dichte	27
3.2	Zellbiologische Methoden	28
3.2.1	Kultivieren und Passagieren eukaryotischer Zellen	28
3.2.2	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität mittels Hämocytometer	29
3.2.3	Nachweis von Mykoplasmen mittels DAPI-Färbung	30
3.2.4	Stimulationsversuche	30
3.2.5	Induktion von Anoikis in immortalisierten Epithelzellen	31
3.2.6	Cytotoxizitätsnachweis durch Messung der LDH-Aktivität	31
3.2.7	Phalloidin-Färbung	32
3.3	Molekularbiologische Methoden	33
3.3.1	DNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen	33
3.3.2	RNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen	33
3.3.3	Oligo(dT)-geprimte cDNA-Synthese	34
3.3.4	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
3.4	Proteinbiochemische Methoden	37
3.4.1	Methanol-Chloroform-Fällung	37
3.4.2	Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen	37
3.4.3	Herstellung nukleärer und cytoplasmatischer Proteinextrakte	37
3.4.4	Quantifizierung des Proteingehalts	38
3.4.5	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
3.4.6	<i>Semidry</i> -Western-Blot	40
3.4.7	Enzymatischer Nachweis von MMPs mittels Zymographie	42
3.4.8	ELISA zur Quantifizierung von TGF- β 1, IL-1 β und VEGF	43
3.5	Funktionale Analysen	44
3.5.1	Protein-Array	44
3.5.2	Migrations-/Matrigel-Invasions-Assay	44
3.6	Statistische Auswertung	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Einfluss von <i>P. gingivalis</i> auf eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) in OKF6/hTERT-1-Zellen	46
4.1.1	Modulation des Phänotyps durch <i>P. gingivalis</i>	46
4.1.2	Veränderung des Cytoskeletts durch <i>P. gingivalis</i>	47
4.1.3	Cadherin- <i>Switch</i> durch <i>P. gingivalis</i>	48

4.1.4	Veränderung des β -Catenin-Gehaltes und dessen Verteilung innerhalb der Zelle durch <i>P. gingivalis</i>	49
4.1.5	<i>P. gingivalis</i> verändert den Snail-Gehalt im Zellkern	51
4.1.6	Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) und folgender Inhibierung von GSK3- β durch <i>P. gingivalis</i>	53
4.1.7	Modulation der Genexpression von Stammzellmarkern durch <i>P. gingivalis</i>	55
4.2	Beteiligung von <i>P. gingivalis</i> bei der Migration und Invasivität der Epithelzellen	56
4.2.1	Regulation von Matrixmetalloproteasen durch <i>P. gingivalis</i>	56
4.2.2	Einfluss von <i>P. gingivalis</i> auf die Invasion und Migration der immortalisierten gingivalen Epithelzellen	58
4.3	Effekt von <i>P. gingivalis</i> auf die Proliferation und Angiogenese	60
4.3.1	Sekretion von TGF- β 1 und VEGF durch <i>P. gingivalis</i>	60
4.3.2	Wirkung von <i>P. gingivalis</i> auf die Proliferation der OKF6/hTERT-1-Zellen	61
4.3.3	Regulation des mTOR-Signalweges durch <i>P. gingivalis</i>	62
4.4	Wirkung von <i>P. gingivalis</i> auf das Apoptoseverhalten der immortalisierten gingivalen Epithelzellen	64
4.4.1	Entwicklung einer Anoikis-Resistenz durch <i>P. gingivalis</i>	65
4.5	Expressionsmuster von S100-Proteinen als Antwort auf <i>P. gingivalis</i>	66
4.6	Einfluss von <i>P. gingivalis</i> auf die Inflammasom-Aktivierung in THP-1-Makrophagen	68
5	Diskussion	71
5.1	<i>P. gingivalis</i> löst eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) in gingivalen Epithelzellen aus	71
5.2	Onkogene Transformation von Epithelzellen durch <i>P. gingivalis</i>	75
5.3	Fazit	84
	Literaturverzeichnis	87
	A Appendix: Ergebnisse II	108
	B Publikationen und Kongressbeiträge	110
	C Danksagung	111
	D Eidesstattliche Erklärung	112
	E Lebenslauf	113

Abbildungsverzeichnis

1.1	Kennzeichen einer Tumorerkrankung	3
1.2	Tumorgenese und metastatische Kaskade	7
1.3	Tumorgenese und Verlauf der EMT	9
1.4	Vereinfachte schematische Darstellung der Rolle von β -Catenin innerhalb der Zelle.	11
1.5	Vereinfachte schematische Darstellung der Rolle von Akt innerhalb der Zelle.	12
4.1	<i>P. gingivalis</i> verändert den Phänotyp der OKF6/hTERT-1-Zellen.	47
4.2	Das Aktin-Cytoskelett wird durch <i>P. gingivalis</i> umstrukturiert.	48
4.3	Cadherin-Switch durch Reduktion von E-Cadherin und Zunahme von N-Cadherin durch <i>P. gingivalis</i>	49
4.4	Der Proteingehalt von β -Catenin wird nach Stimulation mit <i>P. gingivalis</i> erhöht.	50
4.5	<i>P. gingivalis</i> verändert die Lokalisation von β -Catenin innerhalb der Zelle.	51
4.6	Die Genexpression des Transkriptionsfaktors Snail sowie dessen Vorkommen im Zellkern wird als Antwort auf <i>P. gingivalis</i> erhöht	52
4.7	<i>P. gingivalis</i> phosphoryliert bzw. aktiviert Akt und phosphoryliert bzw. inhibiert GSK3- β	54
4.8	<i>P. gingivalis</i> erhöht die Genexpression von Stammzellmarkern.	55
4.9	Die Synthese und Aktivierung von MMP-9 wird durch <i>P. gingivalis</i> über den PI3K/ Akt-Signalweg reguliert.	57
4.10	Die Migrationsfähigkeit der OKF6/hTERT-1-Zellen steigt nach Stimulation mit <i>P. gingivalis</i>	58
4.11	Die Invasionsfähigkeit der OKF6/hTERT-1-Zellen steigt nach Stimulation mit <i>P. gingivalis</i>	59
4.12	<i>P. gingivalis</i> bewirkt eine vermehrte Sekretion der Wachstumsfaktoren TGF- β 1 und VEGF.	61
4.13	Das Proliferationsverhalten der Zellen wird durch <i>P. gingivalis</i> verändert.	62
4.14	<i>P. gingivalis</i> aktiviert den mTOR-Signalweg.	63
4.15	Regulation von Apoptose-beteiligten Proteinen durch <i>P. gingivalis</i>	64

4.16	<i>P. gingivalis</i> -stimulierte OKF6/hTERT-1-Zellen erwerben eine Anoikis-Resistenz.	65
4.17	Eine Stimulation mit S100A7 führt zu einer Verminderung von β -Catenin im Cytosol und Zellkern.	68
4.18	Es gibt keinen Einfluss von <i>P. gingivalis</i> auf eine Inflammasom-Aktivierung.	70
5.1	<i>P. gingivalis</i> löst eine EMT in OKF6/hTERT-1-Zellen aus.	76
5.2	<i>P. gingivalis</i> hemmt die Aktivierung eines Inflammasoms in differenzierten THP-1-Zellen	84
5.3	<i>P. gingivalis</i> bildet Tumor-charakteristische Merkmale in OKF6/hTERT-1-Zellen aus	85
A.1	Exemplarischer Protein-Array intrazellulärer Signalmoleküle in OKF6/hTERT-1-Zellen.	109

Tabellenverzeichnis

3.1	Finale Supplement-Konzentrationen im KGM2.	28
3.2	Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese	34
3.3	PCR-Programm	35
3.4	Reaktionsansatz für eine RT-PCR	35
3.5	PCR-Programm zum Mykoplasmen-Nachweis	37
3.6	Zusammensetzung der 10 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gele	40
4.1	ΔC_t -Werte und relativer Faktor der S100-Proteine in OKF6/hTERT-1-Zellen nach Stimulation mit <i>P. gingivalis</i> für 6 h und 24 h bezogen auf GAPDH und β -Aktin	67

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATCC	<i>American type culture collection</i>
Bad	<i>Bcl-2-antagonist-of-cell-death</i>
BCA	<i>bicinchonic acid</i> (Bicinchoninsäure)
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
BHI	<i>brain heart infusion</i> (Hirn-Herz-Bouillon)
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CSC	<i>cancer stem cell</i> (Tumorstammzelle)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMS	Deutsche Mundgesundheitsstudie
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
E-Cadherin	epitheliales Cadherin
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EGF	<i>epithelial growth factor</i> (epithelialer Wachstumsfaktor)
EGFR	<i>epithelial growth factor receptor</i> (epithelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor)
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest)
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
et al.	<i>et alii/ et alia</i> (und andere)
FKS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GITC	Guanidiniumisothiocyanat
GSK3- β	Glykogen-Synthase-Kinase 3- β
H ₂ O _{reinst}	Reinstwasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
hTERT	humane Telomerase Reverse Transkriptase
IARC	<i>international agency for research on cancer</i> (Internationale Agentur für Krebsforschung)
IL	Interleukin
KGM	<i>keratinocyte growth medium</i> (Keratinozyten-Wachstumsmedium)
LDH	Laktatdehydrogenase
LEF	<i>lymphocyte enhancer factor</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
MMP	Matrixmetalloprotease
MOI	<i>multiplicity of infection</i> (Multiplizität der Infektion)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N-Cadherin	neuronales Cadherin

Oct3/4	<i>octamer-binding transcription factor 3/4</i>
OD	optische Dichte
OSCC	<i>oral squamous cell carcinoma</i> (orales Plattenepithelkarzinom)
p70 S6 K	p70 ribosomale Protein S6 Kinase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
pH	<i>pondus hydrogenii</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly-HEMA	Polyhydroxyethylmethacrylat
PP	Polypropylen
PRAS40	<i>proline-rich Akt substrate of 40 kDa</i>
PVDF	Polyvinylenddifluorid
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Reverse Transkriptase
S.E.M.	<i>standard error of means</i> (mittlerer Fehler des Mittelwertes)
S6	S6 ribosomales Protein
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
Sox2	<i>SRY-related-HMG-box-2</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salz-Lösung)
TCF	<i>T-cell factor</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β 1	<i>transforming growth factor-β1</i>

Abkürzungsverzeichnis

UV	Ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
WHO	<i>world health organisation</i> (Weltgesundheitsorganisation)
ZEB	<i>zinc finger e-box binding</i>

1 Einleitung

Krebserkrankungen bilden nach Herz-Kreislaufkrankungen die häufigste Todesursache in westlichen Industrieländern. 15-20 % aller Krebsfälle werden mit chronischen Infektionen in Verbindung gebracht [1]. Persistierende Infektionen führen zu chronisch-entzündlichen Prozessen im Wirtsorganismus. Als Modellerkrankung einer über Jahre etablierten chronischen Inflammation gilt die Parodontitis, eine Entzündung des Zahnhalteapparates, in der Mundhöhle [2, 3]. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zelluläre und molekulare Mechanismen zu analysieren, die einen kausalen Zusammenhang ausgehend von einer bakteriellen Infektion über die Inflammation hin zur Tumorinitiation, also Krebsentstehung, bilden.

1.1 Infektionen als Auslöser für Krebs

Chronische Infektionen und inflammatorische Bedingungen gelten heutzutage als wichtige Faktoren bei der Tumorinitiation und scheinen ein Milieu zu etablieren, das die Entstehung von Krebs (Tumorigenese) fördert oder antreibt. Bereits 1863 hat der Pathologe Rudolf Virchow erkennen können, dass in neoplastischem Gewebe Leukozyten vorhanden waren, so dass er die erste Verbindung zwischen einer Entzündung und Krebs herstellen konnte [4]. Die Internationale Agentur für Krebsforschung (IARC = *international agency for research on cancer*) hat die Aufgabe der Erforschung von Krebserkrankungen und veröffentlicht Monografien, in denen Chemikalien, biologische, physikalische und kulturbedingte Einflüsse, die beim Menschen Krebs auslösen können (Typ-1-Kanzerogene), angegeben werden. Elf Mikroorganismen wurden als Typ-1-Kanzerogene klassifiziert, d. h. dass eine direkte Assoziation zwischen dem Virus, Parasit oder Bakterium und dem Tumor besteht. Zu diesen gehören das Epstein-Barr-Virus (EBV), Hepatitis B- und C-Virus (HBV, HCV), Kaposi-Sarkom Herpes-Virus (KSHV oder HHV-8), humane Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1), humane Papillomavirus Typ 16 (HPV-16), humane T-Zell lymphotropes Virus Typ 1 (HTLV-1), *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini* und *Schistosoma haematobium* [5]. Das einzige Bakterium, welches nach der IARC als krebserregend eingestuft wurde, ist *Helicobacter pylori*. Eine Infektion mit diesem Mikroorganismus verursacht Magenkarzinome. Neben den offiziell bezeichneten

Viren, Parasiten und Bakterien gibt es weitere Mikroorganismen, die in Bezug auf die Entstehung von Krebs genannt wurden. So konnte im Jahr 2012 ein Zusammenhang zwischen dem oralen Bakterium *Fusobacterium nucleatum* und Darmkrebs gefunden werden [6, 7]. Weiterhin wird vermutet, dass eine chronische Infektion mit *Salmonella typhi* die Entwicklung von Gallenblasenkrebs fördert [8, 9]. In der Ätiologie von Lungenkrebs wird *Chlamydia pneumoniae* genannt [10–12] und bei Dickdarmkrebs spielt eine durch *Streptococcus bovis* ausgelöste Bakteriämie und Endokarditis eine Rolle [13–15].

Hinsichtlich der Entstehung einer oralen Krebserkrankung können 15 % der oralen Tumoren nicht durch die klassischen Risikofaktoren des Tabak- und Alkoholabusus, der genetischen Prädisposition und verschiedener Chemikalien oder UV-Licht erklärt werden [16]. In vorhergegangenen epidemiologischen Studien ist jedoch eine Assoziation zwischen einer chronischen oralen Inflammation (Parodontitis) und einem oralen Plattenepithelkarzinom hergestellt worden [17, 18]. Die Parodontitis stellt eine Entzündung mit daraus resultierender Destruktion des Zahnhalteapparats (Parodontium) dar [2, 3]. Klinisch hebt sich die Parodontitis von der Gingivitis durch Taschenbildung, progressiven Knochenabbau und Attachmentverlust ab. In 95 % der Fälle tritt die chronische Verlaufsform auf, die unter anderem *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) als Schlüsselkeim aufweist. Nach der deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS V) von 2016 sind 52 % der 35- bis 44-Jährigen von einer parodontalen Erkrankung betroffen. Im Alter von 65 bis 74 weisen 65 % der Menschen eine Parodontitis auf. Patienten könnten mitunter Jahrzehnte an einer Parodontitis erkrankt sein. Es konnte bereits ein erhöhtes Risiko für Kopf- und Halstumoren bei Vorhandensein einer Parodontitis nachgewiesen werden. Das Risiko einer Krebserkrankung im Kopf- und Halsbereich unter Personen, die an einer parodontalen Erkrankung leiden, ist 4,36-fach erhöht im Vergleich zu gesunden Personen [19]. Nagy *et al.* [20] haben die mikrobielle Zusammensetzung von Biofilmen auf oralen Plattenepithelkarzinomen untersucht und herausgefunden, dass im Vergleich zu gesunder Mukosa unter anderem eine erhöhte Bakterienlast mit *P. gingivalis* vorlag [20]. Immunhistochemische Untersuchungen an Gewebeschnitten von einem oralen Tumor und gesunder Gingiva wurden hinsichtlich des Vorhandenseins von *P. gingivalis* durchgeführt. In den Tumorschnitten konnte eine um 33 % stärkere Färbung von *P. gingivalis* im Vergleich zu gesunder Mundschleimhaut beobachtet werden [21].

In Bezug auf die Ursache einer bakteriell-ausgelösten Kanzerogenese wurden bereits verschiedene Modelle, den Ablauf betreffend, aufgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass manche Pathogene Toxine bildeten, die das Wachstum der Zelle beeinflusst haben [10, 11] oder die Zellproliferation gefördert wurde, indem der MAPK-Signalweg (MAPK = Mitogen-aktivierte Proteinkinase) aktiviert wurde. Weiterhin konnte bei einigen Pathogenen eine intrazelluläre Akkumulation beobachtet werden, die zu einer Suppression des

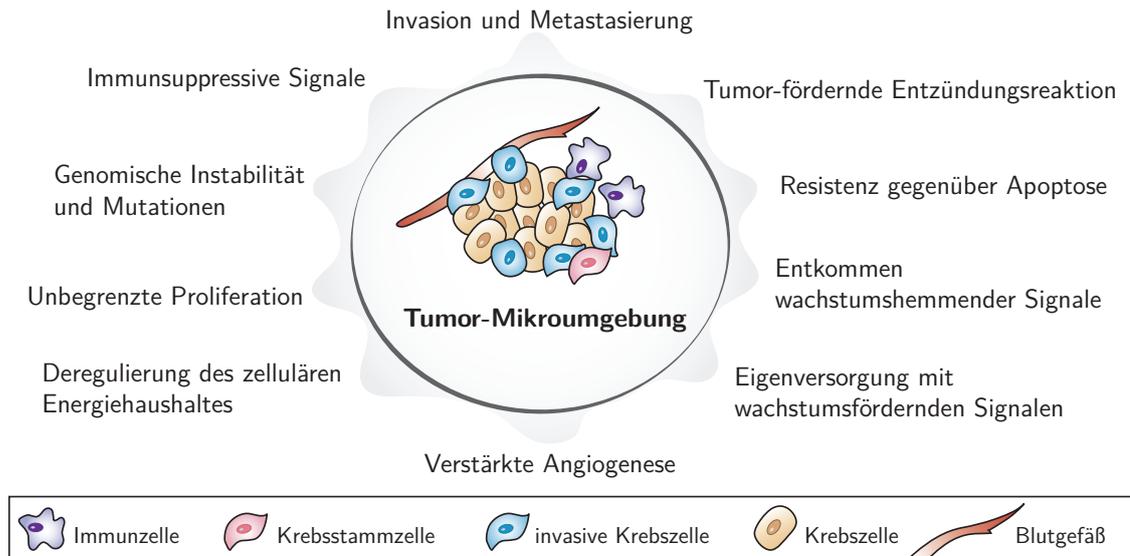


Abbildung 1.1 – Kennzeichen einer Tumorerkrankung (modifiziert nach Hanahan et al. [25]).

programmierten Zelltodes führt. Ein weiterer beschriebener möglicher Mechanismus ist die Oxidation von Ethanol zu dem karzinogenen Acetaldehyd, woraufhin DNA-Schäden entstehen können [22].

1.2 Merkmale einer Krebserkrankung

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO = *world health organisation*) definiert Krebs als bösartige Neubildung in Form eines Überschusswachstums körpereigener Zellen. Erfolgt ein Übergang von gesunden, in ihrem Wachstum kontrollierten Zellen, zu unkontrolliert wachsenden Tumorzellen (maligne Transformation) und häufen sich weiterhin Mutationen, dann kann eine Entwicklung zu einem Tumor stattfinden (Tumorigenese). Die Einteilung von Krebserkrankungen erfolgt nach der Gewebeart, aus der sich diese entwickelten: Karzinome stammen von epithelalem Gewebe ab, Sarkome haben einen mesenchymalen Ursprung, Blastome entstehen aus embryonalem Gewebe, Lymphome basieren auf lymphoretikulärem Gewebe und Leukämien gehen aus bestimmten Vorläuferzellen des Blutes hervor [23].

Trotz der großen Diversität der Krebserkrankungen teilen sie spezifische Charakteristika, die von Hanahan und Weinberg als *Hallmarks of Cancer* bezeichnet werden [24, 25]. Die typischen Merkmale einer Tumorzelle umfassen zehn Kennzeichen, die in Abbildung 1.1 dargestellt sind. Über die Fähigkeiten der Tumorzellen hinaus, spielt auch das Umfeld des Tumors, die Tumor-Mikroumgebung, eine Rolle in der Tumorigenese, da ein Tumor nicht

nur aus Krebszellen besteht, sondern bezüglich der Komplexität vergleichbar zu gesundem Gewebe ist. Verschiedene Zelltypen charakterisieren somit neben den Tumorzellen das Tumorgewebe: endotheliale Zellen, Immunzellen, invasive Krebszellen, Krebsstammzellen, Tumor-assoziierte Fibroblasten und Perizyten [25].

Das grundlegendste Merkmal von Tumorzellen ist die **uneingeschränkte Proliferation**. Gesunde Zellen regulieren die Produktion und Sekretion von Wachstumssignalen (Homöostase), wohingegen bei Krebszellen eine Deregulation vorherrscht. Die Umsetzung des unbegrenzten Wachstums kann durch die Produktion von Wachstumsfaktoren durch die Tumorzelle selber erfolgen (autokrine Stimulation) oder durch die Sekretion von Signalen an das assoziierte Tumorstroma, so dass andere Zellen unterstützende Wachstumsfaktoren bilden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Rezeptoren überexprimiert werden, so dass die Tumorzelle hyperresponsiv gegenüber Wachstumsfaktoren wird. Aber auch unabhängig von Wachstumsfaktoren können Signalmoleküle konstitutiv aktiviert vorliegen, so dass die Proliferation der Zelle gefördert wird [24].

Ein der Zellvermehrung entgegenwirkender Prozess ist der programmierte Zelltod (Apoptose). Damit Tumorgewebe entstehen kann, müssen Tumorzellen neben der Etablierung eines Wachstum-stimulierenden Signals **dem programmierten Zelltod entkommen**. Hierbei spielen Proteine der Bcl-2-Familie (Bcl-2 = *B-cell lymphoma-2*) eine große Rolle, die aus positiven und negativen Regulatoren des Zelltodes besteht [26]. Bcl-2 ist ein anti-apoptotisches Protein und entfaltet seine Wirkung, indem es an pro-apoptotische Proteine bindet und diese somit inaktiviert. In Krebszellen sind anti-apoptotische Proteine überexprimiert, wohingegen pro-apoptotische Regulatoren inaktiviert vorliegen. Das pro-apoptotische Protein Bad (*Bcl-2-antagonist-of-cell-death*) heterodimerisiert im unphosphorylierten Zustand mit Bcl-2, so dass die Apoptose eingeleitet wird [27]. Wird Bad jedoch posttranslational phosphoryliert, verliert es die Bindung an Bcl-2 und verhindert dadurch die Apoptose. Für die Proteinkinase B (Akt) konnte gezeigt werden, dass sie ein Mediator des Wachstumsfaktor-abhängigen Überlebens der Zelle ist, indem sie Bad an Serin-136 *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert [28].

In gesunden Zellen wird der programmierte Zelltod auch eingeleitet wenn z. B. Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte gelöst werden, damit differenzierte Zellen im Gewebe korrekt lokalisiert sind. Dieser Prozess wird als Anoikis (*griechisch*: Heimatlosigkeit) bezeichnet [29, 30]. Im Hinblick auf eine onkogene Transformation spielt die Anoikis eine große Rolle, da maligne Tumorzellen ihre Zellverankerungen verlieren, damit sie die Fähigkeit zur Metastasierung erlangen. Um dem Zelltod der Anoikis zu entgehen entwickeln sie eine Anoikis-Resistenz.

Ein Tumor zeichnet sich auch durch die Etablierung einer **Tumor-fördernden Entzündungsreaktion** aus. Neben der Beteiligung an Zellzyklus- oder Apoptose-regulierenden Mechanismen, kann die Tumor-Mikroumgebung einen Beitrag zur Tumorbildung und -progression leisten, indem vermehrt Chemokine oder Cytokine gebildet werden, die den Tumor, autokrin- und parakrin-wirkend, beeinflussen. In diesem Zusammenhang spielen Inflammasome als multimolekulare Komplexe, die eine Inflammation und einen damit einhergehenden Zelltod fördern, eine große Rolle. Über die Aktivierung der Cysteinprotease Caspase-1 werden die Proformen der Interleukine IL-1 β und IL-18 proteolytisch gespalten, und aufgrund des Caspase-1-induzierten Zelltodes (Pyroptose) sezerniert [31]. Im Gegensatz zur Apoptose bilden sich 1-2 nm große Poren in der Plasmamembran der pyroptotischen Zellen, so dass eine osmotische Lyse eintritt und inflammatorische Moleküle wie IL-1 β und IL-18 in den Extrazellularraum gelangen [32, 33]. Makrophagen leiten z. B. nach einer bakteriellen Infektion eine Aktivierung von Caspase-1 ein, so dass IL-1 β und IL-18 prozessiert und aus der Zelle sekretiert werden. Die Pyroptose führt zu dem Zelltod infizierter Makrophagen und vermindert die Bakterienlast [34]. In Bezug auf die Kanzerogenese gibt es widersprüchliche Aussagen bezüglich der Inflammasom-Aktivierung und den entsprechenden Folgen. In Prostatakrebs ist Caspase-1 vermindert exprimiert [35]. In Epithelzellen des Kolons von Mausmodellen mit Caspase-1- und NLRC4 (*NLR family CARD domain-containing protein 4*)-Defizienz wurden Apoptose-Resistenz und erhöhte Proliferationsraten beobachtet [36]. Aus diesem Grund wird postuliert, dass eine Reduktion der Inflammasom- und somit der Caspase-1-Aktivität die Zellen vor dem Zelltod bzw. der Pyroptose schützt. Viele Tumoren hingegen produzieren konstitutiv IL-1 β [37, 38], so dass eine verminderte Inflammasom-Aktivierung kein generelles Prinzip eines Tumors und seiner Mikroumgebung darstellt. Verschiedene Studien belegen die Wirkung von IL-1 β auf die Entstehung und Progression eines Tumors. So förderte z. B. eine Expression von IL-1 β in Mäusen eine entzündliche Reaktion des Darmes und die Tumorgenese [39]. Als Antwort auf inflammatorische Stimuli wie IL-1 β werden außerdem humane Defensine gebildet [40], welche wiederum als epitheliale Wachstumsfaktor-Rezeptor-Liganden (EGFR-Liganden) fungieren und somit die Zell-Proliferation fördern [41].

Ein etablierter Tumor benötigt außerdem eine ausreichende Blutversorgung, um weiterhin zu wachsen und zu metastasieren. Um eine Unterversorgung der Krebszellen mit Nährstoffen und Sauerstoff zu verhindern, muss der Tumor einen **angiogenen Switch** einleiten. Auslöser hierfür ist z. B. metabolischer Stress in Form eines niedrigen Sauerstoffpartialdrucks (Hypoxie) oder mechanischer Stress durch proliferierende Zellen, Immunreaktionen oder eine Aktivierung von Onkogenen bzw. Repression von Tumorsuppressorgenen [42]. Die tumorinduzierte Neovaskularisierung wird durch Wachstumsfaktoren ausgelöst, zu denen unter anderem VEGF (*vascular endothelial growth factor* = vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) zählt [43]. Als Folge der Sekretion von VEGF kommt es zu

einer erhöhten Permeabilität der Blutgefäße. Ferner können proteolytische Enzyme wie Matrixmetalloproteasen die Basalmembran und extrazelluläre Matrix (EZM) degradieren, so dass Endothelzellen die Migration in Richtung des angiogenen Signals ermöglicht wird [44]. Die Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren besteht aus VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und dem plazentalen Wachstumsfaktor. Der Hauptvertreter ist VEGF-A und bindet an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (VEGFR-1, -2, -3), die hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, auf Endothelzellen exprimiert werden [45].

Ein weiteres Merkmal vieler Krebserkrankungen ist eine **Fehlregulierung von S100-Proteinen** und damit einhergehend Veränderungen der Zell-Proliferation, der Metastasierung, Angiogenese und der Immunantwort. S100-Proteine sind Kalzium-bindende Proteine, die entweder Homo- oder Heterodimere ausbilden. Nach Kalziumbindung erfährt das Protein eine Konformationsänderung, die eine Interaktion mit verschiedenen Proteinen erlaubt, so dass S100-Proteinen eine Rolle bei der Signaltransduktion zukommt [46]. Zu den intrazellulären Funktionen der S100-Proteine gehören Regulationen von Protein-Phosphorylierungen, Enzym-Aktivitäten, Komponenten des Aktin-Cytoskeletts sowie Zell-Proliferation und -Differenzierung. Innerhalb des Zellkerns können z. B. einige Vertreter der S100-Proteine mit dem Tumorsuppressor p53 interagieren, indem dieser entweder inhibiert (S100A4, S100B) oder aktiviert (S100A2) wird. Extrazellulär spielen S100-Proteine eine Rolle bei der Chemoattraktion von Leukozyten und Makrophagen [47]. Tumoren besitzen in der Regel ein charakteristisches Expressionsprofil der S100-Proteine. Solche Signaturen konnten bereits für Brust [48], Kopf- und Hals- [49] und Prostata-Krebserkrankungen [50] sowie für Melanome beschrieben werden [51].

Eine wichtige Eigenschaft von Krebszellen ist zudem die **Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung**, die durch eine Reduktion von E-Cadherin (epitheliales Cadherin) und eine Zunahme von N-Cadherin (neurales Cadherin) charakterisiert ist, so dass sich der Phänotyp hin zu einem mesenchymalen entwickelt und physiologische Barrieren überwunden werden können. Diesen Prozess bezeichnet man auch als epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Über Blutgefäße können die malignen Zellen an andere Orte des Körpers transportiert werden, was auch als metastatische Kaskade bezeichnet wird. Aufgrund der Fähigkeit eines Tumors die Bildung von Blutgefäßen zu induzieren, können Tumorzellen in das Blutsystem eintreten (Intravasation) und anschließend aus diesem austreten (Extravasation). Dort können Metastasen gebildet werden, indem sich die Morphologie der Zellen von einem mesenchymalen in einen epithelialen verändert [53], was auch als mesenchymal-epitheliale Transition (MET) bezeichnet wird (Abbildung 1.2). Unterhalb der Epithelzellen befindet sich die Basalmembran, die eine physikalische Barriere darstellt und hauptsächlich aus Kollagen Typ IV besteht [54]. Um eine metastatische Kaskade einzuleiten, ist der Abbau der Basalmembran unerlässlich, so dass von den Tumorzellen

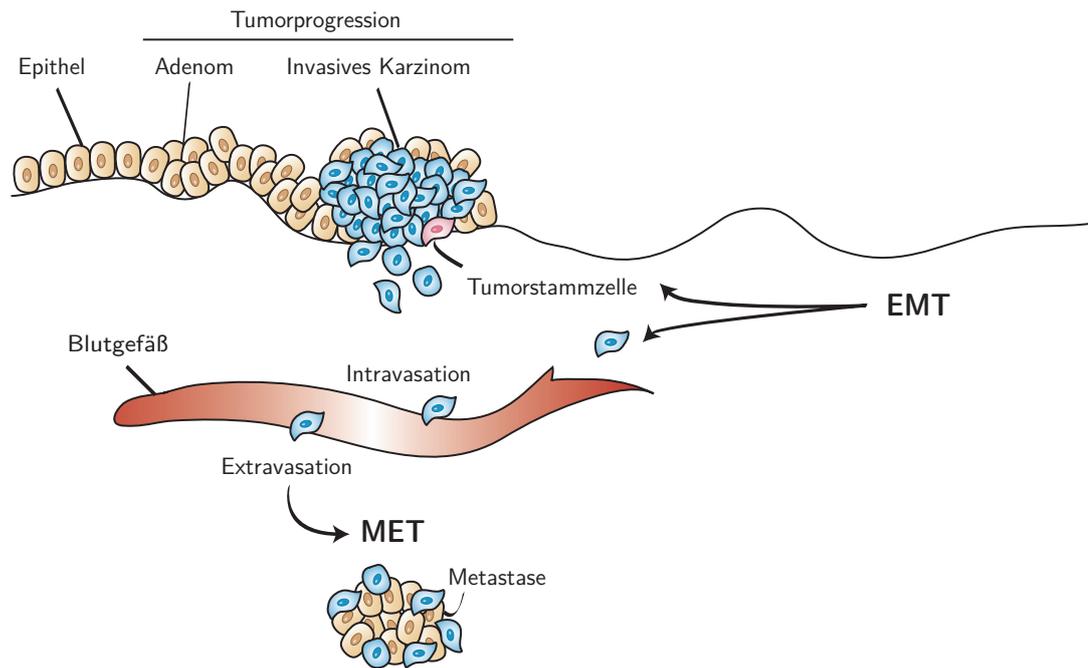


Abbildung 1.2 – Tumorgenese und metastatische Kaskade (modifiziert nach de Craene *et al.* [52]).

oder Zellen des Tumorstromas Proteasen gebildet werden. Hierbei spielen vor allem die Matrixmetalloproteasen-2 und -9 (MMP-2 und MMP-9) eine große Rolle, da sie eine Kollagenbindedomäne besitzen [55] und somit in der Lage sind Kollagen zu degradieren [56]. Für beide Matrixmetalloproteasen konnte ein Zusammenhang mit der Invasivität eines Tumors beschrieben werden [57].

1.3 Epithelial-mesenchymale Transition in der Tumorentwicklung

90% aller Krebserkrankungen gehen aus Epithelien hervor. Epithelzellen weisen unter physiologischen Bedingungen eine apikal-basale Polarität auf und gehen eine Verbindung mit der Basalmembran ein. Mit benachbarten Zellen und der Basalmembran sind sie über *Tight Junctions*, *Adherens Junctions*, Desmosomen und Hemi-Desmosomen verbunden [58]. Im Laufe einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) lösen sich Epithelzellen aus dem Zellverband und nehmen einen mesenchymalen Phänotyp an (Abbildung 1.3), was mit einer Reduktion von E-Cadherin, einem Protein, das für Zell-Zell-Kontakte

verantwortlich ist, einer Translokation von β -Catenin in den Nukleus und einer Erhöhung mesenchymaler Marker, z. B. N-Cadherin, einhergeht. Aufgrund dieser Veränderungen lösen sich die Zell-Zell-Kontakte. Außerdem wird das Aktin-Cytoskelett umstrukturiert [59].

Die Reduktion von E-Cadherin wird als essentieller Bestandteil einer EMT diskutiert. E-Cadherin ist ein Transmembran-Glykoprotein mit einer extrazellulären Domäne, die Calcium-abhängig eine Interaktion mit einem Cadherin-Molekül einer benachbarten Zelle eingeht [60]. Cytoplasmatisch interagiert E-Cadherin mit Proteinen der Catenin-Familie, die E-Cadherin mit dem Aktin-Cytoskelett verbinden. Cadherine spielen somit nicht nur eine Rolle bei der Zellverankerung, sondern sind auch in Signalkaskaden eingebunden. *In vitro* konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Verminderung von E-Cadherin und der Bildung des mesenchymalen Phänotyps hergestellt werden [61]. Die Abnahme von E-Cadherin kann verschiedene Auslöser haben: Eine Repression der Transkription des Adhäsionsproteins durch die Transkriptionsfaktoren Snail [62, 63], Slug [64], ZEB1 (*zinc finger e-box binding homeobox 1*) [65, 66], ZEB2 [67] und Twist [68], eine Promotorhypermethylierung [69] oder eine Mutation im E-Cadherin-Gen [70, 71]. Posttranslational wird E-Cadherin dezimiert, indem es durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen phosphoryliert und anschließend proteasomal abgebaut wird [72]. Sezernierte Matrixmetalloproteasen (z. B. MMP-3) sind in der Lage E-Cadherin extrazellulär zu spalten, was zu einer EMT führt [73]. Die Spaltung von E-Cadherin durch ADAM-10 (*a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein-10*) veranlasst die Translokation von β -Catenin in den Zellkern [74]. γ -Sekretase/Presenilin-1 löst die Zell-Zell-Kontakte, indem E-Cadherin intrazellulär modifiziert wird [75]. Die Reduzierung von E-Cadherin im Laufe einer epithelial-mesenchymalen Transition geht meistens mit einer Zunahme von N-Cadherin einher, so dass man von einem Cadherin-*Switch* spricht.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Zellen während einer epithelial-mesenchymalen Transition Stammzell-Charakteristika erwerben können (Abbildung 1.2) [76–79]. In Epithelzellen der Brust löste die Induktion einer EMT die Bildung einer Subpopulation von Zellen aus, die den Phänotyp von Tumorstammzellen (CSC = *cancer stem cells*) aufwiesen [77]. Die „Tumorstammzell“-Hypothese besagt, dass viele Tumoren eine Hierarchie aufweisen, indem Stammzellen vorhanden sind, die die Tumorinitiation steuern. Erste Hinweise auf Tumorstammzellen lagen bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) vor [80]. Die Charakteristika von Tumorstammzellen sind Selbsterneuerung, Pluripotenz, unbegrenzte Fähigkeit zur Proliferation, Entkommen der Apoptose, Migration, Invasion und Dormanz. Zur Identifikation von Tumorstammzellen können verschiedene membrangebundene oder cytoplasmatische Marker verwendet werden, von denen in dieser Arbeit Oct3/4 (*octamer-binding transcription factor 3/4*), Nanog und Sox2 (*SRY-*

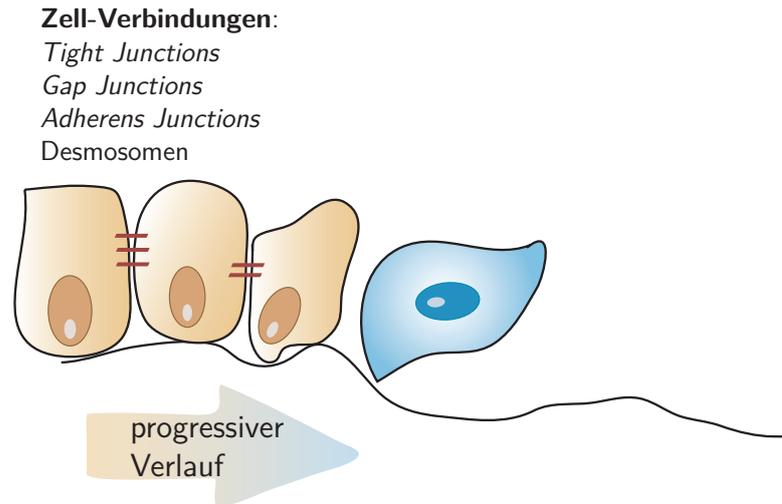


Abbildung 1.3 – Tumorgenese und Verlauf der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT). Es kommt zu einer progredierenden Verminderung von Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakten sowie zu einer Veränderung der Zellmorphologie.

related-HMG-box-2) untersucht wurden. Verschiedene Studien haben bereits die Rolle der Stammzell-Transkriptionsfaktoren Nanog, Oct3/4 und Sox2 in der Tumorphänotyp untersucht. Eine Überexpression von Sox2 korrelierte mit einem Tumorphänotyp [81, 82] und in Karzinomen verschiedener Organe (z. B. Gehirn, Brust, Kolon, Magen, Leber, Lunge, orale Mundhöhle) konnte eine verstärkte Expression von Nanog nachgewiesen werden [83]. Zudem fanden Gidekel *et al.* [84] heraus, dass eine Inaktivierung von Oct3/4 in Keimzelltumoren zu einer Regression des Tumors führte.

1.3.1 An der EMT beteiligte Signalwege

Eine epithelial-mesenchymale Transition kann durch unterschiedliche extrazelluläre Faktoren ausgelöst werden, die verschiedene intrazelluläre Signalwege aktivieren, zu denen unter anderem die Smad-, Ras-, MAPK-, Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Akt-, Wnt/ β -Catenin-, Notch- und EGF-Signalkaskaden gehören [85].

1.3.1.1 Die Rolle von β -Catenin in der EMT

β -Catenin kommt in der Zelle, abhängig von der Lokalisation, eine duale Aufgabe zu:

1. Die Regulation der Zell-Zell-Kontakte erfolgt durch E-Cadherin, dessen cytoplasmatische Domäne intrazellulär mit β -Catenin interagiert [86], so dass E-Cadherin mit dem Aktin-Cytoskelett verankert ist [87–89]. Aufgrund des Verlustes der Zell-Zell-Kontakte im Laufe

einer epithelial-mesenchymalen Transition oder einer Phosphorylierung von β -Catenin durch Tyrosinkinase erfolgt eine Dissoziation von E-Cadherin, so dass β -Catenin frei im Cytoplasma vorliegt [90].

2. Im kanonischen Wnt-Signalweg ist cytoplasmatisches β -Catenin ein entscheidender Faktor, indem es in den Zellkern transloziert wird und dort an Proteine der DNA-bindenden TCF (*T-cell factor*)/ LEF (*lymphocyte enhancer factor*)-Familie bindet und die Transkriptionsaktivität steigert. Wnt ist ein Glykoprotein, welches mit dem Transmembranrezeptor *Frizzled* interagiert, woraufhin eine Dimerisierung mit dem Korezeptor LRP (*low-density lipoprotein receptor related protein*) erfolgt. In Abwesenheit von Wnt interagiert cytoplasmatisches β -Catenin mit Axin/Conductin, APC (*adenomatous polyposis coli*) und Glykogen-Synthase-Kinase 3- β (GSK3- β). Die Folge ist eine N-terminale Phosphorylierung von β -Catenin durch GSK3- β , so dass β -Catenin ubiquitiniert und proteasomal abgebaut wird [91]. Im aktiven Wnt-Signalweg liegt GSK3- β inhibiert vor, so dass keine Phosphorylierung von β -Catenin erfolgt [92]. Stattdessen findet eine Akkumulation und Translokation von β -Catenin in den Zellkern statt.

Die Regulation von β -Catenin kann nicht nur durch Wnt erfolgen, sondern auch durch eine Aktivierung der Proteinkinase Akt [93]. Akt katalysiert die Phosphorylierung von GSK3- β an Serin-9. Das Resultat ist eine Stabilisierung von β -Catenin und daraus folgend eine Erhöhung der Transkriptionsaktivität von β -Catenin-TCF/LEF [94]. Die Stabilisierung von β -Catenin wird jedoch nicht nur über eine Hemmung von GSK3- β herbeigeführt, sondern auch durch eine direkte Phosphorylierung von β -Catenin durch die Proteinkinase Akt (Abbildung 1.4) [93].

1.3.1.2 Die Rolle von Akt in der EMT

Die Signalkaskade von PI3K/Akt ist unter anderem an Zell-Zell-Kontakt-vermittelnde Strukturen gekoppelt und wird durch verschiedene extrazelluläre Stimuli ausgelöst. Beide Faktoren, sowohl die Lipidkinase PI3K, als auch die Serin-Threonin-Kinase Akt, sind in vielen humanen Tumoren hochreguliert oder konstitutiv aktiv [95]. Auch *in vivo* wurde aktives Akt in Tumoren detektiert [96] und eine erhöhte Expression in Brust-, Pankreas-, Kolon-, Prostata- und Ovarialkrebs nachgewiesen [97–99]. Außerdem konnte die PI3K/Akt-Signalkaskade als Auslöser eines Überlebenssignals nach Verlust der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte beschrieben werden, da Tubuluszellen der Maus nach Verlust der Zell-Matrix-Verankerungen durch die Aktivierung von PI3K/Akt eine Anoikis-Resistenz aufwiesen [100].

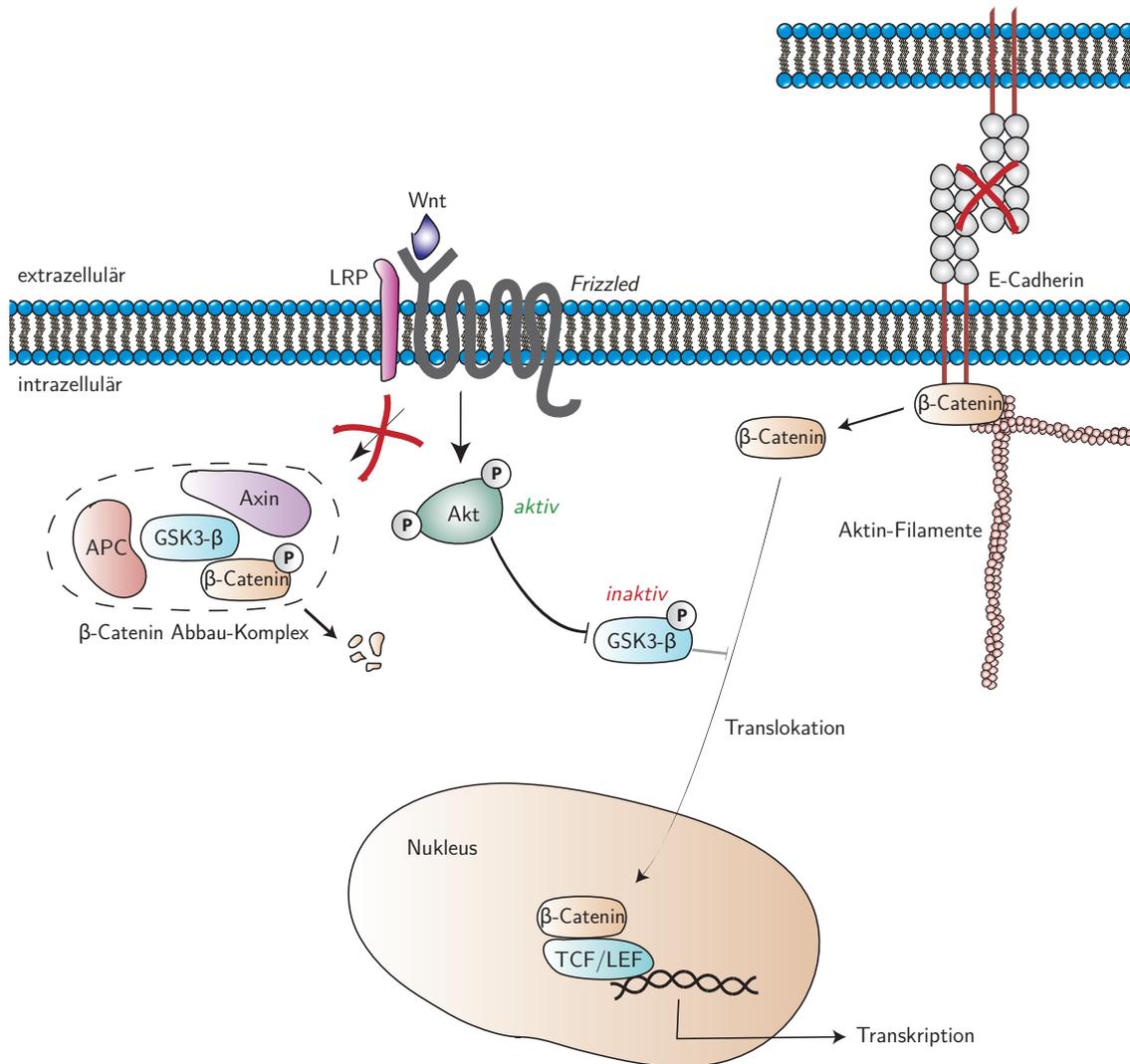


Abbildung 1.4 – Vereinfachte schematische Darstellung der Rolle von β -Catenin innerhalb der Zelle. Bei Bindung des Glykoproteins Wnt an das Heterodimer aus *Frizzled* und LRP findet eine Inaktivierung von GSK3- β statt, woraufhin β -Catenin akkumuliert und in den Zellkern transloziert wird, so dass die Transkription von Zielgenen aktiviert wird. Unabhängig von dem Wnt-Signalweg kann β -Catenin auch über den PI3K/Akt-Signalweg stabilisiert werden.

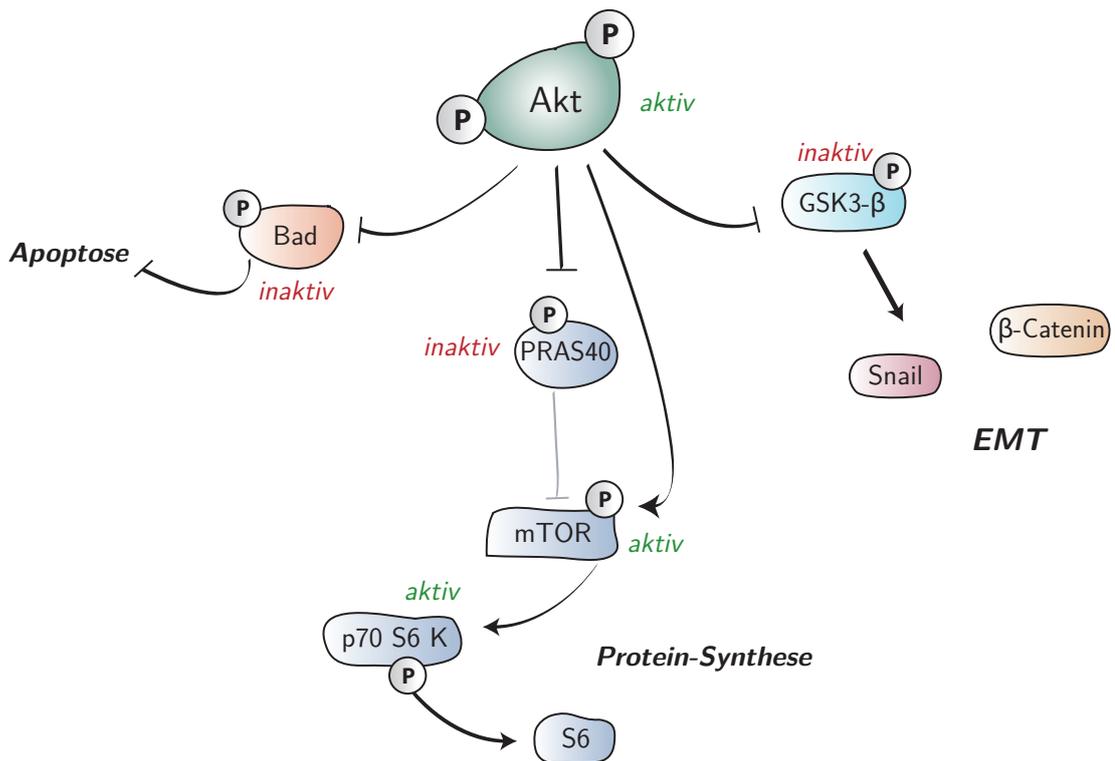


Abbildung 1.5 – Vereinfachte schematische Darstellung der Rolle von Akt innerhalb der Zelle. Bei Phosphorylierung von Akt an Threonin-308 und Serin-473 erfolgt zum einen eine Phosphorylierung des pro-apoptotischen Proteins Bad, was zum Verhindern der Apoptose führt, zum anderen wird der mTOR-Signalweg aktiviert, indem PRAS40 phosphoryliert und somit inaktiviert wird. Weiterhin wird GSK3-β durch Akt phosphoryliert und somit inhibiert, so dass eine Stabilisation von β-Catenin und Snail eintritt.

Die Serin-Threonin-Proteinkinase Akt (Proteinkinase B) wurde ursprünglich als Onkogen beschrieben, da sie in vielen Tumoren überexprimiert und aktiviert vorliegt. Diese Kinase spielt eine Rolle in zellulären Prozessen wie Proliferation, Stoffwechsel, dem Überleben der Zelle und bei der epithelial-mesenchymalen Transition [98]. Zur vollständigen Aktivierung von Akt sind Phosphorylierungen an unterschiedlichen Aminosäuren nötig: Neben einer Phosphorylierung an Threonin-308 ist weiterhin eine Phosphorylierung an Serin-473 essentiell [101, 102]. Es sind mittlerweile über 100 Substrate von Akt bekannt, die an Serin- bzw. Threoninresten phosphoryliert werden und dadurch inhibiert oder aktiviert werden. Es konnte gezeigt werden, dass Akt die Kinase GSK3-β an Serin-9 phosphoryliert und somit inhibiert [94, 103], woraufhin die Phosphorylierung von β-Catenin verhindert wird, was wiederum zur Aktivierung der Transkription von Zielgenen des Wnt-Signalweges führt. GSK3-β sorgt innerhalb der Zelle nicht nur für einen Abbau von β-Catenin, sondern auch von dem Transkriptionsfaktor Snail [104]. Snail gilt als essentieller Transkriptionsfaktor

während einer EMT, indem die Expression des E-Cadherin-Gens gesenkt wird [63]. Zudem verstärkt Akt die Protein-Synthese, da es mTOR (*mammalian target of rapamycin*) durch Phosphorylierung aktiviert und zusätzlich den mTOR-Inhibitor PRAS40 (*proline-rich Akt substrate of 40 kDa*) inaktiviert [105–107]. mTOR aktiviert daraufhin die p70 ribosomale Protein S6 Kinase (p70 S6 K) [108], was zur Folge hat, dass das ribosomale Protein S6 phosphoryliert wird und schlussendlich ribosomale Proteine gebildet werden. Eine weitere Funktion der Proteinkinase B ist die Inhibition der Apoptose. Der anti-apoptotische Effekt kommt dadurch zustande, dass das pro-apoptotische Protein Bad durch eine Phosphorylierung inaktiviert wird (Abbildung 1.5) [28].

1.3.2 Bakterien als Auslöser einer EMT

Die Auslöser einer EMT sind vielseitig und Gegenstand aktueller Forschung. Man geht davon aus, dass Wachstumsfaktoren Signalwege innerhalb der Zelle in Gang setzen, die die Integrität der Epithelzellen und Transkriptionsfaktoren regulieren und somit eine EMT induzieren können. Der am besten charakterisierte Induktor einer EMT ist TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*). Nach Stimulation von Epithelzellen mit TGF- β 1 werden verschiedene intrazelluläre Signalproteine aktiviert, zu denen unter anderem die Smad-Proteine zählen. Weiterhin werden die Ras-, MAPK-, Wnt/ β -Catenin-, Notch- und PI3K/Akt-Signalwege beeinflusst. Die Kontrolle der Transition erfolgt mithilfe von Transkriptionsfaktoren, zu denen Snail-, ZEB- und Twist-Proteine gehören. Im Zusammenspiel der aktivierten Signalkaskaden erfolgt die morphologische Ausprägung des mesenchymalen Phänotyps [109, 110].

Inwiefern inflammatorische Bedingungen in der Lage sind eine EMT zu bewirken, wurde unter anderem von López-Novoa *et al.* [111] und Fuxe *et al.* [112] zusammengefasst. Aufgrund der Sekretion von inflammatorischen Cytokinen und TGF- β 1 wurde ein Milieu geschaffen, in dem ein stabiler EMT-Phänotyp etabliert werden konnte [111, 112]. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass pathogene Mikroorganismen ebenfalls in der Lage sind eine TGF- β 1-abhängige oder -unabhängige EMT einzuleiten. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass eine Invasion von Bakterien in die Wirtszelle zu einer Regulation von TGF- β führt [113]. Lipopolysaccharid (LPS) als Hauptkomponente der Gram-negativen äußeren Membran konnte in biliären Epithelzellen eine EMT auslösen, indem die Expression von TGF- β 1 und mesenchymalen Markern (S100A4 und α -SMA) auf Gen- und Proteinebene induziert wurde, wohingegen der Gehalt an E-Cadherin in der Zelle gesunken ist [114]. *Helicobacter pylori* ist in der Lage, mithilfe seiner Virulenzfaktoren eine epithelial-mesenchymale Transition in Epithelzellen auszulösen. VacA (vakuolisierendes Cytotoxin A) kann die Barrierefunktion des Epithels und der Zell-Zell-Kontakte stören

[115], wohingegen CagA (Cytotoxin-assoziiertes Gen A) für den Verlust der Zellpolarität sorgt [116]. In Epithelzellen des Magens konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren der Snail-Familie Snail und Slug als Antwort auf *H. pylori* verstärkt exprimiert werden und CagA Snail stabilisieren kann, indem es dessen Inhibitor GSK3- β bindet und damit inaktiviert [117].

1.4 *Porphyromonas gingivalis*

1.4.1 Die Gattung *Porphyromonas*

Zunächst wurde *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) als *Bacteroides gingivalis* klassifiziert [118], anschließend jedoch in die Gattung *Porphyromonas* gruppiert [119]. Die Abgrenzung erfolgte aufgrund von biochemischen Unterschieden zu anderen Mitgliedern der Gattung *Bacteroides*. Bakterien dieser Gattung, zu der auch *P. endodontalis* und *P. asaccharolytica* zählen, sind asaccharolytische, Gram-negative, anaerobe, unbewegliche Stäbchen, die keine Sporen bilden. Die Kolonien auf Blutagarplatten sind glänzend, konvex, weisen eine Größe von 1-2 mm im Durchmesser auf und haben eine Schwarzfärbung. Die Färbung kommt durch die Einlagerung von Häm-haltigen Substanzen zustande, die für ihr Wachstum essentiell sind und ein Reservoir von Eisen und Cytochromen darstellen [120, 121]. Bei den Häm-haltigen Substanzen handelt es sich hauptsächlich um Protohäm mit Spuren von Protoporphyrin [119]. Der Name *Porphyromonas* leitet sich von dieser Eigenschaft der Gattung ab, da es übersetzt aus dem Griechischen „Porphyrin-Zelle“ bedeutet.

Die Endprodukte des Stoffwechsels von *Porphyromonas* sind Buttersäure und Essigsäure. Propionsäure, Isobuttersäure, Phenylelessigsäure und Isovaleriansäure werden ebenfalls in kleinen Mengen produziert [122]. Die Gattung ist außerdem in der Lage, Proteasen wie z. B. Trypsin-ähnliche Enzyme (Gingipaine) oder Kollagenasen zu bilden. In Bezug auf ihren Stoffwechsel besitzen sie eine Malat- und Glutamat-Dehydrogenase, jedoch keine Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase des Pentose-Phosphat-Weges, was sie von den *Bacteroides* unterscheidet [123]. Das Peptidoglykan-Gerüst der *Porphyromonas*-Arten besitzt Lysin anstelle von Diaminopimelinsäure, die N-Acetylmuraminsäuren miteinander quervernetzen [119].

1.4.2 *P. gingivalis* als Leitkeim der Parodontitis

Porphyromonas gingivalis gilt als einer der Hauptkeime, die mit der chronischen Verlaufsform einer Parodontitis in Verbindung gebracht werden [124] und wird in den „roten

Komplex“ der Mikroorganismen der Mundhöhle eingeordnet, was ihn als Parodontitis-assoziiertes pathogenes Bakterium beschreibt [3]. *P. gingivalis* kolonisiert hauptsächlich subgingivale Areale innerhalb der Mundhöhle, konnte aber auch schon von Zunge, Tonsillen und Saliva isoliert werden [125]. Bei Patienten mit einer Gingivitis stellten nur 5% der kultivierbaren Mikroorganismen *P. gingivalis* dar [126], so dass der parodontopathogene Keim fast ausschließlich von erkranktem Areal isoliert werden kann. In 85,75% der subgingivalen Plaqueproben von Patienten mit einer chronischen Parodontitis war *P. gingivalis* vorzufinden [127]. Neben der Parodontitis wird *P. gingivalis* weiterhin mit systemischen Erkrankungen in Verbindung gebracht: kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes, Bauchspeicheldrüsenkrebs und Frühgeburten [128–132].

1.4.3 Pathogenese der Parodontitis

Die durch eine Parodontitis ausgelöste Gewebeerstörung ist ein komplexer Prozess, begleitet von einer Akkumulation von Biofilm, der Sekretion von bakteriellen Metaboliten und einer Immunantwort des Wirtes.

Die Modulation der mukosalen epithelialen Barriere stellt einen wichtigen Schritt in der Pathogenese einer parodontalen Erkrankung dar. *P. gingivalis* hat die Fähigkeit an Epithelzellen zu adhären, in diese zu invadieren und sich dort zu replizieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass *P. gingivalis* in der Lage ist, an verschiedene Zellen epithelialen Ursprungs zu adhären: an humane primäre gingivale Epithelzellen [133] und epitheliale Zelllinien, wie KB-Zellen [134], HEP-2-Zellen [135], HeLa-Zellen und Ca9-22-Zellen [136]. Die Adhäsion läuft über einen multimodalen Prozess, bei dem Fimbrien, Proteasen, Hämagglutinine und Lipopolysaccharide involviert sind. Unter Fimbrien versteht man Filamente mit einem Durchmesser von 5 nm und einer Länge von 0,3 bis 3 µm. Bestehend aus 41 bis 49 kDa großen Fimbrillin-Untereinheiten sind Fimbrien die wichtigsten Faktoren für die Adhäsion des Bakteriums an die Epithelzellen [137]. *P. gingivalis* ist außerdem in der Lage, in gingivale Epithelzellen zu penetrieren und sich intrazellulär zu vermehren [138, 139]. Nicht nur *in vitro* [133, 134, 140], sondern auch *in vivo* waren intrazelluläre Bakterien nachweisbar [141, 142]. Das intrazelluläre Vorkommen bietet den Bakterien Schutz vor Abwehrmechanismen des Wirtes [140].

Die Persistenz von *P. gingivalis* innerhalb der epithelialen Zelle erfordert ein Umgehen der Barrierefunktion des Wirtes. Hierfür produziert das Bakterium eine Vielfalt an Virulenzfaktoren: Fimbrien, Kapselpolysaccharide, Lipopolysaccharide (LPS), Lipoteichonsäuren, Hämagglutinine, Gingipaine, Kollagenasen und Proteine der Außenmembran [143]. Die Fimbrien ermöglichen *P. gingivalis* sowohl die Interaktion mit anderen Mikroorganismen und Speichelkomponenten, als auch die Adhärenz an Zellen des Parodontalgewebes wie

Epithel und Fibroblasten [137]. 1997 wurden durch Potempa *et al.* [144] die Gingipaine, Cysteinproteasen, entdeckt, welche für die proteolytische Aktivität verantwortlich sind [144]. Gingipaine sind in der Lage, Antikörper zu spalten und die Aktivität von polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten zu stören [145]. Außerdem werden Cytokine, Komplementfaktoren und Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen abgebaut und die Synthese von Matrixmetalloproteasen stimuliert [146].

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Jährlich gibt es weltweit 600.000 Neuerkrankungen an Kopf- und Hals-Tumoren, die somit die fünfthäufigste Krebserkrankung darstellen. In Europa finden sich 3-5 % der malignen Tumoren in der Mundhöhle, von denen 95 % Plattenepithelkarzinome darstellen. Trotz möglicher Behandlungsschritte mittels chirurgischer Therapie, Strahlentherapie und Chemotherapie stagniert die Überlebensrate.

Epidemiologische Studien zeigten bereits, dass chronische inflammatorische Bedingungen in den meisten Patienten vorzufinden waren, die an einem oralen Plattenepithelkarzinom (OSCC) leiden [17–21]. Die häufigste chronische Infektion der Mundhöhle stellt die Parodontitis, mit *Porphyromonas gingivalis* als Schlüsselkeim, dar.

Inwiefern *P. gingivalis*, ähnlich zu dem offiziell bezeichneten Karzinogen *Helicobacter pylori*, als Auslöser der Krebsentstehung angesehen werden kann, ist bisher noch nicht bekannt. Vor diesem Hintergrund sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Bedeutung von *P. gingivalis* auf Prozesse der Tumorentstehung und -progression und somit der Beitrag des Bakteriums zur Schaffung eines Milieus, das die Entstehung einer Krebserkrankung fördert, evaluiert werden. Auf Basis von Langzeitversuchen wurde *in vitro* eine chronische Inflammation imitiert, dessen Potential auf das Auslösen einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) und die Ausbildung charakteristischer Tumormerkmale in immortalisierten gingivalen Epithelzellen überprüft wurde.

Folgende Fragestellungen waren in dieser Arbeit von Bedeutung:

- Ist *P. gingivalis* in der Lage, eine epithelial-mesenchymale Transition in immortalisierten gingivalen Epithelzellen auszulösen?
- Wird eine onkogene Transformation der gingivalen Epithelzellen induziert?

2 Material

2.1 Geräte

Anaerobentopf	Anaerobar 2,5 L, Oxoid (Wesel)
Analysewaage	Sartorius Analytik A 120 S, Sartorius (Göttingen)
Autoklav	Varioklav 25T, H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
Blotting-Zubehör	Gießstand, Glasplatten, Bio-Rad (München)
Brutschrank	Memmert (Schwabach)
Einkanalpipetten	Eppendorf Research [®] , Eppendorf (Hamburg)
	Pipetman Classic [™] , Gilson (Middleton, WI, USA)
	Starlab (Ahrensburg)
Eismaschine	Manitowoc Ice (Manitowoc, WI, USA)
Elektrische Pipettierhilfe	Pipetus [®] -akku, Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
	Easypet, Eppendorf (Hamburg)
Elektrophorese-System	PowerPac Basic Power Supply [™] , Bio-Rad (München)
	PowerPac [™] HC High-Current Power Supply, Bio-Rad (München)
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr (Ochsenhausen)
Gefrierschrank -80 °C	ThermoForma -86C ULT Freezer, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Gefriertruhe -80 °C	HT 5786-A, Hettich Freezer (Tuttlingen)
Gel-Dokumentation	ChemiDoc [™] XRS System, Bio-Rad (München)
Heizblock	Thermomixer compact, Eppendorf (Hamburg)
Inkubator (Zellkultur)	ThermoForma SteriCycle CO ₂ Incubator, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
	BB15, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Kühlschrank +4 °C	Robert Bosch Haushaltsgeräte (München)
Magnetrührer	MR3001, Heidolph Instruments (Schwabach)

Mikroskop und Kamera	AxioImager A1 und AxioCam MRc, Carl Zeiss (Jena) Axiovert 25, Carl Zeiss (Jena) Optech Optical Technology (Duisburg)
Mikroplatten-Lesegerät	Modell 680, Bio-Rad (München) Epoch™, Biotek Instruments (Bad Friedrichshall)
Multikanalpipette	Eppendorf (Hamburg)
Photometer	CO8000 Cell Density Meter, Biochrom (Cambridge, GB)
pH-Meter	WTW Wissenschaftliche Werkstätten (Weilheim)
Real-Time PCR-Cycler	iCycler® Thermal Cycler, Bio-Rad (München)
Schüttler	MS2 Minishaker, IKA R (Staufen) PMR-30, Grant-Bio (Hillsborough, NJ, USA)
SDS-PAGE-Kammer	Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad (München)
Semidry Blot Gerät	Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad (München)
Sicherheitswerkbank (Zellkultur)	EN 12469 Clean Air Typ EF/A6E, Clean Air Technik (Woerden, NL)
Sicherheitswerkbank (Bakterien)	LaminAir HAC 2448 GS, Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000, Peqlab (Erlangen)
Wasserbad (Zellkultur)	Julabo (Seelbach)
Zentrifuge für 1,5/2 mL-Gefäße	Centrifuge 5415 D, Eppendorf (Hamburg) Centrifuge S415®, Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge für 50 mL-Gefäße	Biofuge strator Heraeus, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

2.2 Chemikalien und Reagenzien

0,5 M Tris (pH 6,8)	Bio-Rad (München)
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Merck (Darmstadt)
1,5 M Tris (pH 8,8)	Bio-Rad (München)
Acrylamidmix, 40 %	Bio-Rad (München)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Bio-Rad (München)
Ampuwa Spüllösung (Plastipur)	Fresenius Kabi GmbH (Bad Homburg)
Antibiotika-Antimykotikum (AB)	PAA (Cölbe)
<i>Brain Heart Infusion</i> (BHI)-Medium	AES Chemunex (Bruz Cedex, F)

Borsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Bradford-Reagenz	Bio-Rad (München)
Brij [®] 35 Detergenz, 30 %	Calbiochem (San Diego, CA, USA)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl x 2 H ₂ O)	Merck (Darmstadt)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Coomassie Blue R-250	Roth (Karlsruhe)
DAKO <i>Fluorescent Mounting Medium</i>	DAKO (Glastrup, DK)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	Gibco Life Technologies (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Eisessig	Merck (Darmstadt)
Ethanol, absolut	AppliChem (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA (Cölbe)
Gelatine	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Hämin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Calbiochem (Darmstadt)
Igepal	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
iQ [™] SYBR [®] Green Supermix	Bio-Rad (München)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
KGM2 (<i>Keratinocyte Growth Medium 2</i>)	PromoCell (Heidelberg)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt)
Kristallviolett	Merck (Darmstadt)
Laemmli-Puffer (2x)	Bio-Rad (München)
Magnesiumacetat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Matrigel [™]	BD Biosciences (Bedford, MA, USA)
Menadion	AppliChem (Darmstadt)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Methanol	AppliChem (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck (Darmstadt)
Natronlauge (NaOH 1 mol/L)	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat (3 M)	Appllichem (Darmstadt)
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad (München)
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Nigericin	InvivoGen (San Diego, CA, USA)
Paraformaldehyd (PFA, 4 %, pH 7,4)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA (Cölbe)
Phalloidin CruzFluor-488 Konjugat	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Phenyl/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth (Karlsruhe)
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Polyvinylalkohol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche (Mannheim)
Proteinstandard Precision Plus Protein TM Kaleidoscope TM 161-0375	Bio-Rad (München)
Reagent Diluent Konzentrat 1	R&D Systems (Wiesbaden)
Radioimmunopräzipitations-Puffer (RIPA-Puffer)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
RPMI 1640	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Schwefelsäure (H_2SO_4)	Merck (Darmstadt)
Stable Peroxide Substrate Puffer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Tris-gepufferte Salz-Lösung (TBS)	Bio-Rad (München)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad (München)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypsin/EDTA (0,05 % (w/v))	PAA (Cölbe)
Tween [®] 20	Bio-Rad (München)

2.3 Verbrauchsmaterialien

8-Kammer-Objektträger	SPL Life Science (Gyeonggi-Do, COR)
Anaerocult	Merck (Darmstadt)
Anaerotest	Merck (Darmstadt)
<i>Brucella</i> Blutagarplatten mit Hämin und Vitamin K1	Becton Dickinson (Heidelberg)
Deckgläser (Glas) 12 mm	Marienfeld GmbH (Lauda Königshofen)
Deckgläser (Glas) 15 mm	Marienfeld GmbH (Lauda Königshofen)
Einweg-Filtereinheit (0,2 µm)	Sartorius Stedim Biorech (Aubagne Cedex, F)
Filterpapiere Western-Blot, Extra Thick Blot Paper PROTEAN [®] xi size	Bio-Rad (München)
Kryoröhrchen	Nunc (Langenselbold)
Multiwell-Platten - 12, 24, 96 Kavitäten	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Objektträger 72x25 mm	Marienfeld GmbH (Lauda Königshofen)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging (Chicago, IL, USA)
Pipettenspitzen	Starlab (Ahrensburg)
Plastikküvetten Halbmikro	Ratiolab GmbH (Dreieich)
Plattenkorb zum Einsetzen von Petrischalen	Merck (Darmstadt)
PP Reaktionsgefäße 15 mL/50 mL	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
PVDF Membran	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Reaktionsgefäße 1,5 mL	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße 2 mL	Eppendorf (Hamburg)
SDS-Gelbeladungs-Spitzen	VWR International GmbH (Darmstadt)
Serologische Pipetten	Corning (Corning, NY, USA)
Sterilfilter	GE Healthcare Europe (Freiburg)
Wattetupfer Cultiplast	LP Italiana Spa (Mailand, IT)
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One (Frickenhausen, USA)
Zellschaber, 20 cm	TPP (Trasadingen, CH)

2.4 Antikörper

Die folgenden nicht-konjugierten Primärantikörper fanden in dieser Arbeit Verwendung und wurden mit Ausnahme der Primärantikörper gegen Bcl-2, Caspase-1 p10 und IL-1 β (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) von Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) bezogen und in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

Zielprotein	Spezies	Artikelnr.
β -Aktin	Kaninchen	8457
β -Catenin	Kaninchen	8480
Bcl-2	Kaninchen	sc-783
Caspase-1 p10	Kaninchen	sc-515
E-Cadherin	Kaninchen	3195
Histon H3	Kaninchen	4499
IL-1 β	Kaninchen	sc-7884
N-Cadherin	Kaninchen	13116
Snail	Kaninchen	3879

Bei dem eingesetzten konjugierten Antikörper handelt es sich um einen HRP-gekoppelten α -Kaninchen-Antikörper, der von Cell Signaling bezogen und in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet wurde.

2.5 Kits

Bio-Rad Protein Assay Kit (Proteinbestimmung nach Bradford)	Bio-Rad (München)
ELISA human TGF- β 1 und VEGF Immunoassay DuoSet [®]	R&D Systems (Wiesbaden)
iScript [™] Select cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad (München)
PathScan [®] Cancer Phenotype Antibody Array Kit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
PathScan [®] Intracellular Signaling Array Kit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Pierce BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Pierce ECL Western-Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
RNeasy [™] Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

2.6 Oligonukleotide

Die eingesetzten Primer wurden von Metabion (Martinsried) synthetisiert, lyophilisiert geliefert und mit Nuklease-freiem Wasser auf die entsprechende Konzentration eingestellt. Von allen eingesetzten Oligonukleotiden wurde ein Primermix angesetzt, in dem sowohl 5'-, als auch 3'-Primer in einer Konzentration von 5 µmol/L vorhanden sind. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Nachfolgend sind die Primersequenzen für einen Nachweis einer Mykoplasmenkontamination aufgelistet.

Name	Sequenz 5'→ 3'	Referenz
Myco_1_for	CGCCTGAGTAGTACGTTTCGC	Uphoff <i>et al.</i> [147]
Myco_2_for	CGCCTGAGTAGTACGTACGC	Uphoff <i>et al.</i> [147]
Myco_3_for	TGCCTGGGTAGTACATTCGC	Uphoff <i>et al.</i> [147]
Myco_4_for	TGCCTGAGTAGTACATTCGC	Uphoff <i>et al.</i> [147]
Myco_5_for	CGCCTGAGTAGTATGCTCGC	Uphoff <i>et al.</i> [147]
Myco_6_for	CACCTGAGTAGTATGCTCGC	Uphoff <i>et al.</i> [147]
Myco_7_for	CGCCTGGGTAGTACATTCGC	Uphoff <i>et al.</i> [147]
Myco_8_rev	GCGGTGTGTACAAGACCCGA	Uphoff <i>et al.</i> [147]
Myco_9_rev	GCGGTGTGTACAAAACCCGA	Uphoff <i>et al.</i> [147]
Myco_10_rev	GCGGTGTGTACAAAACCCGA	Uphoff <i>et al.</i> [147]

Im Folgenden sind die für die Real-Time PCR eingesetzten Primerpaare und deren ermittelte Effizienzen aufgelistet. Die Effizienzen wurden nach Pfaffl [148] und Bustin *et al.* [149] ermittelt.

Name	Sequenz 5'→ 3'	Produkt [bp]	Effizienz
β-Aktin_for	CATGGATGATGATATCGCCGCG	371	1,84
β-Aktin_rev	ACATGATCTGGGTCATCTTCTCG		
GAPDH_for	TGGTATCGTGGAAGGACTCA	132	1,93
GAPDH_rev	CCAGTAGAGGCAGGGATGAT		
CDH1_for	GATCTGAACACCTACAATGCCGC	226	1,88

2 Material

Name	Sequenz 5'→ 3'	Produkt [bp]	Effizienz
CDH1_rev	CAGTGACTGTGATCACAGCTGTT		
CDH2_for	ACCCATCCACGCCGAGCCCCA	244	1,95
CDH2/3_rev	CCGTGGCCCCCAGTCGTTTCAG		
MMP-9_for	CCGGACCAAGGATACAGTTT	149	1,97
MMP-9_rev	CCATTCACGTCGTCCTTATG		
NANOG_for	GATGCCTGGTGAACCCGACT	252	1,98
NANOG_rev	CCAGGCAGCCTCCAAGTCA		
OCT3/4_for	TTCAGCCAAACGACCATCTG	147	2,07
OCT3/4_rev	CACGAGGGTTTCTGCTTTGC		
SOX2_for	CCCACCTACAGCATGTCCCTACTC	124	1,88
SOX2_rev	TGGAGTGGGAGGAAGAGGTAAC		
SNAI1_for	GGA CTCTAATCCAGAGTTTACCTTCCA	124	1,83
SNAI1_rev	GACAGAGTCCCAGATGAGCATTG		
S100A1_for	GATGGAGACCCTCATCAACGTGT	218	1,94
S100A1_rev	CAGCCACAAGCACCACATACTCCT		
S100A2_for	CTGGCTGTGCTGGTCACTACCTT	258	1,87
S100A2_rev	TGGGCAGCCCTGGAAGAAGTCATT		
S100A3_for	CCTTCCAGGAATACGCAGGGCGCT	214	1,99
S100A3_rev	CAGTAGAGACAGAGGCAGGCAAG		
S100A4_for	ATGGCGTGCCCTCTGGAGAAGG	306	2,08
S100A4_rev	TCATTTCTTCCTGGGCTGCTTATC		

2 Material

Name	Sequenz 5'→ 3'	Produkt [bp]	Effizienz
S100A6_for	ATCCTTCCACAAGTACTCCGGCAGG	227	1,92
S100A6_rev	CCCTTGAGGGCTTCATTGTAGATC		
S100A7_for	ATGAGCAACACTCAAGCTGAGAGG	306	1,95
S100A7_rev	TCACTGGCTGCCCCCGAAC		
S100A8_for	GACCGAGCTGGAGAAAGCCTTGA	157	1,91
S100A8_rev	CCAGACGTCTGCACCCTTTTTTCC		
S100A9_for	AGCTGGAACGCAACATAGAGACCAT	174	1,89
S100A9_rev	CCTCCATGATGTGTTCTATGACCT		
S100A10_for	TCGCTGGGGATAAAGGCTACTT	190	1,95
S100A10_rev	GCAATGGTGAGGCCCGCAATTAG		
S100A11_for	CCCTACAGAGACTGAGCGGTGCA	255	1,98
S100A11_rev	CAAGCCATAGCTAGGCCACCAA		
S100A13_for	AGCAGAACCACTGACAGAGCTAG	245	1,93
S100A13_rev	CCAGCTCCCCAATCAATCTCCAGT		
S100A14_for	GGCCATTGAGACCCTCATCAAGAA	221	1,88
S100A14_rev	TCTTGCCCGCTTCTCCAATCAGCT		
S100A16_for	GAAGGCAGTCATTGTCTGCTGGA	233	1,85
S100A16_rev	TGATGCCGCCTATCAAGGTCCAG		

2.7 Software

Adobe Illustrator CS2	Adobe Systems Software (Dublin, IRL)
AxioVision 4.7	Carl Zeiss (Jena)
Gen5 Version 2.0	BioTek Instruments Inc (Winooski, VT, USA)
GraphPadPrism™ Version 5	GraphPad Software (San Diego, CA, USA)
ImageJ 1.51g	National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA)
iQ5 Software Version 2.1	Bio-Rad (München)
ND-1000 V3.5.2	Peqlab (Erlangen)
Quantity One 4.6.9	Bio-Rad (München)

2.8 Bakterienstämme und Nährmedien

In dieser Arbeit wurde mit *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) ATCC 33277 gearbeitet. Die erste Isolierung erfolgte 1980 von Shah *et al.* [119] unter dem Namen *Bacteroides gingivalis*. Der verwendete Stamm besitzt keine Kapsel (K^-) und kann Typ-1-Fimbrien bilden (*fimA*-Genotyp I). Als Festmedium dienten für den angegebenen Bakterienstamm *Brucella*-Blutagarplatten mit Hämin und Vitamin K1. Als Flüssigmedium wurde BHI (*brain heart infusion*)-Medium, welchem Hämin (5 µg/mL) und Menadion (1 µg/mL) zugesetzt wurde, eingesetzt.

2.9 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendete OKF6/hTERT-1-Zelllinie stellt eine immortalisierte humane, gingivale Epithelzelllinie dar, die im Rheinwald *Laboratory* der *Harvard Medical School* (Boston, USA) hergestellt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurde. Die Grundlage der Zelllinie stellen oral-ösophageale Plattenepithelzellen aus der endoskopisch gewonnenen Biopsie eines männlichen Nichtraucher ohne Dysplasien der Mundschleimhaut dar (OKF6). Die Immortalisierung erfolgte durch die ektopische Expression von hTERT, welche für die katalytische Untereinheit der menschlichen Telomerase kodiert.

Weiterhin wurde die humane monozytäre THP-1-Zelllinie (DSMZ no.: ACC 16) verwendet. Es handelt sich hierbei um eine akute Leukämiezelllinie, die sich nach Inkubation mit dem Phorbolster PMA zu Makrophagen differenzieren lässt [150].

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Stammhaltung

Porphyromonas gingivalis wurde zur Stammhaltung auf *Brucella*-Blutagarplatten mit Hämin und Vitamin K1 ausgestrichen, für fünf Tage unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert. Langfristig wurden Glycerinkulturen (20 % (v/v)) angelegt und bei -80 °C gelagert.

3.1.2 Flüssigkultivierung

Für Vorkulturen von *P. gingivalis* wurde Zellmaterial von einer Agarplatte oder einer Glycerinkultur in 5 mL BHI-Medium mit Hämin (5 µg/mL) und Menadion (Vitamin K3, 1 µg/mL) übertragen. Für Hauptkulturen wurde aus der Vorkultur ein Volumen entnommen, so dass die Hauptkultur eine optische Dichte bei 600 nm von 0,1 aufwies. Die Flüssigkulturen wurden analog zu den Agarplatten bei 37 °C im Anaerobentopf inkubiert. Die Kulturen wurden nach der Bebrütung geerntet, indem 10 min bei 1500 g zentrifugiert und das Zellpellet anschließend in PBS oder Zellkultur-Medium resuspendiert wurde.

3.1.3 Photometrische Messung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD) wurde bei Flüssigkulturen mithilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Dabei wurde das Bakterienpellet in PBS resuspendiert und die Messung gegen PBS als Leerwert (Blank) in Plastikkuvetten durchgeführt.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivieren und Passagieren eukaryotischer Zellen

Für alle zellbiologischen Experimente wurde die immortalisierte gingivale Epithelzelllinie OKF6/hTERT-1 oder die Monozytenzelllinie THP-1 verwendet. Zur Kultivierung wurden die Zellen in sterilen Kulturschalen bzw. Mikrotiterplatten ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung kultiviert. Als Medium für die OKF6/hTERT-1-Zellen wurde KGM2 (*keratinocyte growth medium*) mit den Zusätzen CaCl₂ und *Supplement Mix* und 1 % Antibiotikum-Antimykotikum verwendet, so dass die in Tabelle 3.1 angegebenen Konzentrationen an Supplementen im Medium vorhanden waren. Das Wachstum und die Morphologie der Zellen wurden regelmäßig mit einem Phasenkontrastmikroskop überprüft.

Tabelle 3.1 – Finale Supplement-Konzentrationen im KGM2.

Rinderhypophysenextrakt	0,004 mL/mL
Epidermaler Wachstumsfaktor	0,125 ng/mL
Insulin	5 µg/mL
Hydrocortison	0,33 µg/mL
Epinephrin	0,39 µg/mL
Transferrin	10 µg/mL
CaCl ₂	0,06 mM

Die Monozytenzelllinie THP-1 wurde mit RPMI 1640-Medium kultiviert, dem 10 % fetales Kälberserum und 1 % Antibiotikum-Antimykotikum zugesetzt wurde. Die Differenzierung der Monozyten in Makrophagen erfolgte durch Zugabe von 100 nM PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) für 48 h. Mikroskopisch konnten die Makrophagen unterschieden werden, da THP-1-Monozyten als Suspensionskultur und Makrophagen als adhärenente Zellen vorliegen.

Zur Zellgewinnung für die folgenden Versuche und zum Passagieren der eukaryotischen Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Ablösung der adhärenenten Zellen durch eine Behandlung mit Trypsin/EDTA. Hierfür wurden die Kulturschalen bis zum Ablösen der Zellen bei 37 °C inkubiert. Daraufhin sind die gelösten Zellen zum Abstoppen der Reaktion in dem zweifachen Volumen an Medium aufgenommen und 5 min bei 800 g zentrifugiert worden. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 1 mL Zellkultur-Medium resuspendiert. Anschließend

erfolgte eine Zellzählung mithilfe der Neubauer Zählkammer. Die Zellen wurden entweder in neue Kulturschalen passagiert, für Experimente weiterverwendet oder zur langfristigen Lagerung eingefroren. Hierfür wurden die Zellen mit Einfriermedium versetzt und in Kryoröhrchen abgefüllt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen zügig aufgetaut, in 10 mL Zellkultur-Medium aufgenommen und in Kulturschalen bzw. -flaschen ausgesät.

PBS-Puffer: 150 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , pH 7,2
Trypsin-EDTA-Lösung: 0,05 % (w/v) Trypsin, 0,53 mM EDTA
Einfriermedium: Zellkultur-Medium + 5 % DMSO

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität mittels Hämocytometer

Die Zellzahlbestimmung dient der Standardisierung der Versuche. Die Zählung fand in einer Neubauer-Zählkammer (Hämocytometer) statt, indem $10\text{ }\mu\text{L}$ einer Zellsuspension mit $30\text{ }\mu\text{L}$ Trypanblau versetzt wurden. Tote Zellen nehmen den Farbstoff Trypanblau auf, so dass sie im Mikroskop blau erscheinen, wohingegen lebende Zellen nicht angefärbt werden. $10\text{ }\mu\text{L}$ der mit Trypanblau versetzten Zellen wurden auf die Zählkammer gegeben und vier Großquadrate ausgezählt. Die Zellzahl wurde anschließend anhand von Formel 3.1 berechnet. Das Kammervolumen über einem Großquadrat ergibt sich daraus, dass jedes Großquadrat eine Fläche von 1 mm^2 besitzt. Die Höhe zwischen Deckglas und Objektträger beträgt $0,1\text{ mm}$, so dass das Volumen über einem Quadrat $0,1\text{ mm}^3$ beträgt.

$$\frac{N * V_G}{Q * V_K * V_Z} = x \quad (3.1)$$

Es gilt:

N	Anzahl der gezählten Zellen
Q	Anzahl der ausgezählten Großquadrate
V_G	eingesetztes Gesamtvolumen [mL]
V_Z	Volumen der eingesetzten Zellsuspension [mL]
V_K	Kammervolumen über einem Großquadrat (10^{-4} mL)
x	Zellzahl [Zellen/mL]

3.2.3 Nachweis von Mykoplasmen mittels DAPI-Färbung

Mykoplasmen sind Gram-positive Bakterien der Klasse der *Mollicutes*. Charakteristisch ist eine fehlende Zellwand. Im Vergleich zu „normalen“ Bakterien (1 - 10 µm) weisen sie eine Größe von 0,2 - 0,5 µm auf und gelten somit als die kleinsten pathogenen Prokaryoten. Aufgrund der fehlenden Zellwand bilden Mykoplasmen pleomorphe Zellformen und sind gegen Zellwand-angreifende Antibiotika, z. B. der β -Laktam-Familie (Penicillin), resistent. Nach Uphoff *et al.* [147] sind 15 - 35 % aller Zellkulturen mit Mykoplasmen kontaminiert. Dies stellt insoweit ein Problem dar, da Mykoplasmen einen Einfluss auf den Stoffwechsel, das Wachstum und biochemische Eigenschaften der Zelllinien haben können. Um eine Aussage über die Reinheit der verwendeten eukaryotischen Zellen zu machen, wurde mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) und DAPI-Färbung auf Mykoplasmen-Verunreinigungen getestet. Die Detektion der Mykoplasmen mit Polymerasekettenreaktion ist in Abschnitt 3.3.4 beschrieben.

Da Mykoplasmen extrazellulär auf der Oberfläche der eukaryotischen Zellen leben, ist ein optischer Nachweis mit dem DNA-färbenden Farbstoff DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) möglich. DAPI bindet vorwiegend an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA und stellt somit einen Kernfarbstoff dar [151]. Die zu untersuchenden Zellen wurden auf Deckgläschen in Kulturschalen ausgesät und bei Vorhandensein einer Konfluenz mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit Methanol (70 %) für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die Färbung mit DAPI-Lösung für 10 Minuten im Dunkeln und die Eindeckung mit DAKO *Fluorescent Mounting Medium*. Die Auswertung fand am Fluoreszenzmikroskop AxioImager A1 statt. Mykoplasmen erscheinen im Fluoreszenzmikroskop als kleine Punkte, im Gegensatz zu den deutlich gefärbten großen Kernen der eukaryotischen Zellen.

DAPI-Lösung: 0,0001 % (w/v) DAPI in Aqua dest.

3.2.4 Stimulationsversuche

Die Stimulationen der Zellen erfolgten in KGM- (OKF6/hTERT-1) bzw. RPMI-Medium (THP-1). Bei einer Stimulation der Zellen mit *P. gingivalis* wurde dem Medium zusätzlich 1 % Antibiotikum-Antimykotikum zugesetzt, um das Wachstum der Bakterien zu verhindern.

Die Experimente wurden, je nach Fragestellung, in 6 cm-Schalen, 12-well-Platten, 8-Kammer-Objektträgern oder 24-well-Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ durchgeführt. Nach Erreichen von 80 - 100 % bzw. für Langzeit-Stimulationen von 50 % Konfluenz wurden

die Zellen mit PBS gewaschen und mit *P. gingivalis* im Bakterien-Zell-Verhältnis 1:1 (MOI 1), 10:1 (MOI 10), 100:1 (MOI 100) oder 500:1 (MOI 500) in Zellkultur-Medium zu den Zellen gegeben. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion erfolgte eine Abnahme des Überstandes, um sekretierte Proteine nachzuweisen. Zur Extraktion der RNA aus stimulierten Zellen wurden 300 µL Lysepuffer, bestehend aus RLT-Puffer und β-Mercaptoethanol, zu den Zellen gegeben. Die Isolierung der Gesamtproteinfraktion aus den Zellen erfolgte durch Zugabe von RIPA-Puffer.

Stimulationen der differenzierten THP-1-Zellen erfolgten mit *P. gingivalis* (MOI 100) und Nigericin (6 µM) in RPMI-Medium. Nach 6 h und 24 h wurde der Überstand zum einen zum Nachweis von IL-1β mittels ELISA untersucht, zum anderen auf aktive Caspase-1 mithilfe eines Western-Blots. Weiterhin wurde die Cytotoxizität des parodontopathogenen Bakteriums und Nigericin auf die THP-1-Makrophagen nach 6 h und 24 h beobachtet.

3.2.5 Induktion von Anoikis in immortalisierten Epithelzellen

Mithilfe des poly-HEMA-Assays lassen sich Anoikis-resistente von Anoikis-sensitiven Zellen unterscheiden. Hierbei werden Zellkulturschalen mit poly-HEMA (Polyhydroxyethylmethacrylat) beschichtet und somit die Bildung von Zell-Matrix-Verbindungen unterbunden. OKF6/hTERT-1-Zellen wurden zunächst fünf Tage mit *P. gingivalis* (MOI 100) vorstimuliert und daraufhin auf poly-HEMA-beschichtete Zellkulturschalen gegeben. Die Beschichtung erfolgte, indem 500 µL poly-HEMA in einer Konzentration von 12 mg/mL in 95 % Ethanol in 3,5 cm-Schalen gegeben wurde. Nach dem Trocknen dieser wurde mit PBS und Zellkultur-Medium gewaschen. Die vorstimulierten Zellen bzw. eine nicht-stimulierte Kontrolle wurden anschließend über Nacht auf die beschichteten Schalen gegeben und mittels Trypanblau-Färbung die Viabilität der Zellen in einem Hämocytometer bestimmt.

poly-HEMA-Lösung (10x): 120 mg/mL in 95 % Ethanol, für 8 Stunden bei 65 °C gelöst

3.2.6 Cytotoxizitätsnachweis durch Messung der LDH-Aktivität

Der Nachweis des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) erfolgte mithilfe des LDH *Cytotoxicity* Assay Kits und wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

Der Test gilt als indirekter Nachweis einer Pyroptose, indem die cytoplasmatische Cysteinprotease LDH, welche aufgrund von Zellmembranschädigungen in das Zellkultur-Medium gelangt, nachgewiesen wird.

Hierbei wird in einer gekoppelten enzymatischen Reaktion kolorimetrisch LDH im Überstand von Zellen nachgewiesen. LDH katalysiert die Umwandlung von Laktat in Pyruvat, indem Nicotinamidadeninindinukleotid (NAD^+) zu NADH reduziert wird. NADH wird anschließend von Diaphorase genutzt, um ein Tetrazoliumsalz zu einem roten Formazan umzuwandeln. Der Nachweis erfolgt bei 490 nm. Die Formazanbildung ist proportional zu der Menge sezernierter LDH.

Mit PMA differenzierte THP-1-Zellen wurden in 24-*well*-Platten ausgesät und mit Nigericin als Positivkontrolle einer Inflammasom-Aktivierung und *P. gingivalis* stimuliert. Nach 6- und 24-stündiger Inkubation wurden 50 μL des Zellüberstandes entnommen und in eine 96-*well*-Mikrotiterplatte überführt, mit Substratlösung 30 min im Dunkeln inkubiert, die Reaktion mit Stop-Lösung abgestoppt und die Extinktion bei 490 nm und 680 nm photometrisch gemessen. Als Positivkontrolle für 100 %-ige Cytotoxizität wurde 0,1 % Triton X-100 in PBS verwendet. Die Berechnung der Cytotoxizität der Probe erfolgte anhand von Formel 3.2.

$$\% \text{ Cytotoxizität} = \frac{\text{LDH-Aktivität}_{\text{Probe}} - \text{LDH-Aktivität}_{\text{Kontrolle}}}{\text{LDH-Aktivität}_{\text{Triton}} - \text{LDH-Aktivität}_{\text{Kontrolle}}} * 100 \quad (3.2)$$

Es gilt:

LDH-Aktivität _{Probe}	A ₄₉₀ - A ₆₈₀ der mit Nigericin/ <i>P. gingivalis</i> stimulierten Zellen
LDH-Aktivität _{Kontrolle}	A ₄₉₀ - A ₆₈₀ der unstimulierten Zellen
LDH-Aktivität _{Triton}	A ₄₉₀ - A ₆₈₀ der mit 0,1 % Triton X 100-behandelten Zellen

Substratlösung: lyophilisierter Substratmix + 11,4 mL Wasser + 0,6 mL Assay-Puffer

3.2.7 Phalloidin-Färbung

Die Phalloidin-Färbung erfolgte in dieser Arbeit in sterilen 8-Kammer-Objektträgern. Die OKF6/hTERT-1-Zellen wurden hierfür für drei Tage mit *P. gingivalis* (MOI 100) stimuliert. Wenn die Zellen eine 90 %-ige Konfluenz aufwiesen, wurden sie mit 500 μL PBS gewaschen und anschließend mit Paraformaldehyd (4 %, pH 7,4) für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Erneutes Waschen mit PBS, eine 10-minütige Behandlung mit 50 mM Ammoniumchlorid und Solubilisieren der Zellen mit 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS schlossen sich an. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Phalloidin CruzFluor-488 für 30 min im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss an einen Waschschritt erfolgte die Inkubation mit DAPI (1:10000 in Aqua dest.). Anschließend wurde für

1 min mit Aqua dest. gewaschen, der Kammeraufsatz der Objektträger abgenommen, die gefärbten Zellen mit DAKO *Fluorescent Mounting Medium* eingedeckt und mit dem Fluoreszenzmikroskop (AxioImager A1) mikroskopiert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 DNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen

Zum Nachweis einer Mykoplasmen-Kontamination in den eingesetzten OKF6/hTERT-1- und THP-1-Zellen wurde die DNA aus den Überständen der eukaryotischen Zellen mit Triton X-100-Puffer extrahiert und mittels spezifischer Primer eine PCR durchgeführt.

1 mL der Zellkulturüberstände wurden zum Mykoplasmen-Nachweis mittels Polymerasekettenreaktion 6 min bei 15000 g zentrifugiert und im Anschluss zweimal mit 1 mL PBS gewaschen. Das gewaschene Zellpellet wurde mit 200 μ L Triton-X-100-Puffer versetzt und 30 min bei 95 °C aufgekocht, auf Eis abgekühlt und 10 min bei 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktions-Gefäß überführt.

Triton X-100-Puffer: 1 % Triton X-100, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA
--

3.3.2 RNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen

Die Isolierung eukaryotischer RNA erfolgte mithilfe des RNeasyTM Mini-Kit und wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Adhärenz OKF6/hTERT-1-Zellen wurden mit 300 μ L Lysepuffer (990 μ L RLT + 10 μ L β -Mercaptoethanol) behandelt, welcher Guanidiniumisothiocyanat (GITC) enthält, das denaturierend wirkt, so dass RNasen inaktiviert werden [152]. Der Zusatz von Mercaptoethanol verhindert die Degradation der RNA. Anschließend wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers von der Kulturschale gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen 70 %-igem Ethanol versetzt, so dass die Bindungseigenschaften der RNA an die Silika-Säule verbessert wurden. Nachdem die Probe auf die Säule gegeben wurde, ist 30 s bei 16000 g zentrifugiert worden, so dass die RNA an die Membran adsorbieren konnte. Anschließend wurde mit 700 μ L des Waschpuffers RW1 und daraufhin mit 500 μ L Puffer RPE gewaschen, der vier Volumen Ethanol enthält. Die Elution der RNA erfolgte zweimal mit 50 μ L RNase-freiem Wasser, so dass ein Gesamtvolumen von 100 μ L RNA in Wasser vorhanden war.

Anschließend erfolgte eine spektrophotometrische Reinheits- und Mengenbestimmung mithilfe eines UV-Photospektrometers (NanoDrop-1000) durch Bestimmung der Absorption

bei 260 nm und 280 nm. Eine OD_{260} von 1 entspricht $40 \mu\text{g RNA/mL}$, so dass sich die RNA-Konzentration nach Formel 3.3 berechnet.

$$c \text{ (ng/}\mu\text{L)} = OD_{260} * \text{Verdünnungsfaktor} * 40 \quad (3.3)$$

3.3.3 Oligo(dT)-geprimte cDNA-Synthese

Hintergrund der cDNA-Synthese ist das Umschreiben einzelsträngiger RNA mithilfe einer reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) in cDNA (*complementary DNA*) [153]. Im ersten Schritt der cDNA-Synthese lagert sich die Polymerase an die einzelsträngige RNA und bildet einen komplementären DNA-Strang. In einem zweiten Schritt wird der RNA-DNA-Hybridstrang durch die Exoribonukleaseaktivität (RNase) der reversen Transkriptase hydrolysiert. DNA-Polymerasen benötigen als Startpunkt der DNA-Synthese Oligonukleotid-Primer. Bei der oligo(dT)-geprimten cDNA-Synthese werden kurze Primer, nur aus Desoxythymidin bestehend, eingesetzt, so dass diese an den poly(A)-Schwanz der mRNA binden. Weitere einsetzbare Primer, die in dieser Arbeit nicht verwendet wurden, sind Random-Primer, die ein Zufallsgemisch möglicher Sequenzen darstellen.

Die cDNA-Synthese aus der isolierten RNA erfolgte in dieser Arbeit mit dem iScriptTM Select cDNA Synthesis Kit von Bio-Rad den Herstellerangaben entsprechend. Bei der eingesetzten reversen Transkriptase (RT) handelt es sich um RNase H⁺ MMLV RT, ein modifiziertes Enzym aus dem *Moloney murine leukemia Virus* (MMLV) mit größerer Syntheseleistung. H⁺ steht für das Vorhandensein der RNaseaktivität des Enzyms. Die Synthese erfolgte in 0,2 mL-Reaktionsgefäßen mit dem in Tabelle 3.2 dargestellten Reaktionsansatz 90 min bei 42 °C und anschließender Deaktivierung der reversen Transkriptase für 5 min bei 85 °C.

Tabelle 3.2 – Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese

5x iScript <i>select reaction</i> Mix	4	μL
Oligo(dT) ₂₀ -Primer	2	μL
iScript reverse Transkriptase	1	μL
RNA	13	μL

3.3.4 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR nach Mullis *et al.* [154] stellt ein Standardverfahren zur Amplifizierung bestimmter DNA-Sequenzen durch den Einsatz zweier Primer (Oligonukleotide) und einer hitzestabilen DNA-Polymerase dar. Die Primer müssen komplementär zum jeweiligen 3'-Ende der zu amplifizierenden DNA sein. In Tabelle 3.3 ist der Ablauf einer PCR aufgezeigt. Zunächst wird die doppelsträngige DNA bei 95 °C aufgeschmolzen (Denaturierung), im Hybridisierungsschritt (Annealing) lagern sich die Primer an, anschließend wird der komplementäre Gegenstrang zu jedem Einzelstrang durch eine Polymerase bei 72 °C synthetisiert.

Tabelle 3.3 – PCR-Programm.

	initiale Denaturierung	95 °C	5	min
50 Zyklen	{	Denaturierung	95 °C	15 s
		Annealing	x_1 °C	30 s
		Elongation	72 °C	30 s
	finale Elongation	72 °C	10	min
	Kühlphase	4 °C	∞	

x_1 : durch qPCR optimierte Anlagerungstemperatur für jeweilige Primersequenzfolge

In Tabelle 3.4 ist der in dieser Arbeit angewandte Reaktionsansatz für eine PCR dargestellt. Folgende Inhaltsstoffe sind für eine PCR essentiell: Puffer, $MgCl_2$, dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate), Vorwärtsprimer, Rückwärtsprimer, Polymerase und DNA-*Template*. Die verwendeten Primer sind in den Tabellen 2.6 und 2.7 dargestellt.

Tabelle 3.4 – Reaktionsansatz für eine RT-PCR

iQ TM SYBR Green Supermix	12,5	μ L
RNase freies Wasser	11,375	μ L
Primer-Mix (250 nM pro Primer)	0,125	μ L
DNA-Template	1	μ L

Die Real-Time PCR stellt ein Verfahren zur Quantifizierung der mRNA-Expression dar. Sie ist insoweit eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR, da die Produktmenge mithilfe eines spezifischen oder unspezifischen Fluoreszenzfarbstoffes oder einer

Fluoreszenz-markierten Sonde in Echtzeit (*real time*) quantifiziert werden kann [155, 156]. Das Prinzip der Real-Time PCR beruht auf der Online-Detektion eines Fluoreszenzsignals, welches proportional zu der amplifizierten DNA entsteht.

In dieser Arbeit wurde der in doppelsträngige DNA-interkalierende unspezifische Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green mit den in Abschnitt 2.6 aufgelisteten Primern verwendet. Anschließend erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse zur Untersuchung der Spezifität der eingesetzten Oligonukleotide. Hintergrund der Schmelzkurvenanalyse ist eine Denaturierung der DNA durch langsame Erhöhung der Temperatur von 55 bis 95 °C. Spezifisch für eine Sequenz existiert eine Temperatur, je nach vorhandenen Wasserstoffbrückenbindungen, bei der sich aus den vorhandenen einzelsträngigen Nucleinsäuren wieder Doppelstränge bilden, woraufhin das Fluoreszenzsignal ansteigt. Die Qualität der quantitativen PCR wurde entsprechend der MIQE Empfehlungen ermittelt [149].

Die Bestimmung der relativen Genexpression der untersuchten Gene erfolgte mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode nach Pfaffl [148]. Der C_t -Wert (*cycle threshold*) beschreibt den Zyklus der Polymerasekettenreaktion, bei welchem die Fluoreszenz einen definierten Grenzwert überschreitet, der von der Software vorgegeben wurde und in der exponentiellen Amplifikationsphase liegt. Die Normalisierung der C_t -Werte erfolgte mithilfe der *Housekeeping*-Gene β -Aktin und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Hierbei wurden die „MIQE-Regeln“ [149] zugrundegelegt. Bei *Housekeeping*-Genen handelt es sich um Gene, die in den Zellen konstant exprimiert werden, unabhängig von äußeren Einflüssen. Der ΔC_t -Wert einer Probe stellt somit die Differenz zwischen den C_t -Werten der Probe und der Referenz β -Aktin und GAPDH dar. $\Delta\Delta C_t$ ist die Differenz zwischen dem ΔC_t der Probe und dem ΔC_t -Wert der unstimulierten Kontrolle. Mit der Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ kann die relative mRNA-Expression berechnet werden.

Mykoplasmen-Nachweis mittels PCR

Zum Nachweis einer Mykoplasmen-Kontamination in eukaryotischen Zelllinien wurde eine PCR durchgeführt. Die Methode wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zelllinien (DSMZ) entwickelt und basiert auf der Amplifikation des konservierten 16S rRNA-Gens von Mykoplasmen. Hierfür wurde aus Zellkultur-Überständen eine DNA-Extraktion (Abschnitt 3.3.1) durchgeführt.

Das Programm der PCR zum Mykoplasmen-Nachweis ist in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.5 – PCR-Programm zum Mykoplasmen-Nachweis.

	initiale Denaturierung	95 °C	2	min
	initiales Annealing	65 °C	1	min
	initiale Elongation	72 °C	1	min
35 Zyklen	{	Denaturierung	94 °C	15 s
		Annealing	65 °C	20 s
		Elongation	72 °C	16 s

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Methanol-Chloroform-Fällung

Um Proteine aus konditioniertem Überstand mittels Methanol-Chloroform-Fällung zu präzipitieren wurden 500 µL Überstand der nicht-stimulierten Kontrolle, der *P. gingivalis*-stimulierten differenzierten THP-1-Zellen und mit Nigericin behandelten Zellen mit 500 µL Methanol und 125 µL Chloroform versetzt, anschließend für 30 s gevortext und 5 min bei 13000 g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µL Methanol vermischt. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das präzipitierte Proteinpellet 5-10 min bei 55 °C getrocknet und in RIPA-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.4.2 Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen

Die adhärennten Zellen wurden mit 200 µL RIPA-Puffer versetzt und nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis mit einem Zellschaber abgelöst. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 14000 g. Der Überstand wurde als Proteinlysate der Zellen abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

RIPA-Puffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 % Igepal, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 0,1 % SDS

3.4.3 Herstellung nukleärer und cytoplasmatischer Proteinextrakte

Die Extraktion der Kern- und Cytosolfraction erfolgte adaptiert nach Schreiber *et al.* [157] und Frede *et al.* [158]. Hierfür wurden die Zellen mit 1 mL kaltem (4 °C) PBS

gewaschen und in 2 mL PBS mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellsuspension wurde in einem 2 mL-Reaktionsgefäß für 5 min bei 1500 g bei Raumtemperatur abzentrifugiert und das Pellet anschließend in 200 µL Puffer A resuspendiert. Es erfolgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis. Die Zellysate wurden daraufhin 5 min bei 1500 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand stellt die Cytosolfraktion dar und wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Das Pellet wurde mit 80 µL Puffer B überschichtet und mithilfe von Mini-Rührfischen 20 min auf Eis auf einem Magnetrührer homogenisiert. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation für 10 min und 14000 g bei 4 °C. Der Überstand stellt die Kernfraktion dar und wurde ebenfalls bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Puffer A = Cytosolextraktionspuffer: 10 mM HEPES, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,4 % Igepal/NP-40, 10 mM NaF, 1 mM Na₃OV₄, 10 mM β-Glycerolphosphat, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT, 1x Proteinaseinhibitoren, pH mit 1 M NaOH auf 7,9 eingestellt

Puffer B = Kernextraktionspuffer: 20 mM HEPES, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM Na₃OV₄, 10 mM β-Glycerolphosphat, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT, 1x Proteinaseinhibitoren, pH mit 1 M NaOH auf 7,9 eingestellt

3.4.4 Quantifizierung des Proteingehalts

Die Quantifizierung des Proteingehalts erfolgte in dieser Arbeit durch den Bradford- und den BCA-Test, die mithilfe eines Kits im Mikrotiterplattenmaßstab durchgeführt wurden.

Der **BCA-Test** beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der zweiwertige Kupfer-Ionen in Anwesenheit von Peptidbindungen als Reduktionsmittel im alkalischen Milieu zu einwertigen Kupfer-Ionen reagieren, die mit dem Natrium-Salz des BCA (Bicinchoninsäure) einen violetten Komplex bilden. Die Absorptionseigenschaften der gebildeten violetten Chelatkomplexe sind proportional zu dem in der Probe enthaltenen Proteingehalt. Das Absorptionsmaximum liegt bei 562 nm.

Der **Bradford-Test** beruht auf dem Einsatz eines Coomassie-Farbstoffes (Coomassie Brilliant Blue G-250), an den in saurem Milieu vor allem basische und aromatische Proteine binden. Das Resultat der Bindung ist eine Farbänderung der kationischen rot-braunen Form (Absorptionsmaximum: 465 nm) zu einem anionischen blauen Zustand (Absorptionsmaximum: 610 nm) [159]. Die Messung der Absorption erfolgt bei 595 nm [160].

Die Erstellung einer Standardreihe erfolgte sowohl für den Bradford-, als auch für den BCA-Test mithilfe von Verdünnungen einer Lösung aus bovinem Serumalbumin (BSA).

Eingesetzt wurden Konzentrationen von 0 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1 mg/mL, 1,25 mg/mL und 1,5 mg/mL. 10 μ L (Bradford) bzw. 25 μ L (BCA) der BSA-Verdünnungen und zu untersuchenden Proben wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Zu allen Vertiefungen wurde anschließend 200 μ L Bradford-Reagenz (1 Teil Biorad-Reagenz + 4 Teile Aqua dest.) bzw. BCA-Reagenz (50 Teile Reagenz A + 1 Teil Reagenz B) gegeben. Wurde der BCA-Test durchgeführt, so erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C. Der Bradford-Test inkubierte 5 min bei Raumtemperatur. Darauffolgend wurde die Mikrotiterplatte im Plattenlesegerät (Mikroplatten-Reader EpochTM) bei 570 nm vermessen. Mithilfe der Messwerte der BSA-Verdünnungen konnte eine Standardreihe erstellt werden, anhand derer die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt wurden.

3.4.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird eingesetzt, um Proteine zu charakterisieren. Aufgrund von unterschiedlichen Ladungen der Aminosäuren haben Proteine verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten in einem elektrischen Feld. Als Gelmaterial wurde in dieser Arbeit Polyacrylamid verwendet. Polyacrylamid besteht aus den Monomeren Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid sowie aus TEMED (Tetramethyldiamin) und APS (Ammoniumperoxodisulfat). Eine radikalische Reaktion mit APS als Radikalstarter sorgt für die Vernetzung zu einem Polymer. Der Grad der Vernetzung ist von der Acrylamidkonzentration abhängig.

In dieser Arbeit wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, bei der zu den Proteinproben SDS (Natriumdodecylsulfat) gegeben wird, so dass die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen zerstört werden. Die Anlagerung von SDS-Molekülen an Proteine führt zu einer Maskierung der Proteinladung, so dass alle Proteine die selbe Nettoladung tragen. Durch die Denaturierung liegt bei allen Proteinen das gleiche Masse/Ladungs-Verhältnis vor, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit im Polyacrylamidgel nicht mehr von den Ladungen der einzelnen Aminosäuren abhängig ist, sondern nur noch von der Größe der Proteine [161].

Die verwendete SDS-PAGE besteht aus einem Trenn- und einem Sammelgel (diskontinuierlich). Die Acrylamidkonzentration des Sammelgels beträgt 5 %, der pH-Wert beträgt 6,8. Im Trenngel liegt, je nach zu detektierendem Protein, eine entsprechende Acrylamidkonzentration vor und ein pH-Wert von 8,8. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes erfolgt zunächst eine Fokussierung der Proteine im Sammelgel und eine anschließende Auftrennung nach dem Molekulargewicht im Trenngel. Die Fokussierung im Sammelgel lässt sich durch den pH-Wert in diesem erklären. Bei einem pH von 6,8 liegt das Glycin des Puffers

als Zwitterion vor, aus diesem Grund hat es eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit als das negativ geladene Chlorid aus dem Sammelgelpuffer. Zwischen den Lauffronten des Leitons Chlorid und des Folgeions Glycin bilden sich „Proteinstapel“ aus, die die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit im Gel aufweisen. Im Trenngel liegt ein höherer pH-Wert vor (8,8), so dass Glycin nun negativ geladen vorliegt und sich die Mobilität erhöht und eine Auftrennung der Proteinprobe erfolgt.

Tabelle 3.6 – Zusammensetzung der 10 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gele (1 Gel) (modifiziert nach [162])

Komponenten	Trenngel (10 %)	Sammelgel (5 %)
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 mL	
0,5 M Tris (pH 6,8)		0,5 mL
Acrylamid-Mix (40 %)	2,5 mL	0,25 mL
10 %-ige SDS-Lösung	100 μ L	20 μ L
H ₂ O _{reinst}	ad 10 mL	ad 2 mL
APS (10 %)	100 μ L	20 μ L
TEMED	4 μ L	2 μ L

In Tabelle 3.6 ist die Zusammensetzung der SDS-Gele dargestellt. Auf das zuerst gegossene Trenngel wurde das Sammelgel gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Die Proteinproben wurden 1:4 mit 4x Laemmli-Puffer versetzt und nach 5-minütigem Erhitzen bei 95 °C auf das Gel aufgetragen. Außerdem wurde ein Marker als Größenstandard (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ 161-0375) aufgetragen. In einer Elektrophoresekammer wurde zunächst eine Spannung von 70 V und nach Erreichen des Trenngels eine Spannung von 120 V angelegt.

10x Laufpuffer: 250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 1 % SDS, pH 8,3

3.4.6 *Semidry*-Western-Blot

Das Prinzip des Western-Blots ist der Transfer und die Immobilisierung von Proteinen von einem SDS-Gel auf eine Membran mit anschließender Detektion bestimmter Proteine mithilfe von Primär- und Konjugat-gekoppelten Antikörpern, indem eine enzymatische Reaktion nach Substratzugabe sichtbar gemacht werden kann [163].

Transfer

Der Transfer der Proteine erfolgte auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen. Hierfür wurden die Membranen 30 s in Methanol aktiviert, 5 min in Aqua dest. und daraufhin in Transferpuffer äquilibriert. Die SDS-Gele sowie die Filterpapiere (Whatman-Papier) wurden ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Das SDS-Gel und die Membran wurden luftblasenfrei aufeinandergelegt und zwischen jeweils zwei Whatman-Filter gebettet. Der Transfer erfolgte in einer *Semidry*-Blot Apparatur bei 15 V für 1 h.

Transfer-Puffer: 25 mM Tris, pH 8,5, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol

Immunologische Detektion

Nachdem der Transfer abgeschlossen war, wurden die PVDF-Membranen für 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer (5 % BSA in TBST) blockiert, um unspezifische Bindungen der eingesetzten Antikörper zu verringern. Nach der Absättigung und dreimaligem Waschen der Membran mit TBST-Puffer wurde der eingesetzte Primärantikörper (Tabelle 2.4) in Blockierungspuffer verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf der Membran inkubiert. Nach der Inkubation des Primärantikörpers wurde die Membran dreimal mit TBST-Puffer gewaschen. Daraufhin erfolgte die Zugabe des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers in einer Verdünnung von 1:1000 in Blockierungspuffer. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut mit TBST-Puffer gewaschen. Die Sichtbarmachung des Immunkomplexes erfolgte anhand einer enzymkatalysierten Chemilumineszenzreaktion. Hierfür wurde das eingesetzte Reagenz 5 min auf die Blotmembran gegeben und im Dunklen inkubiert. Die Aufnahme des Chemilumineszenzsignals erfolgte mithilfe eines Detektionssystems (ChemiDoc XRS).

TBST-Puffer: TBS + 0,1 % (v/v) Tween-20

Quantitative Auswertung

Die densitometrische Auswertung der Western-Blots erfolgte mithilfe der ImageJ-Software [164]. Hierfür wurde das Blot-Bild als .tif-Datei über „Image - Type - 8 bit“ auf 8-bit Graustufe gesetzt. Über das „Rectangle Tool“ und der Option „Analyze - Gels - Select First Lane“ wurde die erste Bande markiert. Indem das Rechteck zu der nächsten Bande verschoben und mit der Option „Analyze - Gels - Select Next Lane“ markiert wurde, konnte gewährleistet werden, dass die Fläche des Rechteckes für alle Banden gleich ist. Nachdem alle Banden markiert waren, wurde mithilfe der Option „Analyze - Gels - Plot Lanes“ ein Plot aller Banden erstellt. Anschließend wurde das „Straight Line Tool“ verwendet,

um die Fläche unter dem Peak zu markieren. Mit dem „Magic Wand Tool“ konnten daraufhin die Flächeninhalte für jeden Peak ermittelt werden. Um relative Vergleiche der Intensitäten der Banden zu erhalten und eine Aussage über die relative Menge des geladenen Proteins zu machen, wurde der Quotient aus den Flächeninhalten der Banden zu der Standard-Bande gebildet. Die Normalisierung der Daten erfolgte, indem eine Ladekontrolle verwendet wurde. Bevor ein relativer Vergleich der Banden vorgenommen wurde, sind die Flächeninhalte des Zielproteins durch die Peakwerte der Ladekontrolle dividiert worden.

„Strippen“ der Immunoblotmembran

Strippen der Blotmembran steht für das Entfernen der Primär- und Sekundärantikörper von der PVDF-Membran. Bei dem in dieser Arbeit angewendeten Verfahren wird ein niedriger pH (2,2) verwendet, um die Antikörper von der Membran zu lösen [165].

Hierfür wurden die Membranen zweimal für 10 min in Stripping-Puffer inkubiert und anschließend dreimal 5 min mit TBST-Puffer gewaschen. Das anschließende Vorgehen entspricht dem zuvor beschriebenen mit Blockierung und über-Nacht-Inkubation des Primärantikörpers.

Stripping-Puffer: 0,1 M Glycin-HCl, 20 mM Magnesiumacetat, 50 mM KCl, pH 2,2

3.4.7 Enzymatischer Nachweis von MMPs mittels Zymographie

Die Zymographie beschreibt eine Substratgelelektrophorese, bei der Enzyme in einem SDS-Gel mit Substrat-Zusatz elektrophoretisch aufgetrennt werden. In dieser Arbeit wurde dem Gel Gelatine als Substrat zugesetzt, an dessen Aminogruppe der Farbstoff Coomassie Blue R-250 bindet und eine Blaufärbung des Gels hervorruft. Wird Gelatine durch Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) enzymatisch degradiert, so wird eine entfärbte Bande sichtbar [166].

Es wurde ein 10 %-iges Trenngel mit einem Anteil von 0,2 % (w/v) Gelatine hergestellt und im Gießstand mit Aqua dest. überschichtet. Nach der Polymerisierung wurde das 5 %-ige Sammelgel darüber gegeben. Die zu untersuchenden Überstände wurden 1:4 mit 4x Laemmli-Puffer ohne β -Mercaptoethanol versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Gegensatz zu der in Abschnitt 3.4.5 beschriebenen Durchführung einer üblichen SDS-PAGE werden die Proben bei einer Zymographie nicht aufgeköcht, um die Enzymaktivität zu erhalten. Die Elektrophorese erfolgte wie zuvor beschrieben (Abschnitt 3.4.5), die Apparatur wurde zusätzlich auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Gele

zweimal 30 min in Reaktivierungslösung bei Raumtemperatur inkubiert, so dass die nachzuweisenden Enzyme renaturieren und das SDS aus dem Gel entfernt wurde. Danach wurde das Gel für 72 h bei 37 °C in mehrmals gewechseltem Proteolyse-Puffer inkubiert. Daraufhin wurde das Substratgel in Aqua dest. gewaschen und 30 min in Fixierungslösung äquilibriert. Nach der Fixierung erfolgte die Färbung mit Coomassie Blue R-250 (0,5 % (w/v)) in Fixierungs/Entfärbe-Lösung für 30 min. Die Entfärbung des Gels und das Sichtbarmachen der Banden erfolgte für 2-5 h in Fixierungs/Entfärbe-Lösung.

Reaktivierungslösung: 2,5 % (v/v) Triton X-100 in Aqua dest.

Proteolysepuffer: 0,05 M Tris-HCl (pH 7,6), 0,2 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 0,02 % Brij-35

Fixierungs/Entfärbe-Lösung: 5:4:1 Methanol: Wasser: Eisessig

3.4.8 ELISA zur Quantifizierung von TGF- β 1, IL-1 β und VEGF

Mit einem Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) lassen sich Proteine quantitativ bestimmen. Der Effekt von *P. gingivalis* auf die Protein-Konzentrationen von TGF- β 1 und VEGF im Überstand der OKF6/hTERT-1 Zellen und von IL-1 β im Überstand von THP-1-Makrophagen wurde mithilfe eines ELISA untersucht. Die Durchführung erfolgte den Herstellerangaben entsprechend, indem die Mikrotiterplatten zunächst mit dem *Capture*-Antikörper über Nacht versehen wurden. Nach mehrmaligem Waschen mit Waschpuffer wurde die 96-well-Platte 1 h mit *Reagent Diluent* blockiert. Zum Nachweis der TGF- β 1-, IL-1 β - und VEGF-Konzentration wurde ein Standard bis 2000 pg/mL eingesetzt. Die Überstände wurden unverdünnt in einem Volumen von 100 μ L verwendet. Nach zweistündiger Inkubation wurde der *Detection*-Antikörper sowie Streptavidin-HRP in einer Verdünnung von 1:200 in *Reagent Diluent* zugesetzt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe der Substrat- und anschließend der Stop-Lösung wurde die Mikrotiterplatte bei 450 nm mit einer Korrekturwellenlänge von 570 nm vermessen. Anhand der erhaltenen Werte für den im Immunoassay mitgelieferten Standard konnte eine Standardkurve erstellt und die Konzentrationen in den Zellkulturüberständen bestimmt werden.

Waschpuffer: 0,05 % Tween-20 in PBS, pH 7,2-7,4

Reagent Diluent: VEGF und IL-1 β : 1 % in PBS, pH 7,2-7,4 - TGF- β 1: 1,4 mL *Reagent Diluent* Konzentrat 1 in 0,05 % Tween-20 in PBS, pH 7,2-7,4

Stop-Lösung: 2 N Schwefelsäure (H₂SO₄)

3.5 Funktionale Analysen

3.5.1 Protein-Array

Die Phosphorylierung und Proteolyse intrazellulärer Proteine kann mithilfe eines Protein-Arrays nachgewiesen werden. Hierfür wurde ein Antikörper-Array verwendet, bei dem spezifische Antikörper auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert wurden. Nach Zugabe des Zellysates und anschließender Detektion über einen Biotin-gekoppelten Antikörper mittels Chemilumineszenz kann die Menge des phosphorylierten bzw. gespaltenen Proteins analysiert werden.

Es wurden das PathScan Intracellular Signaling Array Kit und PathScan Cancer Phenotype Antibody Array Kit (Cell Signaling) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Zellysate der *P. gingivalis*-infizierten (MOI 100) bzw. nicht-stimulierten Zellen wurden mit dem im Kit enthaltenen Lyse-Puffer mit zugegebenem Protease-Inhibitor generiert. Die Membranen wurden nach Blockierung über Nacht bei 4 °C mit 75 µL Zellysat in einer Proteinkonzentration von 1 mg/mL auf einem Schüttler inkubiert. Dadurch konnten die phosphorylierten bzw. gespaltenen Proteine in der Probe an die immobilisierten Antikörper binden. Nach mehrmaligem Waschen folgte die Inkubation mit einem biotinyliertem Antikörper, welcher an die gebundenen Proteine auf der Membran binden kann. Nach weiterem Waschen folgte die Zugabe von HRP-gekoppeltem Streptavidin, welches als Substrat für Biotin dient. Der Gehalt der posttranslational modifizierten Proteine wurde mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Die relativen Intensitäten wurden mithilfe der Positivkontrolle im Programm ImageJ analog zu der Auswertung des Western-Blots bestimmt (Abschnitt 3.4.6). Abbildung A.1 zeigt einen exemplarischen Protein-Array mit den in dieser Arbeit nachgewiesenen Phosphorylierungen bzw. Spaltungen von bestimmten Signalmolekülen.

3.5.2 Migrations-/Matrigel-Invasions-Assay

Matrigel bezeichnet ein lösliches Basalmembran-Präparat, welches aus der murinen Sarkom-Zelllinie *Engelbreth-Holm-Swarm* (EHS) extrahiert wurde und in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix tierischer Zellen ähnelt: es enthält hauptsächlich Laminin, Kollagen IV, Heparansulfat-Proteoglykane, Entaktin und Nidogen.

Der Matrigel-Invasions-Assay dient zur Untersuchung der Invasivität von Zellen, indem die Fähigkeit der Zellen zur Adhäsion und Invasion an die generierte Matrix evaluiert wird.

Hierfür wurden spezielle Kammern genutzt, die im unteren Kompartiment mit FKS-haltigem (10%) DMEM-Medium befüllt wurden. Die Kammer enthält einen Einsatz mit einer Polycarbonat-Membran (Porengröße von 8 μm). Auf die Membran wurden 100 μL Matrigel, welches über Nacht aufgetaut wurde, in einer Konzentration von 1,1 mg/mL geschichtet und für 1-2 Tage lufttrocknen lassen. Darauffolgend wurde das Matrigel rehydriert, indem 200 μL DMEM-Medium für 2 h bei 37 °C zugegeben wurde. Nach Abnahme des Mediums wurden 10^5 Zellen/mL in KGM2-Medium mit 0,1 % BSA zugegeben und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Die invadierten Zellen wurden mit Methanol für 15 min fixiert und anschließend mit Kristallviolett (0,2 % in 2 % Ethanol) für weitere 15 min angefärbt. Nach mehrmaligem Waschen wurde die Membran herausgetrennt und bei 100-facher Vergrößerung dokumentiert.

Der Migrations-Nachweis erfolgte analog zu dem Matrigel-Assay, mit dem Unterschied, dass auf die Polycarbonat-Membran kein Matrigel geschichtet wurde, so dass die Zellen das Basalmembran-Präparat nicht degradieren müssen, sondern lediglich die Migration aufgrund der Chemoattraktion durch fetales Kälberserum gemessen wird.

3.6 Statistische Auswertung

Alle Daten, die bei den Messungen erhoben wurden, sind als Mittelwert + Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M.) von n unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Überprüfung der Signifikanz erfolgte mithilfe des Programms „GraphPad Prism“ und dem „One Way ANOVA“-Test. Signifikante Unterschiede wurden durch den Dunnett Multiple Comparisons Test (Vergleich mit der Kontrolle) und dem Tukey-Test ermittelt. Von einer statistischen Signifikanz wurde bei einem Wert von $p < 0,05$ ausgegangen.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von *P. gingivalis* auf eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) in OKF6/hTERT-1-Zellen

4.1.1 Modulation des Phänotyps durch *P. gingivalis*

Epithelzellen zeichnen sich durch ihre „kopfsteinpflasterartige“ Morphologie aus. Im Laufe der epithelial-mesenchymalen Transition entwickeln die Zellen einen fibroblastären Phänotyp. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Effekt von *P. gingivalis* auf den Phänotyp der verwendeten gingivalen Epithelzellen (OKF6/hTERT-1) untersucht. Nach einer drei- und fünftägigen Inkubation mit dem parodontopathogenen Bakterium (MOI 100) konnten morphologische Veränderungen beobachtet werden (Abbildung 4.1). Zu erkennen war, dass die Stimulation mit *P. gingivalis* sowohl nach drei als auch nach fünf Tagen zu einem Verlust der Zell-Zell-Kontakte führte, da sich die Zellen voneinander lösten und einen spindelförmigen Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp annahmen, wohingegen die Zellen der nicht-stimulierten Kontrolle einen dichten Zellverband aufwiesen. Außerdem konnte beobachtet werden, dass sowohl mit einem Bakterien-Zell-Verhältnis von 100:1 als auch von 10:1 eine Veränderung der morphologischen Eigenschaften der Zellen eintrat (Abbildung 4.1), so dass in Folgeversuchen hauptsächlich mit einem Verhältnis von 10:1 und 100:1 und einer Infektionsdauer von drei bzw. fünf Tagen gearbeitet wurde.

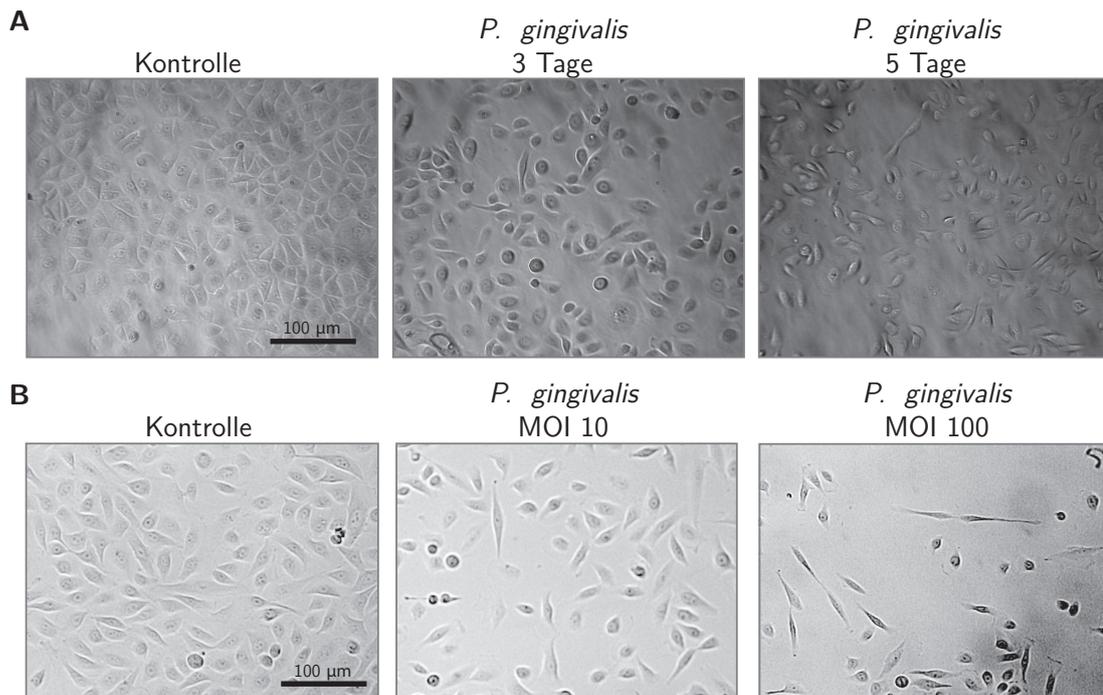


Abbildung 4.1 – *P. gingivalis* verändert den Phänotyp der OKF6/hTERT-1-Zellen sowohl Zeit-abhängig nach drei- und fünftägiger Stimulation (MOI 100, (A)), als auch Dosis-abhängig mit einer MOI von 10 und 100 (B). Die Aufnahmen sind repräsentativ für drei weitere Versuchsdurchführungen.

4.1.2 Veränderung des Cytoskeletts durch *P. gingivalis*

Die Veränderung der Zellmorphologie durch *P. gingivalis* lässt erste Hinweise auf eine epithelial-mesenchymale Transition zu. Ein weiteres wichtiges Merkmal, das bei einer epithelial-mesenchymalen Transition Ausprägung erfährt, ist eine Umstrukturierung des Cytoskeletts. Eine Migration der Zellen, die unter anderem bei der Metastasierung von Tumoren und entzündlichen Krankheiten eine Rolle spielt, beginnt, indem F-Aktinreiche Ausstülpungen durch das Einleiten der Aktinpolymerisation gebildet werden. Die OKF6/hTERT-1-Zellen wurden hierfür auf 8-Kammer-Objektträgern ausgesät und mit *P. gingivalis* (MOI 100) für drei Tage stimuliert. Nach einer Fixierung mit Paraformaldehyd wurde das Aktin-Cytoskelett mit Phalloidin CruzFluor-488 angefärbt, so dass ein fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von filamentösem Aktin (F-Aktin) erfolgen konnte. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass *P. gingivalis* die Organisation des Aktin-Cytoskeletts deutlich veränderte, indem eine Aktinfilamentnukleation eintrat, welche als Mikrospike-ähnliche Ausstülpungen (Protrusionen) in Erscheinung trat. Zusätzlich war eine Verschiebung des Aktins in die Zell-Peripherie zu erkennen, so dass sich eine kortikale „Hülle“ um die OKF6/hTERT-1-Zellen bildete (Abbildung 4.2).

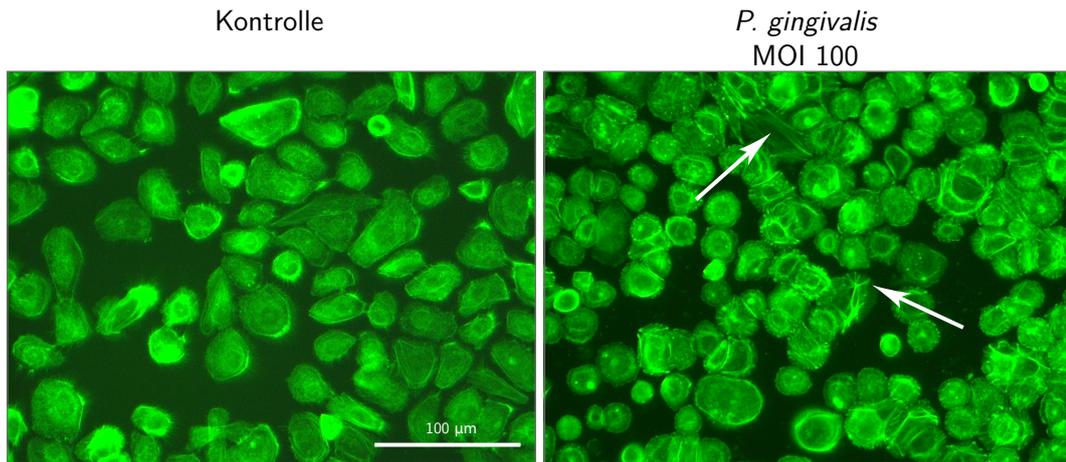


Abbildung 4.2 – Das Aktin-Cytoskelett wird durch *P. gingivalis* umstrukturiert. Nach dreitägiger Stimulation mit *P. gingivalis* ATCC 33277 (MOI 100) ist eine Veränderung des Cytoskeletts sichtbar. Die Aufnahmen sind repräsentativ für drei weitere Versuchsdurchführungen. Die Pfeile zeigen auf die F-Aktin-Ausstülpungen.

4.1.3 Cadherin-Switch durch *P. gingivalis*

Der Verlust der Zell-Zell-Kontakte ist ein wichtiger Bestandteil der EMT und ein essentieller Prozess während der Tumorgenese. Zusätzlich zu dem Verlust des epithelialen Markers E-Cadherin tritt bei der EMT eine verstärkte Bildung des mesenchymalen Markers N-Cadherin auf, was zu einem insgesamt invasiveren und motileren Phänotyp führt und als Cadherin-Switch bezeichnet wird. Aufgrund der zellmorphologischen Veränderung zu einem spindelzellförmigen Phänotyp lässt sich vermuten, dass es eine Veränderung der Zell-Zell-Kontakte zu geben scheint. Weiterhin konnte eine Umstrukturierung des Aktin-Cytoskeletts beobachtet werden, was Schlüsse auf eine Veränderung von E-Cadherin zulässt, da E-Cadherin mit dem Aktin-Cytoskelett verbunden ist. Zum Nachweis der Transformation der Zellen wurde für fünf Tage mit *P. gingivalis* (MOI 10 und 100) stimuliert und das Zellysate geerntet, so dass mittels Western-Blot E-Cadherin und N-Cadherin chemilumineszent nachgewiesen werden konnten. Auffällig ist, dass mittels densitometrischer Auswertung eine signifikante Reduzierung des Transmembranproteins E-Cadherin um den Faktor 1,45 (MOI 1), 8,33 (MOI 10) und 5,56 (MOI 100) zu beobachten war, wohingegen die Bildung von N-Cadherin um den Faktor 1,97 (MOI 10) und 2,51 (MOI 100) zunahm (Abbildung 4.3).

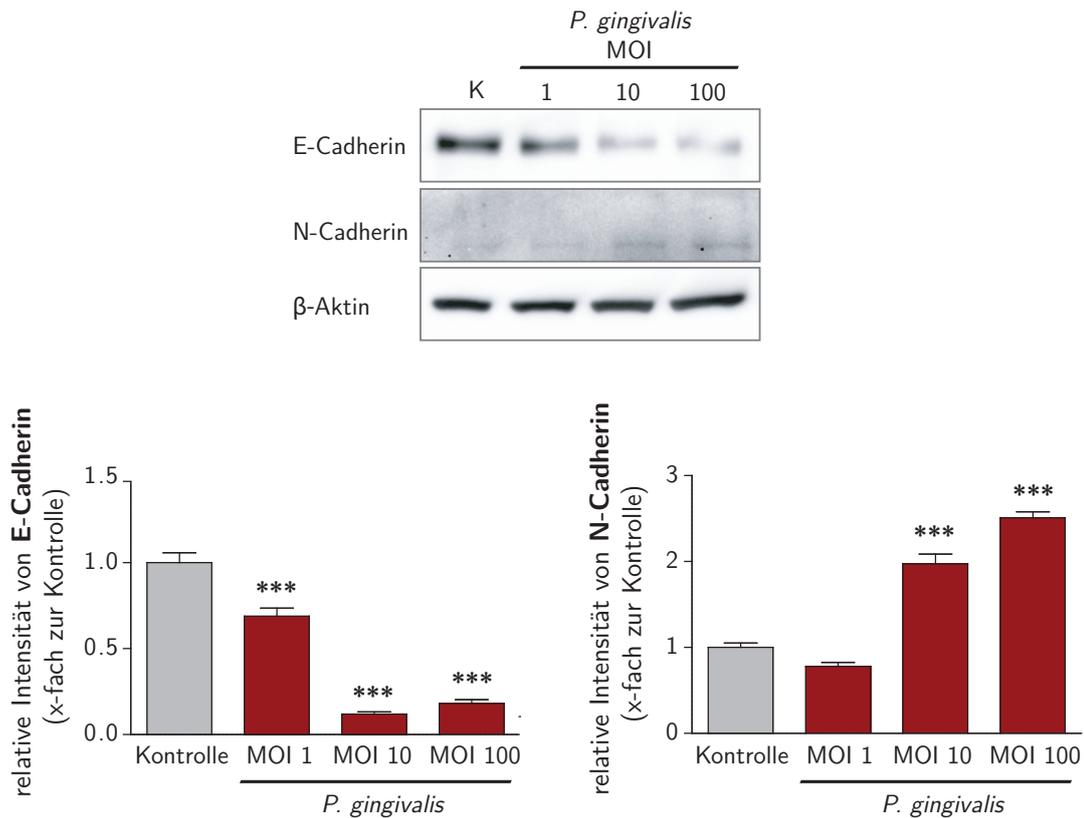


Abbildung 4.3 – Cadherin-Switch durch Reduktion von E-Cadherin und Zunahme von N-Cadherin durch *P. gingivalis*. Western-Blot-Analyse und densitometrische Auswertung von Zelllysaten von OKF6/hTERT-1 Zellen, die für fünf Tage in Anwesenheit von *P. gingivalis* kultiviert wurden. Als Referenzprotein wurde β -Aktin verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte + S.E.M. aus $n = 3$ Versuchen. Die dargestellten Blots sind repräsentativ für zwei weitere Versuchsdurchführungen.

4.1.4 Veränderung des β -Catenin-Gehaltes und dessen Verteilung innerhalb der Zelle durch *P. gingivalis*

β -Catenin ist Bestandteil des Proteinkomplexes, der Cadherine mit dem Aktin-Cytoskelett verbindet. Als Folge der Reduzierung von E-Cadherin liegt das sonst intrazellulär gebundene β -Catenin frei vor. Entweder es wird von aktivem GSK3- β phosphoryliert und somit zum proteasomalen Abbau vorbereitet oder es erfolgt eine Translokation in den Zellkern. Um herauszufinden, ob ein Abbau von β -Catenin erfolgt, wurde der Proteingehalt in der Zelle mittels Western-Blot gemessen. Nach 5-tägiger Stimulation mit *P. gingivalis* (MOI 1 und 10) gab es keine Veränderung im Gesamtproteingehalt von β -Catenin, wohingegen mit einer MOI 100 vermehrt (1,35-fach) β -Catenin in der Zelle vorlag (Abbildung 4.4). In Tumorzellen konnte bereits gezeigt werden, dass ein Verlust von E-Cadherin zu einer

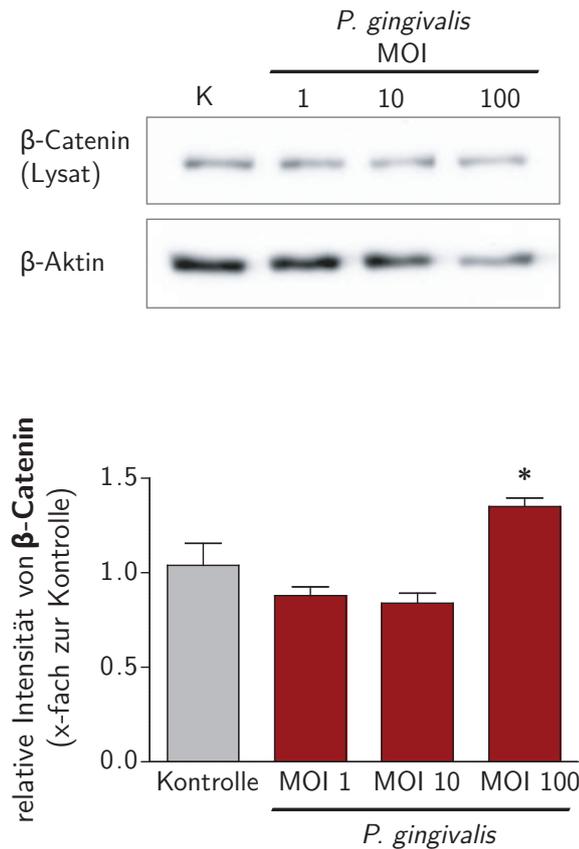


Abbildung 4.4 – Der Proteingehalt von β -Catenin wird nach Stimulation mit *P. gingivalis* erhöht. Western-Blot-Analyse und densitometrische Auswertung von β -Catenin im Zellysate von OKF6/hTERT-1 Zellen, die für fünf Tage in Anwesenheit von *P. gingivalis* kultiviert wurden. Als Referenzprotein wurde β -Aktin verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte + S.E.M. aus $n = 3$ Versuchen. Die dargestellten Blots sind repräsentativ für zwei weitere Versuchsdurchführungen.

Translokation von β -Catenin in den Zellkern führt. Aus diesem Grund wurde untersucht, inwiefern die Reduzierung von E-Cadherin in OKF6/hTERT-1 Zellen nach Stimulation mit *P. gingivalis* zu einer Translokation von β -Catenin führt. Indem eine Zellfraktionierung durchgeführt wurde, konnte die Expression von β -Catenin im Zellkern und im Cytosol bestimmt werden. Der β -Catenin-Gehalt hat im Cytosol nach fünftägiger Infektion mit *P. gingivalis* abgenommen, wohingegen er im Zellkern nach Stimulation mit *P. gingivalis* zunahm (Abbildung 4.5). Die densitometrische Auswertung ergab, dass es im Cytosol eine Abnahme von β -Catenin um 90 % gab, wenn die Zellen mit *P. gingivalis* infiziert wurden, wohingegen im Zellkern eine Zunahme um den Faktor 1,75 (MOI 10) bzw. 1,49 (MOI 100) detektiert wurde.

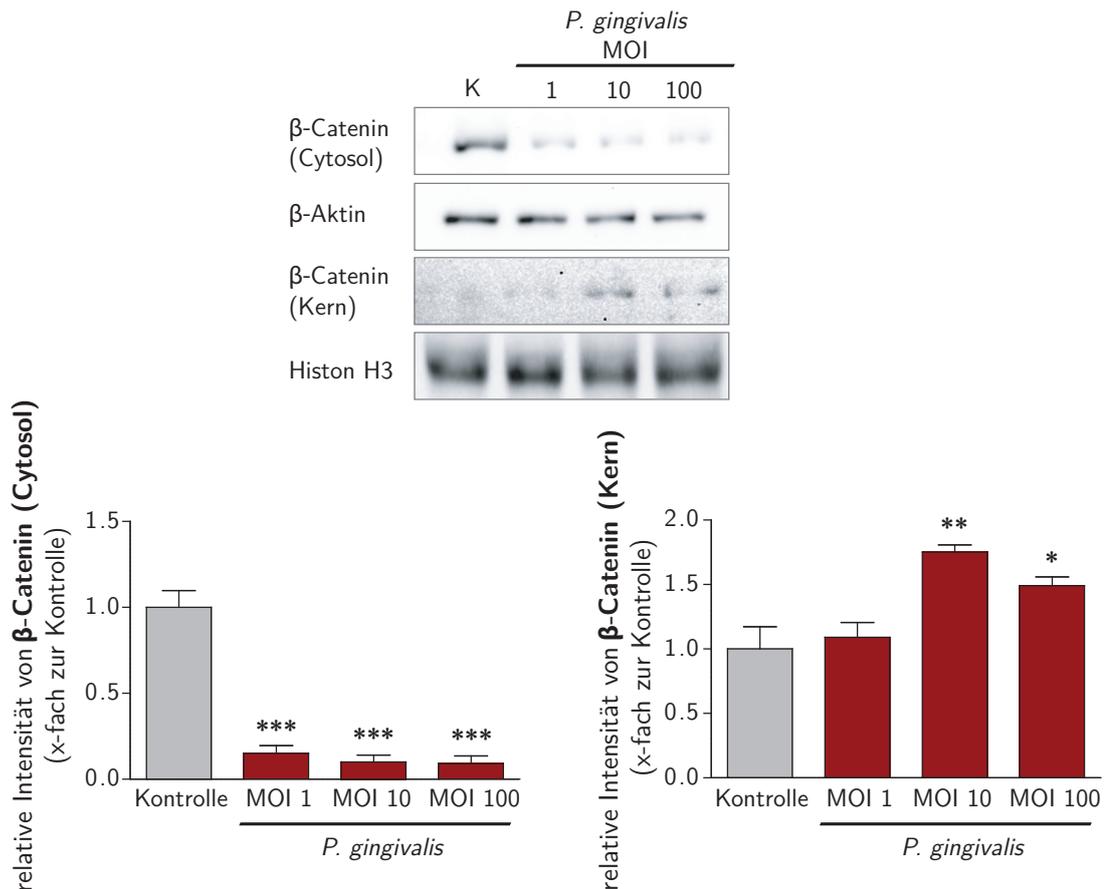


Abbildung 4.5 – *P. gingivalis* verändert die Lokalisation von β -Catenin innerhalb der Zelle. Western-Blot-Analyse und densitometrische Auswertung von β -Catenin in Zellkern und Cytosol von OKF6/hTERT-1-Zellen, die für fünf Tage in Anwesenheit von *P. gingivalis* ATCC 33277 kultiviert wurden. Als Referenzprotein für die Cytosolfraction wurde β -Aktin verwendet, für den Zellkern wurde Histon H3 als Ladekontrolle eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte + S.E.M. aus $n = 3$ Versuchen. Die dargestellten Blots sind repräsentativ für zwei weitere Versuchsdurchführungen.

4.1.5 *P. gingivalis* verändert den Snail-Gehalt im Zellkern

Neben den Cadherinen und β -Catenin wurde außerdem der Transkriptionsfaktor Snail untersucht, da er als weiterer essentieller Faktor der EMT beschrieben wird. Weiterhin werden Snail und β -Catenin durch GSK3- β reguliert, so dass aufgrund des Effektes von *P. gingivalis* auf β -Catenin auch von einem Effekt auf Snail ausgegangen wurde. Mittels Real-Time PCR konnte beobachtet werden, dass die mRNA-Expression von SNAI1 nach 24-stündiger Infektion mit *P. gingivalis* um das 3,64- bzw. 6,35-fache (MOI 10 und MOI 100) signifikant hochreguliert wurde (Abbildung 4.6 (A)). Der Proteingehalt von Snail im Zellkern wurde mittels Zellfraktionierung untersucht.

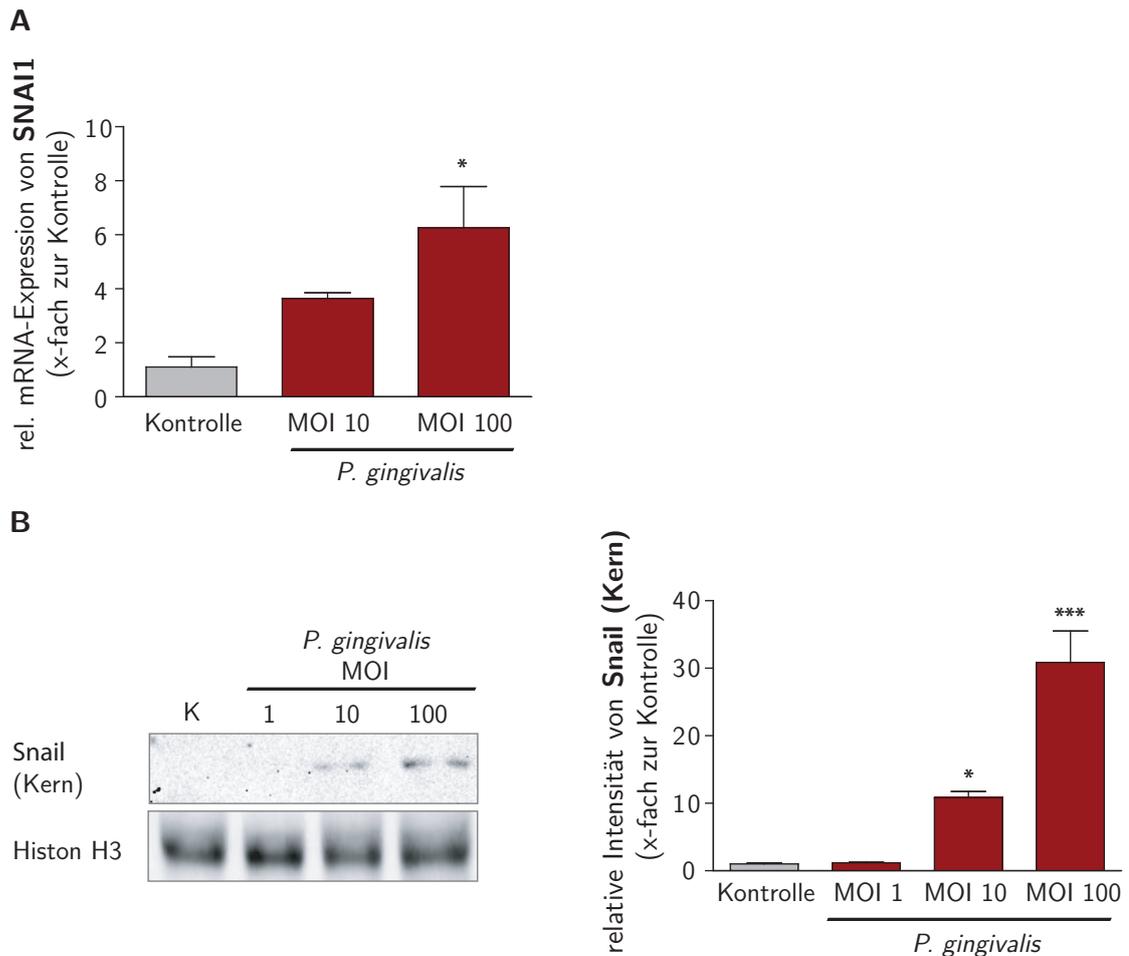


Abbildung 4.6 – Die Genexpression des Transkriptionsfaktors Snail sowie dessen Vorkommen im Zellkern wird als Antwort auf *P. gingivalis* erhöht. Western-Blot-Analyse, densitometrische Auswertung und mRNA-Expression von Snail im Zellkern von OKF6/hTERT-1-Zellen, die für fünf Tage (Western-Blot) bzw. 24 h (RT-PCR) in Anwesenheit von *P. gingivalis* kultiviert wurden. **(A)** Relative mRNA-Expression von SNAI1 nach Stimulation mit *P. gingivalis* (MOI 10 und 100). Die Werte wurden mit den *Housekeeping*-Genen β -Aktin und GAPDH normalisiert und auf die nicht-stimulierte Kontrolle bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte + S.E.M. aus $n = 6$ Experimenten. **(B)** Western-Blot-Analyse und densitometrische Auswertung von Snail im Zellkern nach fünftägiger Stimulation mit *P. gingivalis* (MOI 1, 10 und 100). Als Referenzprotein für den Zellkern wurde Histon H3 eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte + S.E.M. aus $n = 3$ Versuchen. Die dargestellten Blots sind repräsentativ für zwei weitere Versuchsdurchführungen.

Nach Isolierung der Kerne erfolgte eine Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot und der chemilumineszenten Detektion von Snail. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur eine Erhöhung der mRNA-Expression durch *P. gingivalis* erfolgte, sondern auch vermehrt Snail im Zellkern zu detektieren war. Die densitometrische

Auswertung ergab, dass Snail bei einer MOI 100 über 30-fach vermehrt vorhanden war im Vergleich zu der nicht-stimulierten Kontrolle (Abbildung 4.6 (B)).

4.1.6 Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) und folgender Inhibierung von GSK3- β durch *P. gingivalis*

Es ist bereits bekannt, dass die Serin/Threonin-Kinase GSK3- β im aktiven Zustand β -Catenin und nukleäres Snail phosphoryliert und dadurch eine Degradation einleitet. Für Snail wurde beschrieben, dass eine Phosphorylierung durch GSK3- β zu einer Lokalisation ins Cytoplasma führt. Da in dieser Arbeit beobachtet werden konnte, dass sowohl Snail als auch β -Catenin im Zellkern vorzufinden waren, wurde weiterhin untersucht, ob GSK3- β nach Stimulation mit *P. gingivalis* im phosphorylierten bzw. inaktiven Zustand vorliegt. Anhand der Serin-9-Phosphorylierung kann überprüft werden, ob die Kinase inaktiviert ist. Hierfür wurde ein Protein-Array durchgeführt, bei dem der Phosphorylierungszustand chemilumineszent detektierbar ist. Bereits nach einer einstündigen Inkubation der immortalisierten Epithelzellen konnte eine signifikant erhöhte Phosphorylierung von GSK3- β an Serin-9 detektiert werden. Die Phosphorylierung erfolgt durch die Proteinkinase B/ Akt. In weiteren Phosphorylierungs-Analysen zeigte sich, dass Akt verstärkt durch *P. gingivalis* phosphoryliert wurde (an den Stellen Thr308 und Ser473), was in diesem Falle zu einer Aktivierung der Kinase führt, die daraufhin GSK3- β inaktiviert (Abbildung 4.7).

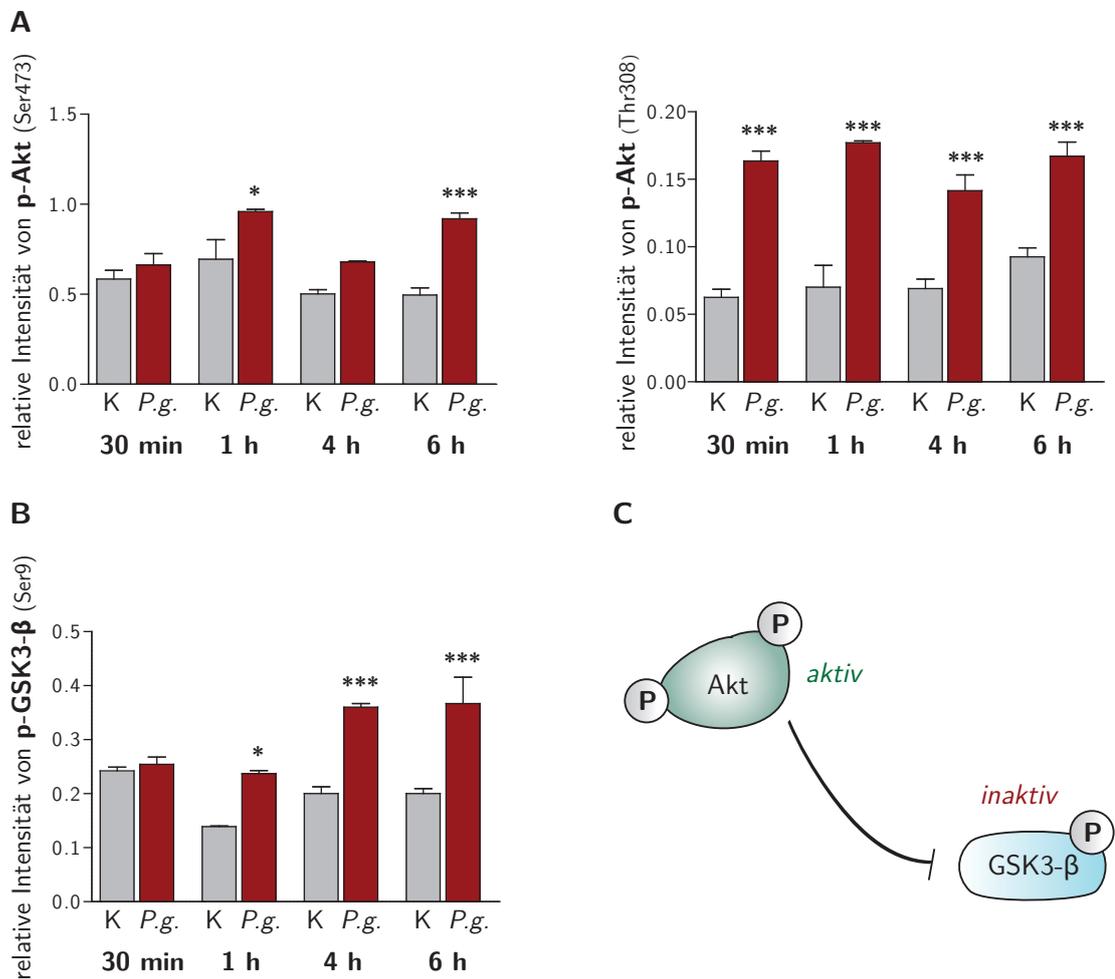


Abbildung 4.7 – *P. gingivalis* phosphoryliert bzw. aktiviert PKB/ Akt und phosphoryliert bzw. inhibiert GSK3-β. Protein-Array-Analyse von Phospho-Thr308- bzw. -Ser473 Akt (A) und Phospho-Ser9 GSK3-β (B) in OKF6/hTERT-1-Zellen nach Stimulation mit *P. gingivalis* (MOI 100) zu verschiedenen Zeitpunkten (30 min, 1 h, 4 h und 6 h). Dargestellt sind die Mittelwerte + S.E.M. aus zwei unabhängigen Experimenten. (C) Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse und Zusammenhang zwischen Akt und GSK3-β. K = Kontrolle, *P.g.* = *P. gingivalis*

4.1.7 Modulation der Genexpression von Stammzellmarkern durch *P. gingivalis*

Die Ursache für ein anhaltendes Risiko der Metastasierung eines Karzinoms könnte in der Bildung einer Subpopulation von Tumorstammzellen begründet liegen, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, Differenzierung und Tumorinitiation aufweisen. Über die epithelial-mesenchymale Transition können sich differenzierte Epithelzellen Stammzeleigenschaften aneignen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit erste Versuche zur Etablierung von Stammzellfähigkeiten innerhalb der immortalisierten gingivalen Epithelzellen nach Stimulation mit *P. gingivalis* durchgeführt, indem die Genexpression der Stammzellmarker Oct3/4, Sox2 und Nanog untersucht wurde. Für alle Stammzellmarker konnte eine

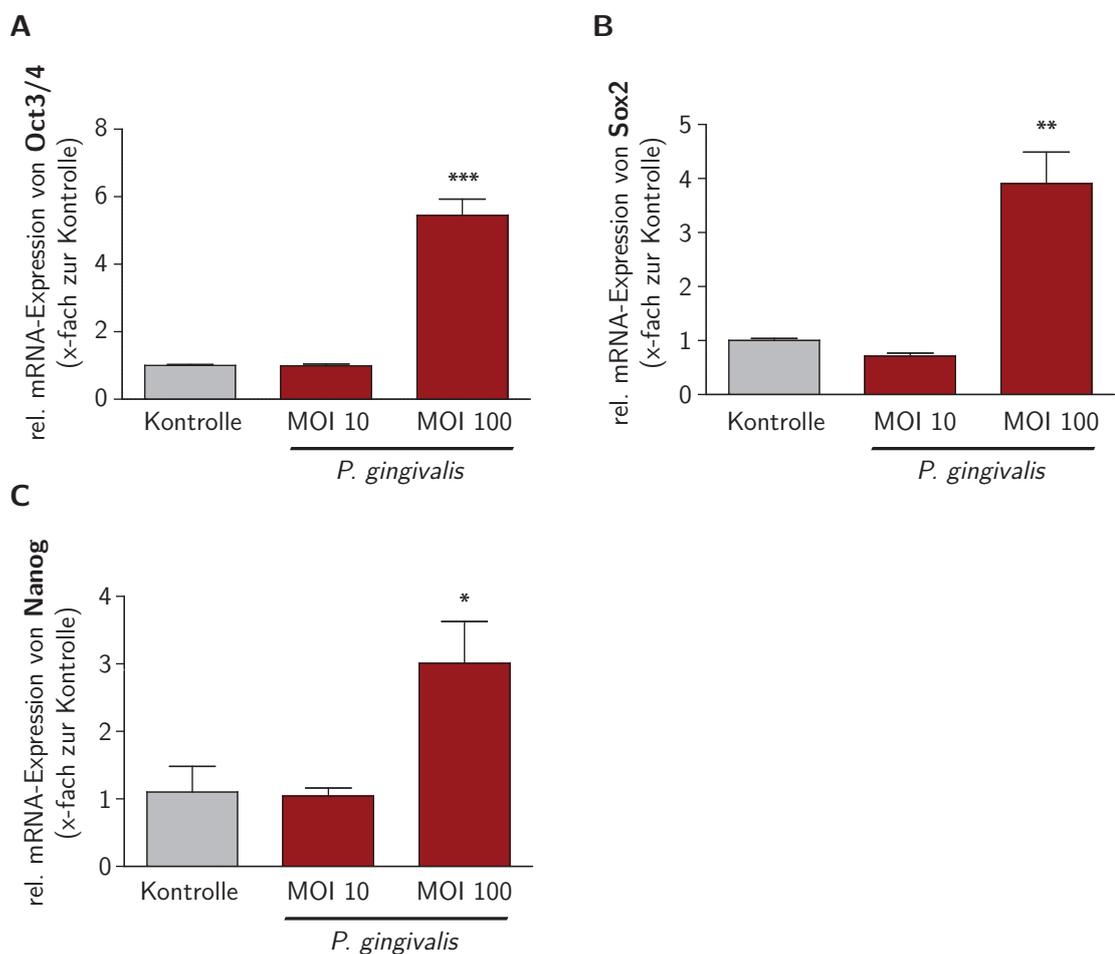


Abbildung 4.8 – *P. gingivalis* erhöht die Genexpression von Stammzellmarkern. Relative mRNA-Expression von Oct3/4 (A), Sox2 (B) und Nanog (C) nach Stimulation mit *P. gingivalis* (MOI 10 und 100) für 24 h. Die Werte wurden mit den *Housekeeping*-Genen β -Aktin und GAPDH normalisiert und auf die nicht-stimulierte Kontrolle bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte + S.E.M. aus n = 6 Experimenten.

signifikante Erhöhung der mRNA-Expression nach Stimulation mit *P. gingivalis* (MOI 100) nach 24 h beobachtet werden. Die Expression der Oct3/4-mRNA erhöhte sich als Antwort auf das parodontopathogene Bakterium um das 5,5-fache im Vergleich zu der nicht-stimulierten Kontrolle. Die Expression von Sox2 erfuhr eine Erhöhung um das 4-fache und die mRNA von Nanog war 3-mal so hoch exprimiert wie in der eingesetzten Kontrolle (Abbildung 4.8).

4.2 Beteiligung von *P. gingivalis* bei der Migration und Invasivität der Epithelzellen

4.2.1 Regulation von Matrixmetalloproteasen durch *P. gingivalis*

Matrixmetalloproteasen (MMPs), vor allem MMP-2 und MMP-9, spielen während der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) eine große Rolle, da sie mit der Invasivität eines Tumors korrelieren. Sie werden vermehrt von mesenchymalen Zellen sekretiert, um die Degradation der extrazellulären Matrix zu ermöglichen. Aus diesem Grund wurde zunächst die mRNA-Expression von MMP-2 und -9 untersucht. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit *P. gingivalis* konnte eine 3,65- (MOI 10) bzw. 10,48-fache (MOI 100) Erhöhung der Genexpression von MMP-9 im Vergleich zu der nicht-stimulierten Kontrolle mittels RT-PCR gezeigt werden. Für MMP-2 wurde keine Veränderung der mRNA-Expression detektiert. Um die Sekretion von Matrixmetalloproteasen, im Speziellen MMP-2 und MMP-9, nachzuweisen, wurde eine Zymographie durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Substratgelelektrophorese, bei der eine elektrophoretische Auftrennung von konditioniertem Medium in nicht-reduzierendem Laemmli-Puffer mit Gelatine-haltigen SDS-Polyacrylamidgelen erfolgt. Die Identifizierung der Gelatinasen erfolgte nach 24-stündiger Inkubation in Proteolyse-Puffer und anschließender Färbung mit Coomassie Blue. Eine Stimulation mit *P. gingivalis* (MOI 100 und MOI 500) hat eine Erhöhung der Pro- und der aktiven Form von MMP-9 nach 24 Stunden gezeigt. Auf die Pro- oder aktive Form von MMP-2 war kein Effekt zu beobachten (Abbildung 4.9(A)). TGF- β 1 gilt als bekannter Auslöser einer EMT in vielen Zelllinien, hatte in den OKF6/hTERT-1-Zellen jedoch keinen Effekt auf MMP-2 oder -9 (Abbildung 4.9 (B)). Um zu überprüfen, ob es sich bei der Bildung und Aktivierung der Matrixmetalloproteasen um einen direkten Effekt der Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) handelt, wurden die Zellen mit LY294002, einem PI3K-Inhibitor, für 1 h vorstimuliert. Die Produktion von MMP-9 im Vergleich zu Zellen, die nicht mit dem Inhibitor behandelt wurden, wurde partiell gehemmt. Wurden die Zellen in einem Bakterien-Zell-Verhältnis von 100:1 infiziert, so konnte eine leichte Aktivierung von MMP-9 beobachtet werden (Abbildung 4.9 (C)).

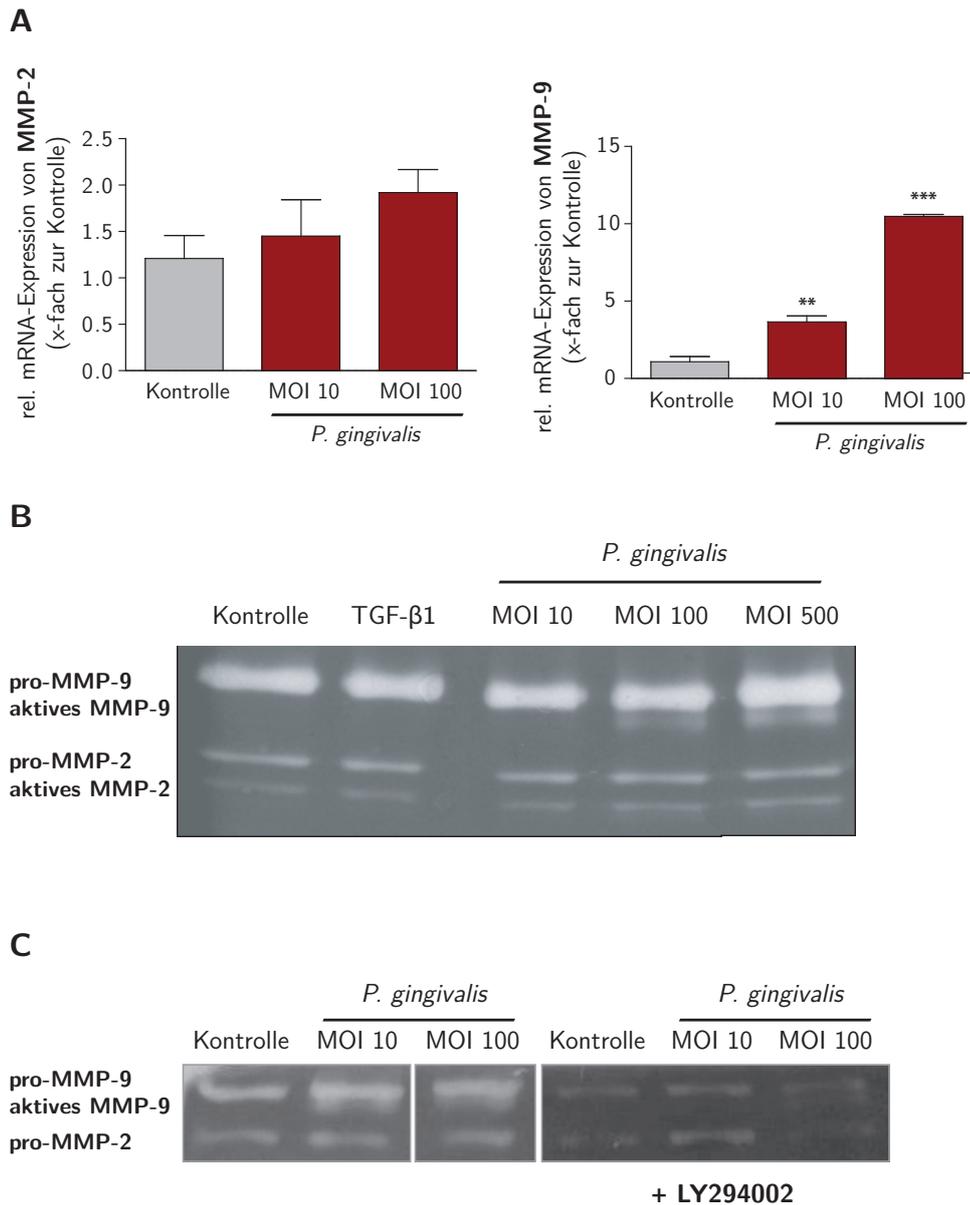


Abbildung 4.9 – Die Synthese und Aktivierung von MMP-9 wird durch *P. gingivalis* über den PI3K/ Akt-Signalweg reguliert. Relative Genexpression und enzymatischer Nachweis der Matrixmetalloproteasen MMP-2 und MMP-9. (A) Relative mRNA-Expression von MMP-9 und MMP-2 nach Stimulation mit *P. gingivalis* (MOI 10 und 100). Die Werte wurden mit den *Housekeeping*-Genen β -Aktin und GAPDH normalisiert und auf die nicht-stimulierte Kontrolle bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte + S.E.M. aus $n = 6$ Experimenten. (B/ C) Enzymatischer Nachweis von MMPs im Überstand der OKF6/hTERT-1-Zellen nach Kultivierung mit *P. gingivalis* (MOI 10, 100 und 500), TGF- β 1 (10 μ g/mL) und dem PI3K-Inhibitor LY294003 in Kombination mit *P. gingivalis*. Die latente Form von MMP-9 zeigt sich bei 92 kDa, bei 82 kDa ist die aktive Form sichtbar. Die latente Form von MMP-2 lässt sich bei 72 kDa nachweisen, die aktive Enzymform bei 62 kDa. Die dargestellten Zymogramme gelten repräsentativ für fünf weitere Versuchsdurchführungen.

4.2.2 Einfluss von *P. gingivalis* auf die Invasion und Migration der immortalisierten gingivalen Epithelzellen

Die verstärkte Sekretion und Aktivierung der Matrixmetalloprotease-9 (MMP-9) lässt auf einen invasiveren Charakter der Zellen schließen. Weiterhin gilt die erhöhte Migrations- und Invasionsfähigkeit der Zellen als charakteristische Veränderung der EMT. Zum Nachweis der Migration und Invasion wurden *Transwell*-Analysen durchgeführt. Dem unteren Kompartiment wurde 10 % FKS als Chemoattraktant hinzugefügt, so dass nur die zur Migration bzw. Invasion befähigten Zellen durch die Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 8 μm wandern können. In das obere Kompartiment wurden die

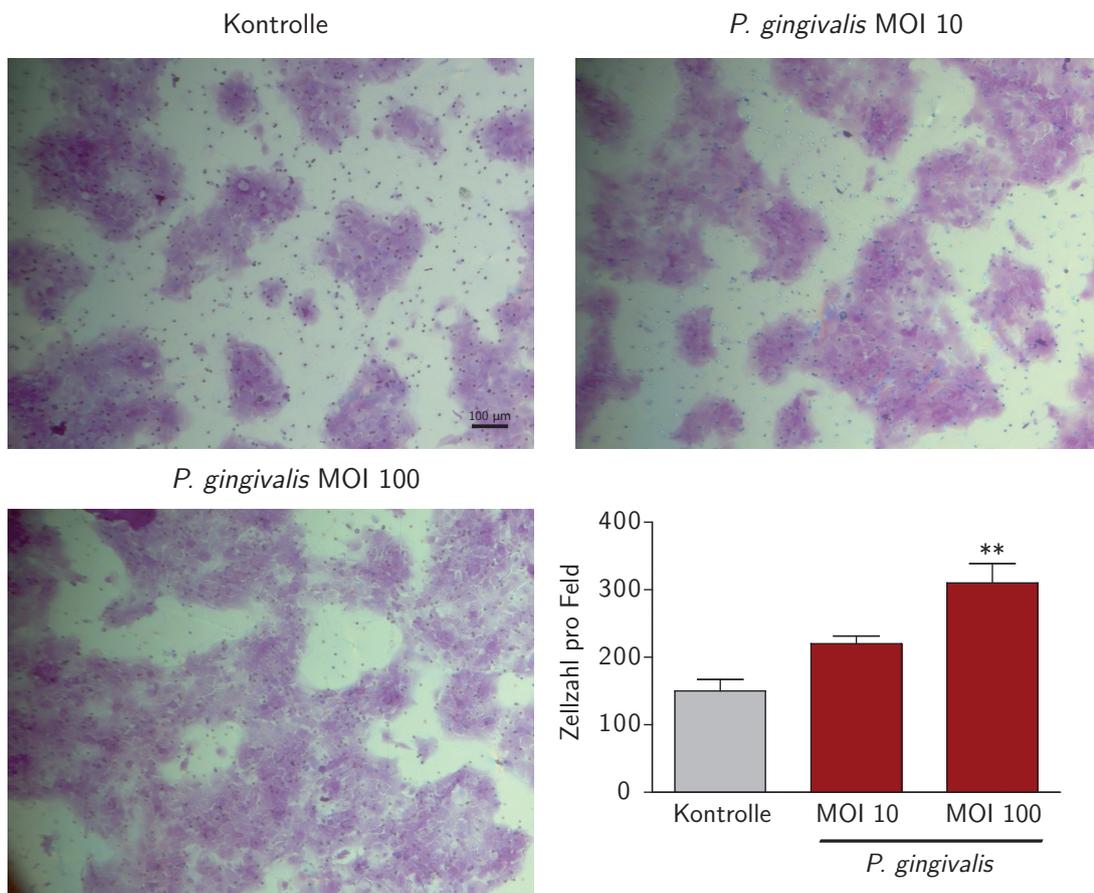


Abbildung 4.10 – Die Migrationsfähigkeit der OKF6/hTERT-1-Zellen steigt nach Stimulation mit *P. gingivalis*. *Transwell*-Migrations-Assay in OKF6/hTERT-1-Zellen nach Infektion mit *P. gingivalis* (MOI 10 und 100). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit S.E.M. aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Abbildungen gelten repräsentativ für drei weitere Versuchsdurchführungen.

Zellen mit bzw. ohne *P. gingivalis* in einem Bakterien-Zell-Verhältnis von 10:1 und 100:1

zugegeben und nach 24-stündiger Inkubation fixiert und die migrierten bzw. invadierten Zellen mit Kristallviolett gefärbt. Zur Quantifizierung wurde die Zellzahl pro Gesichtsfeld im Mikroskop bestimmt. Sowohl die Migration als auch die Invasivität der OKF6/hTERT-1-Zellen nahm nach Stimulation mit *P. gingivalis* zu. Im *Transwell*-Migrations-Assay wurden nach Infektion mit einer MOI von 100 über doppelt so viele migrierte Zellen gezählt (Abbildung 4.10), wohingegen im Matrigel-Assay bei der nicht-stimulierten Kontrolle keine zum Abbau des Matrigels befähigten Zellen nachweisbar waren und bei den mit *P. gingivalis* infizierten Zellen wurden im Mittel 60 Zellen pro Feld gezählt (Abbildung 4.11).

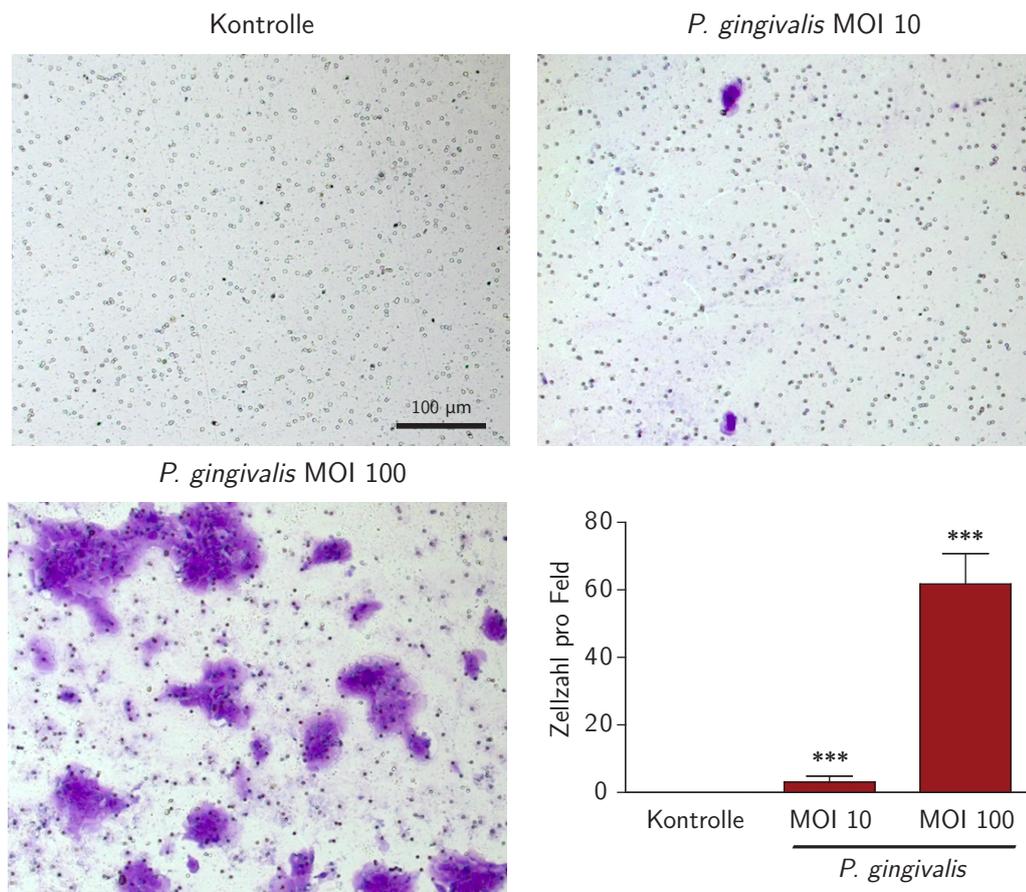


Abbildung 4.11 – Die Invasionsfähigkeit der OKF6/hTERT-1-Zellen steigt nach Stimulation mit *P. gingivalis*. Matrigel-Invasions-Assay in OKF6/hTERT-1-Zellen nach Infektion mit *P. gingivalis* (MOI 10 und 100). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit S.E.M. aus n = 4 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Abbildungen gelten repräsentativ für drei weitere Versuchsdurchführungen.

4.3 Effekt von *P. gingivalis* auf die Proliferation und Angiogenese

4.3.1 Sekretion von TGF- β 1 und VEGF durch *P. gingivalis*

Ein Tumor zeichnet sich nicht nur durch einen invasiven Charakter aus, sondern auch durch eine vermehrte Proliferation der Zellen und die Fähigkeit zur Neoangiogenese. TGF- β 1 (*transforming growth factor*- β 1) hat je nach Zelltyp einen ambivalenten Charakter. In gesunden Epithelzellen wird TGF- β 1 die Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben, indem das Wachstum inhibiert wird, in Tumorzellen jedoch gilt der Wachstumsfaktor als Tumorpromotor, indem das Wachstum gefördert wird. Weiterhin spielt TGF- β 1 eine Rolle bei der EMT, da für den Wachstumsfaktor in vielen Zelllinien bereits eine Induktion der EMT beschrieben wurde [167]. VEGF spielt eine Rolle bei der Induktion der Angiogenese in Endothelzellen und sorgt somit dafür, dass in der Umgebung des Tumors Blutgefäße gebildet werden, die ihn mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen können.

Um die Sekretion von TGF- β 1 und VEGF nach Stimulation mit *P. gingivalis* nachzuweisen, wurde der Überstand der OKF6/hTERT-1-Zellen in einem ELISA eingesetzt. Nach 8 h und 24 h konnte kein Unterschied in der Sekretion der beiden Wachstumsfaktoren nach Inkubation mit *P. gingivalis* im Vergleich zur nicht-behandelten Kontrolle nachgewiesen werden. Nach 72 h wurde für VEGF und TGF- β 1 eine signifikante Erhöhung der Sekretion durch *P. gingivalis* gezeigt (Abbildung 4.12). Während bei einer MOI von 100 680 pg/ μ g Gesamtprotein TGF- β 1 gebildet wurden, sind es bei der nicht-stimulierten Kontrolle nur 83 pg/ μ g Protein. Die Sekretion von VEGF lag bei *P. gingivalis* (MOI 100) um den Faktor 6 höher als in der unbehandelten Kontrolle.

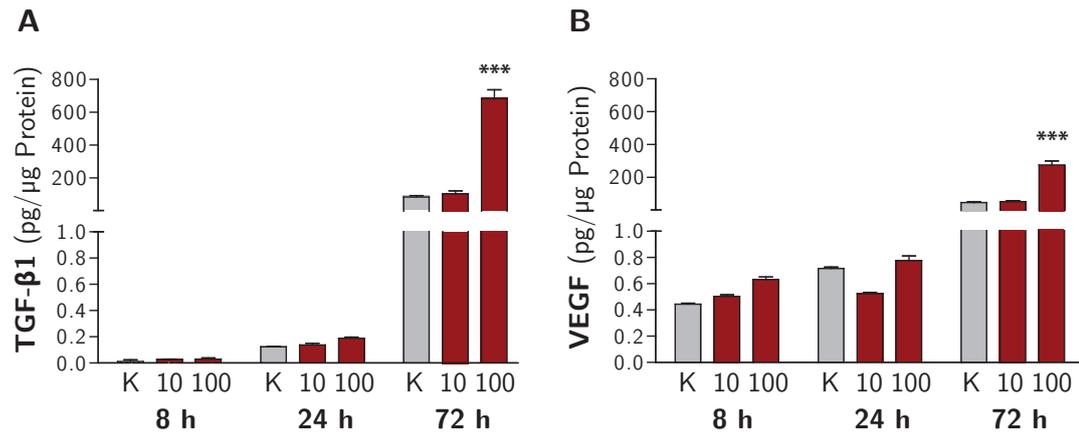


Abbildung 4.12 – *P. gingivalis* bewirkt eine vermehrte Sekretion der Wachstumsfaktoren TGF-β1 und VEGF. Mittels ELISA wurde die Sekretion von TGF-β1 (A) und VEGF (B) von OKF6/hTERT-1-Zellen nach Infektion mit *P. gingivalis* (MOI 10 und 100) ermittelt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte + S.E.M. aus n = 3 unabhängigen Experimenten dargestellt.

4.3.2 Wirkung von *P. gingivalis* auf die Proliferation der OKF6/hTERT-1-Zellen

Da eine vermehrte Sekretion des Wachstumsfaktors TGF-β1 nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, inwieweit die Proliferation der Zellen durch *P. gingivalis* beeinflusst wird. Da TGF-β1 sowohl als Tumorsuppressor, als auch als -promotor wirken kann, wäre ein positiver, als auch negativer Effekt auf die Proliferation der Epithelzellen denkbar. Die Zellen wurden mit *P. gingivalis* (MOI 1, MOI 10 und MOI 100) für 24 h und 48 h stimuliert und anschließend mithilfe einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Bereits nach 24 h konnte ein signifikanter Einfluss auf die Zellzahl beobachtet werden (Abbildung 4.13 (A)). Zur Stützung des Proliferations-fördernden Effektes von *P. gingivalis* wurde das Protein Ki-67 als Marker für sich teilende Zellen chemilumineszent nachgewiesen. Nach 48-stündiger Inkubation der immortalisierten Epithelzellen mit dem parodontopathogenen Bakterium war eine signifikante Erhöhung von Ki-67 um das 1,2-fache zu detektieren (Abbildung 4.13 (B)).

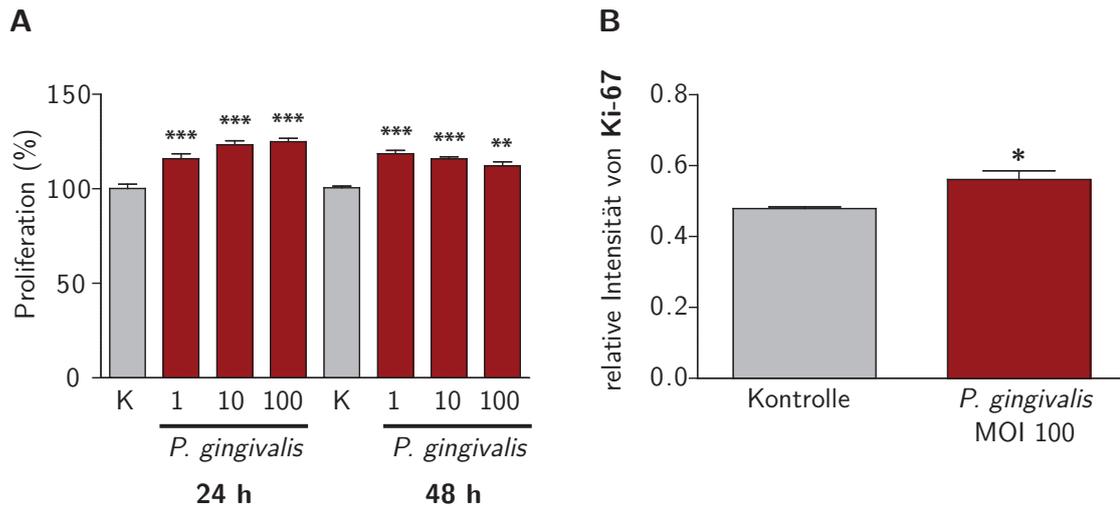


Abbildung 4.13 – Das Proliferationsverhalten der Zellen wird durch *P. gingivalis* verändert. (A) Mittels Auszählung im Hämocytometer wurde das Proliferationsverhalten von OKF6/hTERT-1-Zellen als Antwort auf *P. gingivalis* nach 24 h und 48 h bestimmt. **(B)** Die Produktion von Ki-67 nach Stimulation mit *P. gingivalis* (MOI 100) für 48 h wurde mithilfe eines Protein-Arrays detektiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte + S.E.M. aus n = 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. K = Kontrolle.

4.3.3 Regulation des mTOR-Signalweges durch *P. gingivalis*

Zellwachstum ist eine Antwort auf eine erhöhte Verfügbarkeit von Energie in Form von Nährstoffen. Zentrale Kinase des mTOR-Signalweges (*mammalian target of rapamycin*) ist mTOR, die die Proteinsynthese anregt, indem p70 Ribosomales Protein S6 Kinase (p70 S6 K) aktiviert wird und diese wiederum das ribosomale Protein S6 phosphoryliert, was zu einer erhöhten Translation bestimmter mRNAs führt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass mTOR von Akt aktiviert wird, so dass sich in dieser Arbeit die Frage gestellt hat, inwieweit sich die Aktivierung von Akt auf den mTOR-Signalweg ausübt. Die Mitglieder des mTOR-Signalweges mTOR, PRAS40, p70 S6 K und das ribosomale Protein S6 lagen nach Stimulation mit *P. gingivalis* zu verschiedenen Zeitpunkten (30 min, 1 h, 4 h und 6 h) verstärkt phosphoryliert vor (Abbildung 4.14). Die Phosphorylierung von PRAS40 führt, im Gegensatz zu den anderen Phosphorylierungen des mTOR-Signalweges, zu einer Inhibierung von PRAS40, was wiederum in einer Aktivierung von mTOR resultiert.

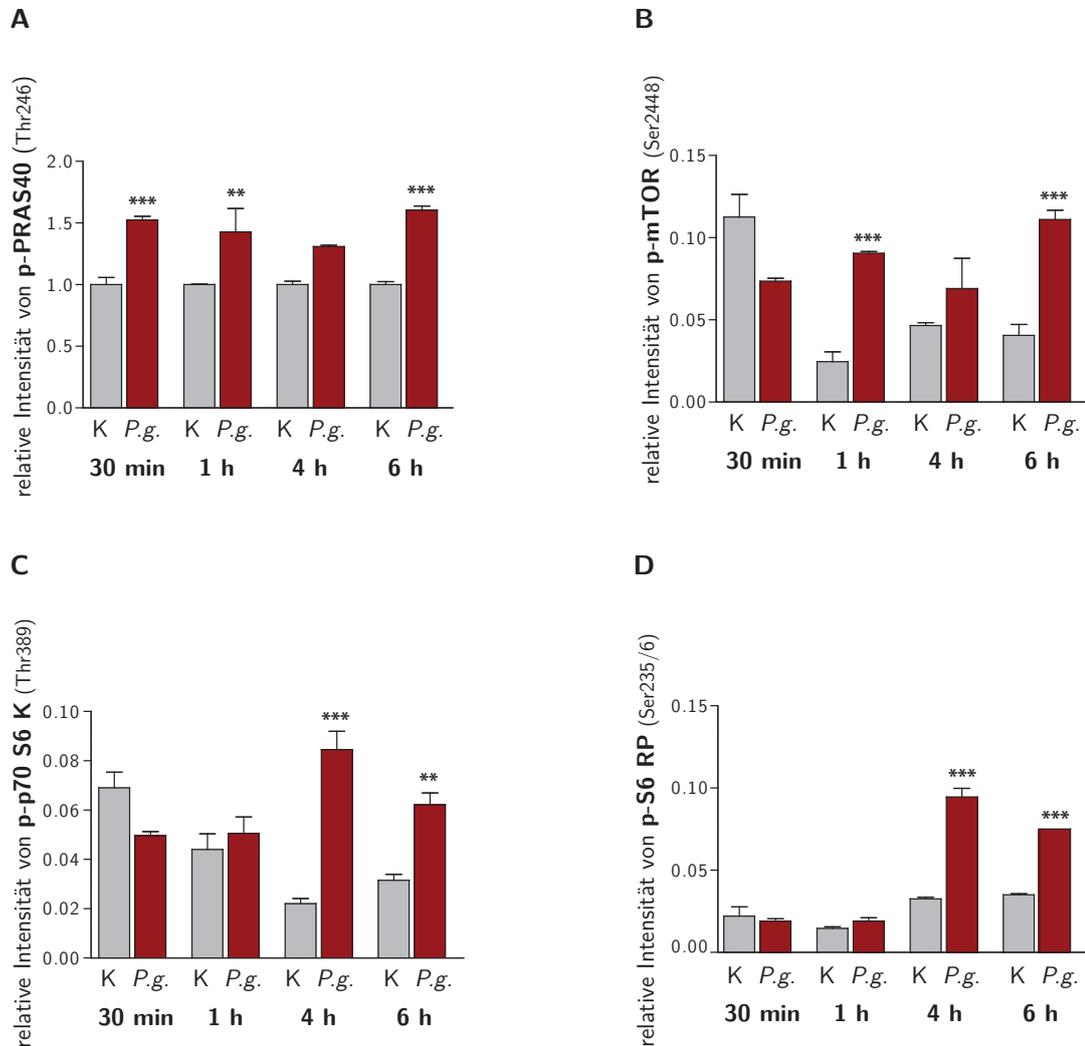


Abbildung 4.14 – *P. gingivalis* aktiviert den mTOR-Signalweg. Protein-Array-Analyse von Phospho-Thr246 PRAS40 (A), Phospho-Ser2448 mTOR (B), Phospho-Thr389 p70 S6 Kinase (C) und Phospho-Ser235/6 S6 Ribosomales Protein (D) in OKF6/hTERT-1-Zellen nach Stimulation mit *P. gingivalis* (MOI 100) für verschiedene Zeitpunkte (30 min, 1 h, 4 h und 6 h). Dargestellt sind die Mittelwerte + S.E.M. aus zwei unabhängigen Experimenten. K = Kontrolle, P.g. = *P. gingivalis*

4.4 Wirkung von *P. gingivalis* auf das Apoptoseverhalten der immortalisierten gingivalen Epithelzellen

Als weiterer essentieller Faktor malignen Wachstums gilt die Resistenz der Zelle gegenüber Apoptose. Aus diesem Grund wurde ein pro-apoptotisches (Bad) und ein anti-apoptotisches Protein (Bcl-2) untersucht. Western-Blot-Aufnahmen mit anschließender densitometrischer Auswertung haben ergeben, dass *P. gingivalis* bei einer MOI von 10 und 100 nach 24 h zu einer signifikanten vermehrten Produktion des 26 kDa anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 führte (Abbildung 4.15 (A)). Im Vergleich dazu, gab es eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierung von Bad nach 4 h und 6 h (Abbildung 4.15 (B)).

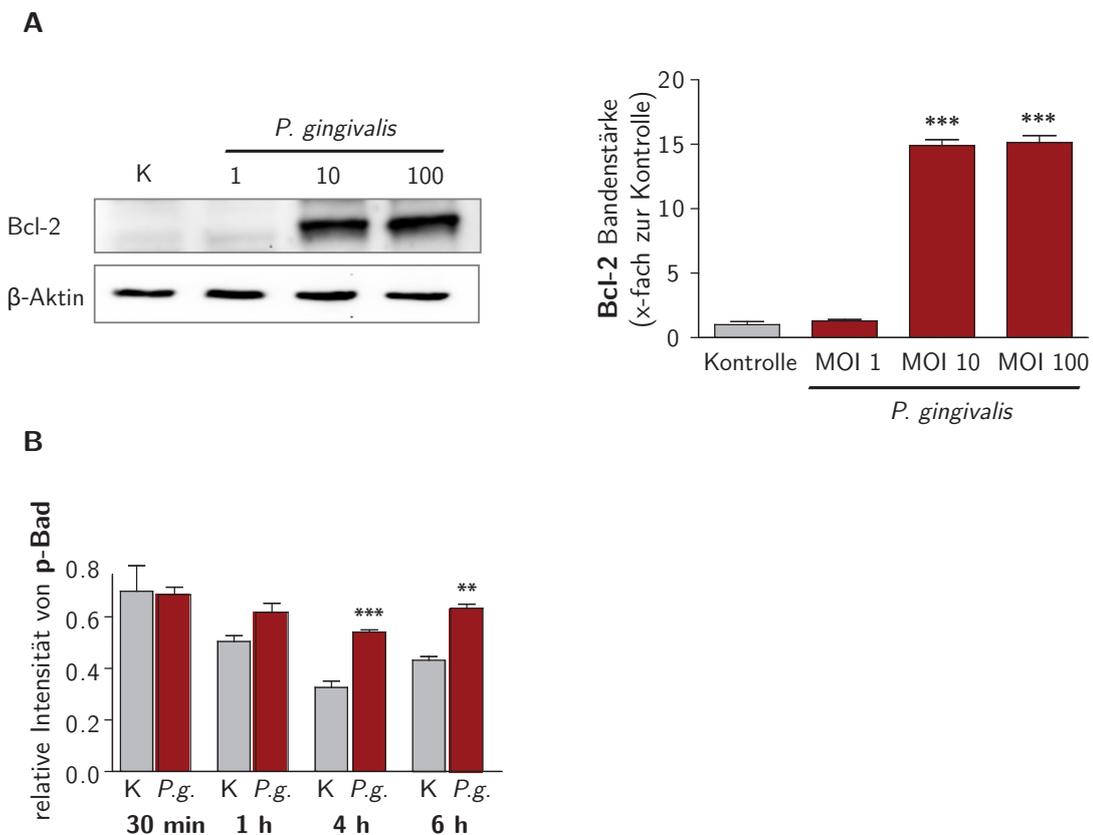


Abbildung 4.15 – Regulation von Apoptose-beteiligten Proteinen durch *P. gingivalis* in OKF6/hTERT-1-Zellen. (A) Western-Blot-Analyse und densitometrische Auswertung von Bcl-2 als anti-apoptotisches Protein nach einer 24-stündigen Inkubation mit *P. gingivalis* (MOI 1, 10 und 100). (B) Protein-Array-Analyse von Phospho-Ser112 Bad in OKF6/hTERT-1-Zellen nach Stimulation mit *P. gingivalis* (MOI 100) zu verschiedenen Zeitpunkten (30 min, 1 h, 4 h und 6 h). Dargestellt sind die Mittelwerte + S.E.M. aus zwei unabhängigen Experimenten. K = Kontrolle, P.g. = *P. gingivalis*

4.4.1 Entwicklung einer Anoikis-Resistenz durch *P. gingivalis*

Für das Überleben der Epithelzellen ist es von Nöten, dass sie an die extrazelluläre Matrix binden. Wird dieser Kontakt jedoch durch die Entstehung von invasiven Zellen verhindert, dann tritt normalerweise der Prozess der Anoikis auf. Krebszellen sind in der Lage, eine Resistenz gegen Anoikis zu entwickeln, so dass trotz Verlust der Bindung an die extrazelluläre Matrix (EZM) kein Zelltod auftritt.

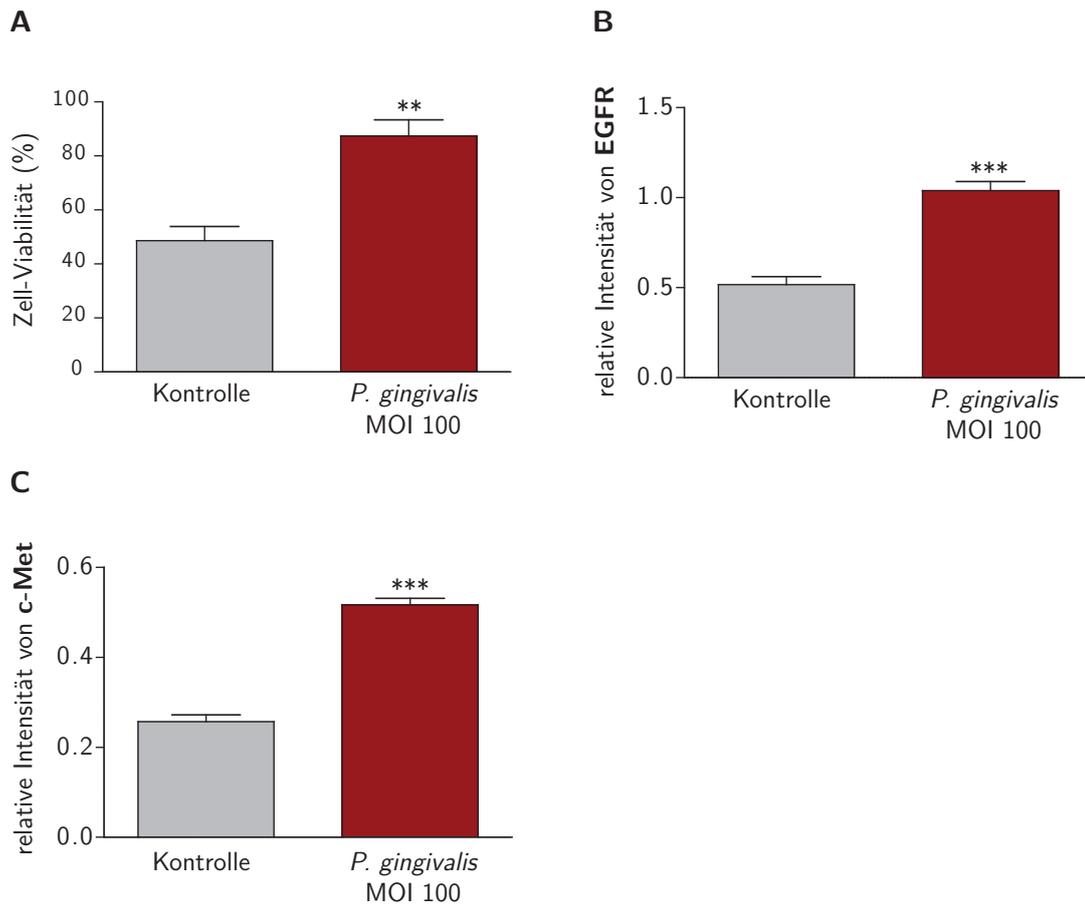


Abbildung 4.16 – *P. gingivalis*-stimulierte OKF6/hTERT-1-Zellen erwerben eine Anoikis-Resistenz. (A) Um die Sensitivität der Zellen gegenüber Anoikis zu bestimmen, wurden für 5 Tage mit *P. gingivalis* (MOI 100) vorstimulierte Zellen auf poly-HEMA-beschichteten Zellkulturschalen für 24 h inkubiert und anschließend mittels Trypanblau-Ausschluss-Test die Zell-Viabilität ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte + S.E.M. aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten. (B/ C) Protein-Array-Analyse von EGFR und c-Met in OKF6/hTERT-1-Zellen nach Stimulation mit *P. gingivalis* (MOI 100) für 72 h. Dargestellt sind die Mittelwerte + S.E.M. aus drei unabhängigen Experimenten.

Eine Anoikis wurde in dieser Arbeit simuliert, indem Zellkulturschalen mit poly-HEMA beschichtet wurden, so dass keine Anheftung der Zellen an die Zellkulturschale ermöglicht wurde, also keine Zell-Matrix-Verankerungen ausgebildet werden konnten. Mithilfe einer Trypanblau-Färbung konnten tote Zellen von lebenden unterschieden und im Hämocytometer ausgezählt werden, so dass eine Aussage über die Viabilität der Zellen gemacht werden konnte. Während bei der Kontrolle durchschnittlich 49% der Zellen lebten, waren es bei *P. gingivalis*-stimulierten Zellen ungefähr 90% (Abbildung 4.16(A)). Es konnte bereits gezeigt werden, dass in Epithelzellen der Brust aufgrund des Attachmentverlustes zu der EZM der EGF-Rezeptor (EGFR) vermindert exprimiert wurde, was zu einer Erhöhung pro-apoptotischer Proteine führte. In Krebszellen hingegen wurde gezeigt, dass der EGF-Rezeptor überexprimiert wurde, so dass keine Anoikis eintrat [168]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Proteingehalt des EGF-Rezeptors in den infizierten OKF6/hTERT-1-Zellen mithilfe eines Protein-Arrays untersucht. Zu beobachten war, dass der Gehalt an EGFR in den immortalisierten gingivalen Epithelzellen nach Stimulation mit *P. gingivalis* im Vergleich zu der nicht-stimulierten Kontrolle um das zweifache anstieg. Auch für c-Met, welches ebenfalls eine Rolle in der Anoikis-Resistenz einnimmt [169], konnte ein Anstieg im Proteinlevel detektiert werden (Abbildung 4.16 (B) und (C)).

4.5 Expressionsmuster von S100-Proteinen als Antwort auf *P. gingivalis*

Die Familie der S100-Proteine umfasst 21 Mitglieder. Die mRNA-Expressionen von 13 Proteinen dieser Familie wurden in dieser Arbeit untersucht. Es ist bereits bekannt, dass S100-Proteine eine Rolle im Tumor haben, indem z. B. Wachstums-, Invasions- und Angiogeneseprozesse moduliert werden. In Tabelle 4.1 sind die ΔC_t -Werte als Maß für die relative mRNA-Expression der S100-Proteine referenziert zu den *Housekeeping*-Genen β -Aktin und GAPDH und als relativer Faktor zu der nicht-stimulierten Kontrolle dargestellt. Die Expression des S100A7-Gens war die niedrigste aller getesteten S100-Proteine. Nach 6- und 24-stündiger Inkubation mit *P. gingivalis* (MOI 100) lag die Genexpression um das 2500-fache niedriger als in der nicht-stimulierten Kontrolle. Bei den weiteren untersuchten Genen der S100-Proteine konnte nach 6 h und 24 h keine signifikante Veränderung der Genexpression beobachtet werden (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1 – ΔC_t -Werte und relativer Faktor der S100-Proteine in OKF6/hTERT-1-Zellen nach Stimulation mit *P. gingivalis* für 6 h und 24 h bezogen auf GAPDH und β -Aktin. Dargestellt sind die Mittelwerte aus $n = 6$ Experimenten \pm Standardabweichung.

Gen	Zeitpunkt	ΔC_t	relativer Faktor
S100A1	6 h	$15,78 \pm 0,39$	$1,09 \pm 0,54$
	24 h	$18,59 \pm 0,39$	$0,77 \pm 0,13$
S100A2	6 h	$-2,96 \pm 0,13$	$0,95 \pm 0,09$
	24 h	$-1,97 \pm 0,29$	$0,82 \pm 0,16$
S100A3	6 h	$8,20 \pm 0,29$	$1,04 \pm 0,20$
	24 h	$8,95 \pm 0,30$	$0,93 \pm 0,18$
S100A4	6 h	$7,63 \pm 0,33$	$0,98 \pm 0,21$
	24 h	$7,95 \pm 0,09$	$1,37 \pm 0,09$
S100A6	6 h	$-1,03 \pm 0,19$	$0,98 \pm 0,13$
	24 h	$0,11 \pm 0,07$	$0,81 \pm 0,04$
S100A7	6 h	$30,31 \pm 2,59$	$4 * 10^{-4} \pm 6 * 10^{-4}$
	24 h	$28,21 \pm 0,11$	$4 * 10^{-4} \pm 3 * 10^{-5}$
S100A8	6 h	$4,44 \pm 0,44$	$1,18 \pm 0,39$
	24 h	$3,98 \pm 0,05$	$3,05 \pm 0,11$
S100A9	6 h	$6,32 \pm 0,39$	$1,10 \pm 0,31$
	24 h	$5,78 \pm 0,28$	$3,12 \pm 0,57$
S100A10	6 h	$-0,46 \pm 0,09$	$0,99 \pm 0,06$
	24 h	$0,25 \pm 0,18$	$0,76 \pm 0,09$
S100A11	6 h	$-0,77 \pm 0,32$	$0,98 \pm 0,23$
	24 h	$-0,26 \pm 0,05$	$0,96 \pm 0,03$
S100A13	6 h	$2,52 \pm 0,14$	$1,02 \pm 0,10$
	24 h	$3,19 \pm 0,13$	$0,95 \pm 0,08$
S100A14	6 h	$1,74 \pm 0,15$	$0,90 \pm 0,09$
	24 h	$1,97 \pm 0,16$	$1,04 \pm 0,11$
S100A16	6 h	$2,07 \pm 0,36$	$0,98 \pm 0,26$
	24 h	$2,35 \pm 0,11$	$1,03 \pm 0,08$

Es konnte bereits gezeigt werden, dass S100A7 β -Catenin inhibiert und gleichzeitig β -Catenin S100A7 negativ beeinflusst [170]. Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass durch eine Stimulation mit *P. gingivalis* eine Erhöhung von β -Catenin im Zellkern erfolgte (Abbildung 4.5), wurde vermutet, dass eine Stimulation mit S100A7 eine Reduktion von β -Catenin zur Folge hätte und S100A7 somit eine regulatorische Funktion bei dem Einfluss des parodontopathogenen Bakteriums *P. gingivalis* einnimmt. Aus diesem Grund wurde der β -Catenin-Gehalt im Cytosol und Zellkern der OKF6/hTERT-1-Zellen nach Stimulation mit S100A7 für 24 h bestimmt. Mittels SDS-PAGE mit folgendem Western-Blot war zu beobachten, dass eine Stimulation mit S100A7 sowohl im Cytosol als auch im Zellkern eine Verminderung des β -Catenin-Gehaltes zur Folge hatte (Abbildung 4.17).

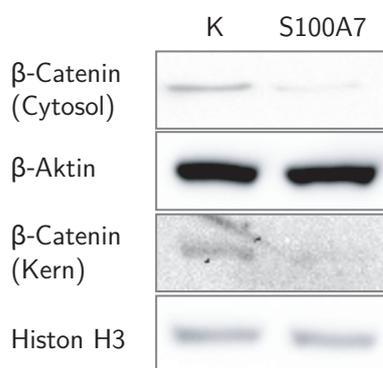


Abbildung 4.17 – Eine Stimulation mit S100A7 führt zu einer Verminderung von β -Catenin im Cytosol und Zellkern. Western-Blot-Analyse von β -Catenin im Zellkern und Cytosol von OKF6/hTERT-1-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit S100A7 in einer Konzentration von 150 ng/mL. Als Referenzprotein für das Cytosol wurde β -Aktin verwendet, für den Zellkern Histon H3. Die dargestellten Immunoblots gelten repräsentativ für zwei weitere Versuchsdurchführungen. K = Kontrolle.

4.6 Einfluss von *P. gingivalis* auf die Inflammasom-Aktivierung in THP-1-Makrophagen

In vitro werden die Epithelzellen isoliert kultiviert, wohingegen die Mikroumgebung der Zellen außer Acht gelassen wird. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit erste Versuche hinsichtlich des Tumorstromas unternommen, indem Immunzellen mit *P. gingivalis* infiziert wurden, so dass die Wirkung des parodontopathogenen Bakteriums auf die Umgebung des Tumors beobachtet werden konnte. Im Speziellen wurde sich die Inflammasom-Regulation durch *P. gingivalis* in Makrophagen (differenzierte THP-1-Zellen) angeschaut. Hierfür

wurden mit PMA-differenzierte THP-1-Zellen für 6 h und 24 h mit *P. gingivalis* (MOI 100) und Nigericin (6 μ M) als Positivkontrolle stimuliert. Die Sekretion von IL-1 β , die Aktivierung von Caspase-1 und das Einleiten einer Pyroptose sind charakteristische Vorgänge eines aktiven Inflammasoms. Die Sekretion von IL-1 β wurde mittels ELISA gemessen (Abbildung 4.18 (A)). Zu erkennen ist, dass *P. gingivalis* die Sekretion im Vergleich zu der nicht-stimulierten Kontrolle signifikant verminderte, wohingegen die Positivkontrolle Nigericin eine Erhöhung der Sekretion des Cytokins herbeiführte. Anhand der Western-Blots der aufkonzentrierten Überstände mit Antikörpern gegen Caspase-1 und IL-1 β konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Infektion mit *P. gingivalis* zu keiner Spaltung von Caspase-1 p20 führte. Weiterhin konnte mittels Western-Blot gezeigt werden, dass in ankonzentrierten Überständen von stimulierten Zellen keine aktive Form von IL-1 β nachzuweisen war, was das mittels ELISA erhaltene Ergebnis stützt (Abbildung 4.18 (B)). Die Pyroptose ist ein programmierter inflammatorischer Zelltod, der abhängig von der Aktivierung der Cysteinprotease Caspase-1 ist. Als Folge der Inflammasom- und somit der Caspase-1-Aktivierung verlieren die Zellen ihre Membranintegrität und lysieren, so dass das normalerweise cytosolische Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) im Zellüberstand zu finden ist. Es konnte nach Infektion mit *P. gingivalis* keine Erhöhung von LDH im Zellkulturüberstand beobachtet werden (4,2 % nach 6 h und 5,7 % nach 24 h), wohingegen Nigericin den LDH-Gehalt im konditioniertem Medium signifikant erhöhte (Abbildung 4.18 (C)).

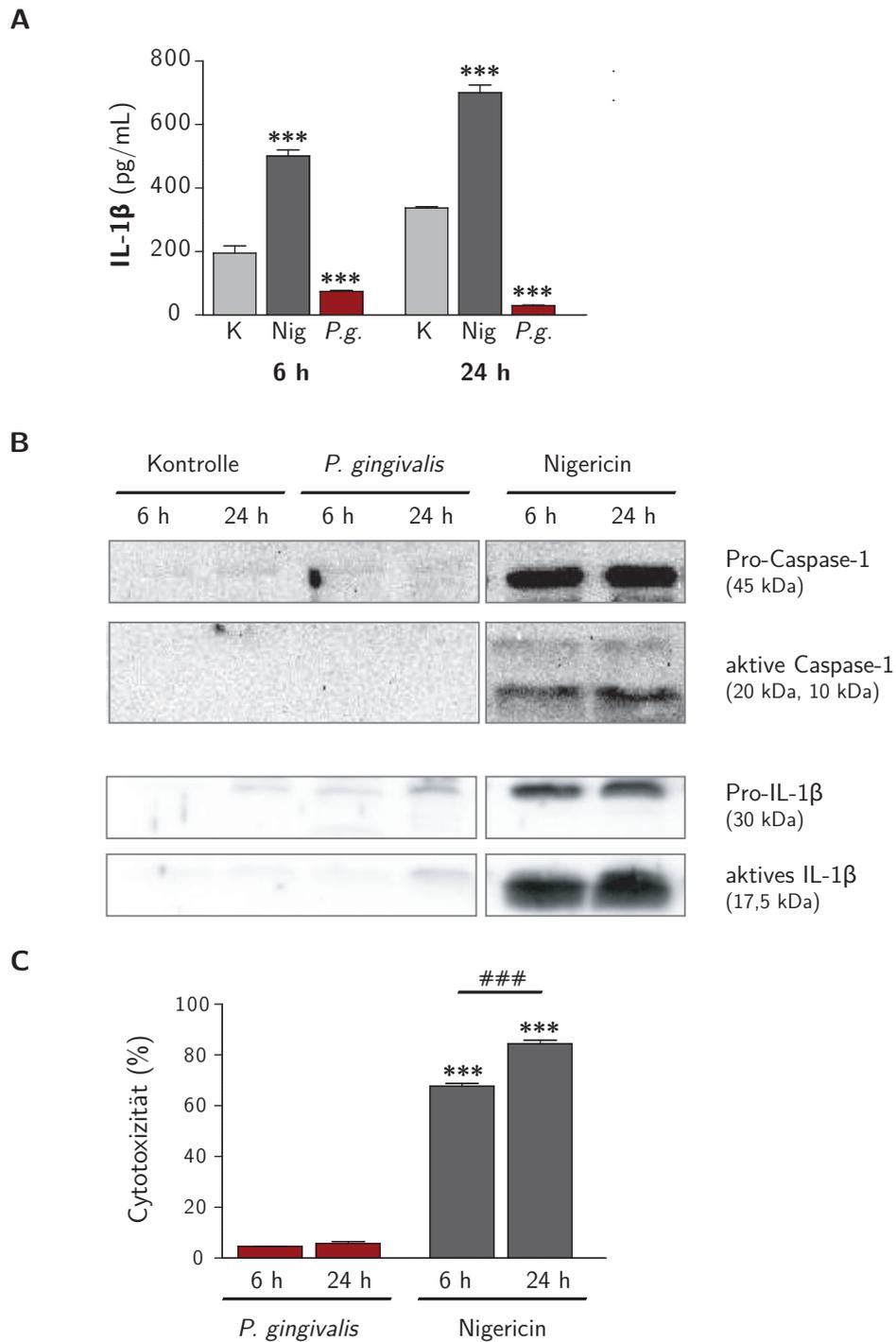


Abbildung 4.18 – Es gibt keinen Einfluss von *P. gingivalis* auf eine Inflammasom-Aktivierung. Mit PMA differenzierte THP-1-Zellen wurden entweder nicht (K = Kontrolle), mit Nigericin (Nig, 6 μ M) oder *P. gingivalis* (*P.g.*, MOI 100) für 6 h und 24 h stimuliert. Die Überstände wurden auf IL-1 β , aktive Caspase-1 und LDH analysiert (**A**, **B** und **C**). (**A**) Nachweis der Sekretion von IL-1 β mittels ELISA, (**B**) Immunoblot für Caspase-1 und IL-1 β , (**C**) LDH-Test mit Triton X-100 (1%) als Positivkontrolle. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit S.E.M. aus n = 3 unabhängigen Experimenten dargestellt.

5 Diskussion

Karzinome des Kopf- und Halsbereichs sind weltweit die achthäufigste Todesursache unter den Krebserkrankungen [171]. Über 90 % der Kopf- und Hals-Tumoren stellen Plattenepithelkarzinome des Epithels der betreffenden Region dar. Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle gehören zu den häufigsten malignen Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes. Die Ätiologie ist multifaktoriell: Ein signifikanter Zusammenhang wurde zwischen Oralkarzinomen und Tabak- bzw. Alkoholabusus hergestellt [172]. Weitere karzinogene Kofaktoren sind orale Präkanzerosen, Virusinfektionen und chronische inflammatorische Bedingungen aufgrund von schlechter Mundhygiene. Die häufigste chronische Infektion in der Mundhöhle stellt die Parodontitis, mit *Porphyromonas gingivalis* als Schlüsselkeim, dar. Der nicht geklärten Rolle einer chronischen Parodontitis in der Entstehung eines oralen Plattenepithelkarzinoms sowie der Dringlichkeit neuer therapeutischer Ansätze, da vorrangig chirurgisch interveniert wird, ist das große Interesse an der möglichen onkogenen Wirkung von *P. gingivalis* geschuldet.

5.1 *P. gingivalis* löst eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) in gingivalen Epithelzellen aus

Das Einleiten einer EMT geschieht zum einen in einem malignen Tumor zur Förderung der Metastasierung und zum anderen begünstigt es die initiale maligne Transformation gesunder Zellen. Aus diesem Grund wurde die Rolle des parodontopathogenen Bakteriums bei einer epithelial-mesenchymalen Transition in nicht-malignen gingivalen Epithelzellen evaluiert. Aktuelle Forschungsergebnisse von Sztukowska *et al.* [173] beschreiben *P. gingivalis* als Auslöser eines mesenchymalen Phänotyps in epithelialen Zellen, indem der Zink-Finger-Transkriptionsfaktor ZEB1 (*zinc finger e-box-binding homeobox 1*) verstärkt exprimiert und in den Nukleus transloziert wird und Gene der mesenchymalen Marker N-Cadherin, Vimentin, Fibronectin und MMP-9 positiv reguliert werden [173]. Allerdings wurde in den Experimenten dieser Studie kein Effekt von *P. gingivalis* auf weitere

EMT-relevante Prozesse gezeigt, so dass sich die vorliegende Arbeit mit dem weiterführenden Einfluss des Bakteriums auf eine Transformation von einem epithelialen in einen mesenchymalen Phänotyp beschäftigt.

Eine Infektion mit *P. gingivalis* leitet einen Cadherin-Switch ein

Ein essentielles Merkmal einer epithelial-mesenchymalen Transition ist der sogenannte Cadherin-Switch, bei dem E-Cadherin reprimiert und die Expression von N-Cadherin erhöht wird. E-Cadherin dient der Interaktion zwischen benachbarten Epithelzellen, so dass der Gewebeverband aufrechterhalten wird. N-Cadherin hingegen destabilisiert Zell-Zell-Adhäsionen und führt zu einem mesenchymalen Phänotyp [174]. Anhand von mikroskopischen Untersuchungen wurde zunächst gezeigt, dass sich die Zellmorphologie als Antwort auf *P. gingivalis* verändert: Die Zellen wiesen eine langgestreckte fibroblastäre Form auf. Zusätzlich konnte eine Umstrukturierung des Aktin-Cytoskeletts festgestellt werden, indem eine Aktinfilamentnukleation und eine Verlagerung des Aktin-Cytoskeletts in die Zellperipherie auftrat (Abbildung 4.2). Nachfolgend wurde untersucht, inwieweit eine Infektion mit *P. gingivalis* zu einer Veränderung des E-Cadherin- und N-Cadherin-Musters führt. Durch eine fünftägige Stimulation mit *P. gingivalis* kam es zu einer signifikanten Reduktion von E-Cadherin bei gleichzeitiger Erhöhung von N-Cadherin. Eine Reduktion von E-Cadherin konnte bereits im Epithel von Parodontitis-Patienten gefunden werden [175]. Katz *et al.* [176] zeigten, dass in Hundenierenzellen eine Hydrolyse und somit eine Degradierung von E-Cadherin aufgrund der Gingipaine von *P. gingivalis* eintritt [176, 177]. Ferner konnte in chronisch inflammatorischen Läsionen des gingivalen Epithels eine Abnahme der Genexpression von E-Cadherin nachgewiesen werden [178], was darauf schließen lässt, dass nicht nur Gingipaine ausschlaggebend für die Reduktion von E-Cadherin sein können. Abe-Yutori *et al.* [179] beobachteten, dass neben den Gingipainen auch das Lipopolysaccharid von *P. gingivalis* zu einer verminderten Expression von E-Cadherin führt [179]. Die vorliegende Arbeit zeigt erstmalig, dass das oralpathogene Bakterium einen Cadherin-Switch in immortalisierten gingivalen Epithelzellen herbeiführt (Abbildung 5.1 (A)). Zwar konnte bereits eine Reduktion von E-Cadherin in vorherigen Arbeiten nachgewiesen werden, jedoch wurde bisher keine Erhöhung von N-Cadherin durch *P. gingivalis* beschrieben. Chen *et al.* [180] zeigten anhand eines anderen Typstammes (W83), dass *P. gingivalis* zu einer Proteolyse von N-Cadherin führt, was den Ergebnissen dieser Arbeit widerspricht. Zu beachten ist, dass sich der eingesetzte Mikroorganismenstamm von dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm (ATCC 33277) unterscheidet: Trotz gleicher Genomgröße und GC-Gehaltes sind Genumlagerungen Grund für Unterschiede innerhalb der Typstämme dieser Spezies [181].

***P. gingivalis* führt über die aberrante Aktivierung von Akt zu einer Akkumulation von β -Catenin und Snail im Zellkern**

Aufgrund der Beteiligung von β -Catenin sowohl bei der Verankerung von Cadherinen mit dem Cytoskelett, als auch im Wnt-Signalweg, wurde postuliert, dass eine Reduktion von E-Cadherin die Entlassung von Membran-gebundenem β -Catenin in das Cytoplasma zur Folge hat und entweder dieses degradiert oder in den Nukleus transloziert wird. In Zellkulturmodellen konnte bereits gezeigt werden, dass Cadherine als Antagonisten zu dem Wnt-Signalweg fungieren, indem β -Catenin an der Membran gebunden gehalten wird. In E-Cadherin-negativen Zellen kam es zu einer Akkumulation von freiem β -Catenin. Wurde E-Cadherin in diesen Zellen re-exprimiert, so wurde die Transaktivierung Wnt-relevanter Gene durch den Komplex zwischen β -Catenin und TCF/LEF gehemmt [182]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein erhöhter β -Catenin-Gehalt in gingivalen Epithelzellen nach einer Infektion mit *P. gingivalis* (MOI 100) beobachtet (Abbildung 4.4). Zusätzlich konnte mithilfe einer Zell-Fraktionierung die Verteilung innerhalb der Zelle bestimmt werden: Während der Proteingehalt von β -Catenin im Cytoplasma abnimmt, erhöht er sich im Nukleus als Antwort auf *P. gingivalis* (Abbildung 4.5). Vor kurzem konnten Zhou *et al.* [183] ähnliche Ergebnisse verzeichnen: β -Catenin wurde nach einer Stimulation mit dem parodontopathogenen Bakterium im Zellkern akkumuliert. Ferner konnte mithilfe eines Luciferase-Reporter-Assays eine erhöhte Aktivität des TCF/LEF-Promotors beobachtet werden [183].

Der Umstand, dass β -Catenin im Zellkern akkumuliert, kann nicht ausschließlich über die Reduktion von E-Cadherin erklärt werden, da ursprünglich Cadherin-gebundenes β -Catenin in einem Destruktionskomplex im Cytoplasma abgebaut werden kann. Dieser beinhaltet die Glykogen-Synthase-Kinase 3- β (GSK3- β), die β -Catenin phosphoryliert und somit für den proteasomalen Abbau vorbereitet [91]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass GSK3- β bereits nach einer einstündigen Stimulation mit *P. gingivalis* verstärkt phosphoryliert bzw. inaktiviert vorlag, so dass geschlussfolgert werden kann, dass die Reduktion von E-Cadherin aufgrund von *P. gingivalis* in immortalisierten gingivalen Epithelzellen zu einem Lösen von β -Catenin aus dem Cadherin-Catenin-Komplex führt. Aufgrund der Inaktivierung von GSK3- β wird frei vorliegendes β -Catenin nicht degradiert und kann in den Nukleus transloziert werden.

Von weitergehendem Interesse ist außerdem die Frage, wodurch die Phosphorylierung von GSK3- β ausgelöst wurde. Wie bereits zuvor beschrieben hat die Aktivierung des Wnt-Signalweges eine Hemmung von GSK3- β zur Folge. Aber auch die Proteinkinase B/Akt katalysiert diese Inaktivierung [92, 94]. Vor kurzem konnte bereits von Zhou *et al.* [183] gezeigt werden, dass die Stabilisierung von β -Catenin durch *P. gingivalis* nicht auf einer

Erhöhung der Wnt-Expression beruht, so dass in dieser Arbeit der Phosphorylierungsstatus von Akt untersucht wurde: *P. gingivalis* führte in dem eingesetzten Zellkulturmodell zu einer Aktivierung der Proteinkinase B/Akt, die wiederum zu der Inhibierung von GSK3- β führen könnte (Abbildung 4.7).

Neben der Stabilisierung von β -Catenin über den Akt/GSK3- β -Signalweg spielt weiterhin S100A7 eine Rolle. Aus dem biphasischen Expressionsmuster des antimikrobiellen Peptids lässt sich ableiten, dass die Überexpression in präinvasiven *Carcinoma in situ* (CIS) einen hemmenden Einfluss auf die Tumorprogression zu invasiven Karzinomen hat und S100A7 somit als putativer Tumorsuppressor gilt [184]. Im Hinblick auf β -Catenin zeigten Zhou *et al.* [170], dass S100A7 einen Abbau von β -Catenin herbeiführt. Wurde die Expression von S100A7 mittels RNA-Interferenz herunterreguliert, so gab es eine verstärkte β -Catenin-Signalübertragung. Ferner konnte gezeigt werden, dass eine negative Rückkopplungsschleife besteht, da β -Catenin die Expression von S100A7 negativ beeinflusst [170]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression von S100A7 nach einer Stimulation mit *P. gingivalis* herunterreguliert. Zur Überprüfung des Effektes wurden die immortalisierten gingivalen Epithelzellen in dieser Arbeit mit S100A7 stimuliert und der β -Catenin-Gehalt im Cytosol und Zellkern untersucht. Im Vergleich zu der nicht-stimulierten Kontrolle gab es sowohl im Cytosol, als auch im Nukleus, eine Verminderung von β -Catenin. Die Ergebnisse bestätigen den von Zhou *et al.* [170] postulierten Mechanismus und lassen den Schluss zu, dass *P. gingivalis* zum einen über eine Aktivierung des Akt/GSK3- β -Signalweges und zum anderen über eine Verminderung von S100A7 eine Stabilisierung von β -Catenin herbeiführt.

GSK3- β ist in der Zelle nicht nur für die Phosphorylierung von β -Catenin verantwortlich, sondern bewirkt auch einen Abbau des EMT-assoziierten Transkriptionsfaktors Snail1 (Snail) [104]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Erhöhung der mRNA-Expression von Snail und eine Akkumulation des Proteins im Zellkern nachgewiesen werden. Snail gilt als essentieller Transkriptionsfaktor bei der Initiation einer epithelial-mesenchymalen Transition, da durch diesen die Transkription von E-Cadherin gehemmt wird [63]. Snail wird nicht nur auf transkriptionaler Ebene, sondern auch aufgrund von posttranslationalen Modifikationen reguliert. Auf transkriptionaler Ebene sind Wachstumsfaktoren (z. B. FGF (*fibroblast growth factor*), TGF- β (*transforming growth factor- β*) und EGF (*epidermal growth factor*)), Integrine, Proteine des Wnt-Signalweges und Notch zu einer Aktivierung der Snail-Expression in der Lage [185], wohingegen eine weitere Regulierung über die Lokalisation des Proteins erfolgt: GSK3- β bewirkt über eine Phosphorylierung an den Stellen Serin-97 und -101 einen nukleären Export in das Cytoplasma. Phosphorylierungen an Serin-108, -112, -116 und -120 führen zu einer Ubiquitin-ausgelösten Degradierung [104]. Verhindert wird eine Inhibierung des Transkriptionsfaktors unter anderem durch den

Wnt/ β -Catenin- und PI3K/Akt-Signalweg. Als Folge einer Aktivierung dieser Signalwege wird GSK3- β über eine Phosphorylierung inaktiviert und die Interaktion zwischen GSK3- β und Snail verhindert [186]. Bachelder *et al.* [187] zeigten, dass GSK3- β aktiv vorliegen muss, um eine epithelial-mesenchymale Transition zu verhindern. Da in dieser Arbeit β -Catenin, als Bestandteil des Wnt-Signalweges, im Zellkern akkumuliert und Akt aktiviert vorliegt sowie GSK3- β inaktiviert ist, liegt die Vermutung nahe, dass Snail über diese Signalwege während einer *P. gingivalis*-Infektion stabilisiert wird (Abbildung 5.1 (B)).

***P. gingivalis* generiert möglicherweise eine Subpopulation an Stammzellen**

Eine epithelial-mesenchymale Transition generiert neben mesenchymalen Zellen auch eine Subpopulation an Tumorstammzellen, die z. B. über die Marker Sox2, Oct3/4 und Nanog charakterisiert werden können [76–79]. Erste Ergebnisse im Hinblick auf eine *P. gingivalis*-ausgelöste Tumorstammzell-Formation zeigen, dass die Gene der Schlüssel-Regulatoren bei der Selbsterneuerung embryonaler Stammzellen Sox2, Oct3/4 und Nanog in OKF6/hTERT-1-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit *P. gingivalis* verstärkt exprimiert wurden (Abbildung 4.8 und 5.1(C)). Es konnte schon gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Tumoren hoch exprimiert sind und in Zusammenhang mit der Aggressivität und den Heilungschancen des Tumors stehen [81–84]. Dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg wurde eine besondere Rolle innerhalb der Regulation von Stammzellen und Tumorstammzellen (CSCs) zugesprochen [188, 189]. Studien zeigten, dass der Signalweg zu der Induktion und Erhaltung von CSCs beiträgt [190, 191]. *P. gingivalis* könnte möglicherweise über eine Reduktion von E-Cadherin und einer Inhibition von GSK3- β mit folgender Stabilisierung von β -Catenin Tumorstammzell-Charakteristika ausbilden.

Um die Frage der Bildung von Tumorstammzellen eindeutig zu beantworten, bedarf es weiterer Untersuchungen: Neben der Expression der Stammzellmarker Oct3/4, Sox2 und Nanog ist der Nachweis weiterer Marker unerlässlich. Kürzlich wurde ein CD44^{high}/CD24^{low}-Phänotyp (CD = *cluster of differentiation*) als Charakteristikum oraler Tumorstammzellen beschrieben [192], der durchflusszytometrisch nachgewiesen werden könnte.

5.2 Onkogene Transformation von Epithelzellen durch *P. gingivalis*

Die vorliegende Arbeit untersuchte ferner, inwieweit *P. gingivalis* neben dem Einleiten einer EMT eine maligne Transformation begünstigen kann und welche Merkmale einer

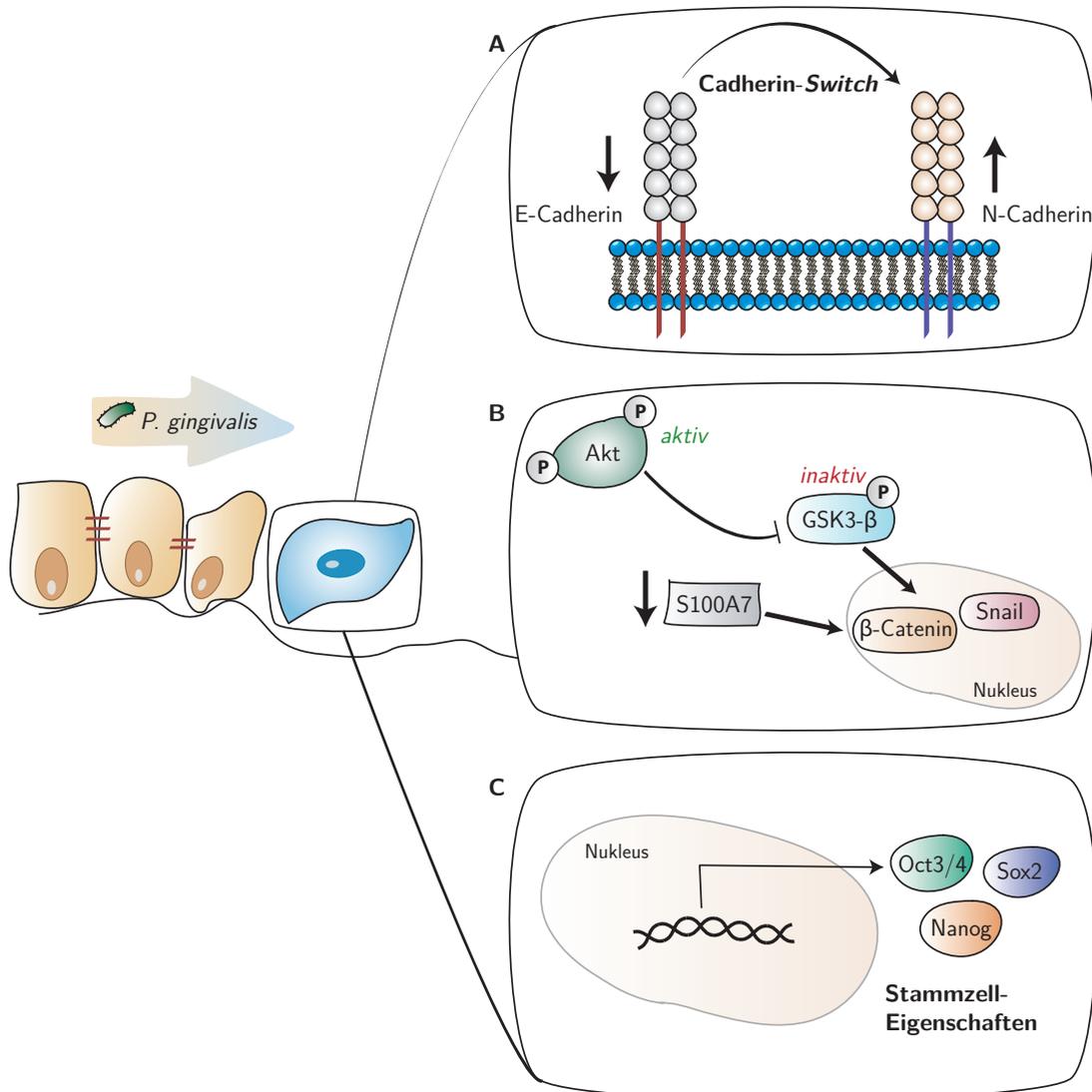


Abbildung 5.1 – *P. gingivalis* löst eine EMT in OKF6/hTERT-1-Zellen aus. (A) Cadherin-Switch von E- zu N-Cadherin. (B) Aktivierung des Akt/ GSK3- β -Signalweges und Herunterregulierung von S100A7 mit folgender Stabilisierung von β -Catenin und Snail im Zellkern. (C) Genexpressions-Erhöhung der Stammzell-Regulatoren Oct3/4, Sox2 und Nanog.

Krebserkrankung Ausprägung erfahren. Basierend auf den von Hanahan *et al.* [24] bezeichneten Charakteristika eines Tumors wurden Migration und Invasivität, Zell-Wachstum und -Proliferation, Angiogenese und die Apoptose bzw. Anoikis untersucht. Ferner wurden erste Experimente bezüglich einer Inflammassom-Aktivierung von Makrophagen, die Bestandteil der Tumor-Mikroumgebung sind, durchgeführt.

***P. gingivalis* erhöht die Migration und Invasivität**

Von besonderer Bedeutung bei der Migration und Invasivität von Tumorzellen sind Matrixmetalloproteasen (MMPs), die in der Lage sind, Proteine auf der Zelloberfläche und Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) zu spalten, so dass die Basalmembran degradiert wird und benachbarte Gewebe infiltriert werden können [193]. Matrixmetalloproteasen werden als inaktive Pro-Formen sezerniert und in die aktive Form prozessiert. Innerhalb der Matrixmetalloproteasen spielen MMP-2 und MMP-9 bei der Invasivität und somit der Metastasierung eines Karzinoms eine große Rolle.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass *P. gingivalis* sowohl die Genexpression, als auch die Sekretion und Aktivierung von MMP-9 erhöhte (Abbildung 4.9). Es konnte in vorhergehenden Studien bereits gezeigt werden, dass *P. gingivalis* und dessen Lipopolysaccharid die Pro-Form von MMP-9 *in vitro* induziert [194, 195]. Ferner wurde gezeigt, dass das parodontopathogene Bakterium neben der Produktion der Pro-Form auch die Aktivierung von Pro-MMP-9 in aktives MMP-9 in Monozyten und oralen Tumorzellen fördert [196, 197]. In der Zelle kommen natürlicherweise Inhibitoren der Matrixmetalloproteasen vor, die auch als TIMPs (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) bezeichnet werden. Von den vier existierenden TIMPs sind TIMP-1 und TIMP-3 in der Lage, MMP-9 zu binden und somit zu inhibieren [198]. Da bei einer Gelatine-Zymographie, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, die MMP/TIMP-Komplexe gelöst werden, kann anhand der Ergebnisse keine Aussage darüber gemacht werden, inwieweit die erhaltene Aktivierung von MMP-9 tatsächlich *in vitro* vorliegt. Aus diesem Grund wurde anhand eines *Transwell*-Assays die Migration und mittels Matrigel-Assay die Invasion der Zellen in eine künstliche extrazelluläre Matrix bestimmt: Die Migration der Zellen zu dem Chemoattraktant FKS verstärkte sich nach einer Stimulation mit *P. gingivalis* (Abbildung 4.10). Ähnlich verhält es sich bei der Invasivität der Zellen: Während die nicht-stimulierten OKF6/hTERT-1-Zellen keinerlei Fähigkeit besaßen in das Matrigel zu invadieren, konnte dagegen nach einer Stimulation mit *P. gingivalis* eine verstärkte Invasion beobachtet werden (Abbildung 4.11). Zhou *et al.* [170] erklärten die Produktion und Aktivierung der Pro-Form von MMP-9, indem zum einen verschiedene Signalkaskaden durch *P. gingivalis* in Gang gesetzt werden, zum anderen die von dem Bakterium gebildeten Gingipaine die

Pro-Form spalten können. Da in der vorliegenden Arbeit der PI3K/Akt-Signalweg durch *P. gingivalis* aktiviert wird, wurde hinsichtlich der Matrixmetalloproteasen untersucht, ob der Signalweg auch hier eine Rolle spielt. Mithilfe des PI3K-Inhibitors LY294002 wurden die immortalisierten gingivalen Epithelzellen präinkubiert und die Produktion und Aktivierung der Gelatinase MMP-9 mittels Gelatine-Zymographie bestimmt. Die Ergebnisse deuten auf eine Reduktion der MMP-9-Produktion nach Hemmung der PI3-Kinase hin (Abbildung 4.9 (C)), so dass geschlussfolgert werden kann, dass der PI3K/Akt-Signalweg die Synthese der MMPs partiell reguliert, jedoch keinen Einfluss auf die Aktivierung der Pro-Formen hat.

***P. gingivalis* hat einen Einfluss auf Zell-Wachstum und -Proliferation**

Damit eine Zellteilung stattfinden kann, werden anabole Zellprozesse in Gang gesetzt: Proteine werden synthetisiert und das Zellwachstum gesteuert. Um ein stetiges Wachstum einer Zelle zu begünstigen, sind Nährstoffe, unter anderem in Form von Aminosäuren, essentiell. Der mTOR-Komplex fungiert als Regulator der Protein-Biosynthese und liegt im pathologischen Kontext dereguliert vor, so dass es zu unkontrolliertem Zellwachstum und -Proliferation kommt.

MTOR (*mammalian target of rapamycin*) ist eine Serin-Threonin-Kinase, die von der Proteinkinase B/Akt phosphoryliert und somit aktiviert wird. Es wird postuliert, dass *P. gingivalis* über die Aktivierung von Akt eine Phosphorylierung von mTOR verursacht, so dass die Zielmoleküle von mTOR reguliert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Hypothese, indem Phosphorylierungszustände der beteiligten Proteine untersucht wurden (Abbildung 4.14). Neben einer Phosphorylierung von mTOR kam es zu einer Aktivierung der S6-Kinase und des ribosomalen Proteins S6 und einer Inhibition des mTOR-Inhibitors PRAS40. Stafford *et al.* [199] erhielten gegensätzliche Ergebnisse: Eine Stimulation der Zellen mit *P. gingivalis* für vier Stunden resultierte in einem Abbau von totalem und phosphoryliertem mTOR und einer Reduktion von aktivem Akt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte nach einer sechsständigen Inkubation beobachtet, jedoch wurde nach vier Stunden keine Abnahme der Phosphorylierung beobachtet. Bei der eingesetzten Zelllinie in der Arbeit von Stafford *et al.* [199] handelt es sich um OKF6/hTERT-2-Zellen, die sich von den in dieser Arbeit verwendeten OKF6/hTERT-1-Zellen in Bezug auf p16^{INK4a} (p16) unterscheiden. Während OKF6/hTERT-1-Zellen p16 noch exprimieren, kann bei OKF6/hTERT-2-Zellen kein p16 detektiert werden [200]. P16 gilt sowohl als Zellzyklusinhibitor [201], da die Aktivität Cyclin-abhängiger Kinasen reguliert wird, als auch als Tumorsuppressor [202]. Die kontroversen Ergebnisse lassen den

Schluss zu, dass p16 verantwortlich dafür ist, inwieweit *P. gingivalis* den mTOR-Signalweg innerhalb der Zelle moduliert.

Aufgrund einer deregulierten nutritiven Versorgung wird es der Zelle ermöglicht, sich häufiger zu teilen. Die immortalisierten gingivalen Epithelzellen zeigten eine Erhöhung der Zell-Proliferation und des Markers für sich teilende Zellen (Ki-67) nach einer Stimulation mit *P. gingivalis* (Abbildung 4.13). Kubinowa *et al.* [203] und Pan *et al.* [204] führten die erhöhte Zell-Proliferation auf einen Effekt von *P. gingivalis* auf den Zellzyklus zurück. Sie beobachteten einen G1-/S-Phasen-Übergang, so dass davon auszugehen war, dass der Zellzyklus durch *P. gingivalis* dereguliert wird [203, 204].

Die Erhöhung der Zell-Proliferation könnte möglicherweise auch anhand von TGF- β 1 erklärt werden. Nach einer Infektion mit dem in dieser Arbeit eingesetzten oralpathogenen Bakterium wurde eine vermehrte Sekretion von TGF- β 1 detektiert (Abbildung 4.12 (A)). TGF- β besitzt einen dualen Charakter, indem es in der Zelle entweder als Tumorsuppressor oder als Onkogen fungiert. Zu den suppressiven Effekten zählt die Hemmung der Zell-Proliferation und die Induktion der Apoptose, wohingegen die Aufgaben als Tumorpromotor in der Induktion einer epithelial-mesenchymalen Transition, der Zell-Proliferation, der Bildung neuer Blutgefäße, Zell-Migration und -Invasion, Immunsuppression und Metastasierung liegen. Tumorzellen produzieren große Mengen an TGF- β und umgehen den Tumor-suppressiven Effekt, indem ein Wechsel zu einem Tumor-fördernden TGF- β vonstatten geht, bei dem genetische und epigenetische Veränderungen eine Rolle spielen [205]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen auf eine Tumor-fördernde Wirkung von TGF- β hin, da eine Stimulation mit *P. gingivalis* eine vermehrte Sekretion des Wachstumsfaktors zur Folge hatte (Abbildung 4.12 (A)). Das zuvor beschriebene Einleiten einer epithelial-mesenchymalen-Transition durch *P. gingivalis* und die Erhöhung der Zell-Proliferation könnte durch TGF- β ausgelöst worden sein.

***P. gingivalis* fördert die Angiogenese über die Regulation von VEGF**

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) gilt als wichtiger angiogener Faktor, der die Bildung neuer Blutgefäße fördert [43]. Die Neovaskularisation spielt eine große Rolle für die Versorgung des Tumors, da eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen für ein schnelles Wachstum essentiell ist. Zusätzlich kann VEGF eine EMT auslösen, indem die Snail1-Expression induziert sowie GSK3- β inhibiert wird. Im Gegenzug verstärkt der EMT-assoziierte Transkriptionsfaktor Snail1 die Expression von VEGF, so dass eine positive Rückkopplungsreaktion vorliegt [206].

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmalig, dass gingivale Epithelzellen als Antwort auf eine *P. gingivalis*-Stimulation den angiogenen Faktor VEGF sezernieren (Abbildung 4.12). Kürzlich wurde anhand von immunhistochemischen Untersuchungen an gingivalen Gewebeproben von Patienten mit einer chronischen Parodontitis eine signifikante Erhöhung von VEGF im Vergleich zu gesunder Gingiva beobachtet [207]. Die Ursache für die vermehrte Sekretion von VEGF könnte zum einen in der Akkumulation von Snail im Zellkern begründet liegen, zum anderen in der Aktivierung von MMP-9 durch *P. gingivalis*. Bergers *et al.* [208] zeigten eine Wirkung der Gelatinase MMP-9 auf den angiogenen *Switch* während der Entstehung eines Tumors [208]. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass VEGF zum einen autokrin die epithelial-mesenchymale Transition der OKF6/hTERT-1-Zellen beeinflussen kann und zum anderen parakrin auf Endothelzellen der Tumor-Mikroumgebung wirken kann und somit die Bildung neuer Blutgefäße fördert. Die Frage, mit der sich unsere Arbeitsgruppe nun beschäftigt, ist, inwieweit *P. gingivalis* auf Endothelzellen wirkt und ob es neben dem indirekten Effekt über die Sekretion von VEGF von gingivalen Epithelzellen auch einen direkten Effekt des Bakteriums auf Endothelzellen gibt.

***P. gingivalis* verhindert den programmierten Zelltod und verleiht den Zellen eine Anoikis-Resistenz**

Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist ein genetisch programmierter Vorgang, der zu einem kontrollierten Absterben von Zellen führt. Er wird durch zwei Signalwege ausgelöst: intrinsisch bzw. Stress-aktiviert und extrinsisch bzw. Rezeptor-aktiviert [209]. Beide Signalwege aktivieren Caspasen, die daraufhin zelluläre Komponenten spalten und eine Apoptose einleiten. Bei dem intrinsischen Apoptose-Signalweg werden pro-apoptotische Proteine der Bcl-2-Familie gebildet, die die äußere mitochondriale Membran permeabilisieren, so dass Cytochrom c in das Cytoplasma entlassen wird und dort Caspase-Proteasen aktiviert [210, 211]. Der extrinsische Signalweg beruht auf Todes-Rezeptoren (*death receptors*), die einen Signalkomplex bilden, der wiederum Caspase-8 aktiviert [212]. Beiden Apoptose-Wegen ist gemein, dass die DNA degradiert wird und der Zelltod eintritt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine Inhibition der Apoptose durch *P. gingivalis* hin, indem das anti-apoptotische Protein Bcl-2 nach Infektion mit dem parodontopathogenen Bakterium vermehrt gebildet und das pro-apoptotische Protein Bad verstärkt phosphoryliert und somit inaktiviert wurde (Abbildung 4.15). Da bereits bekannt ist, dass die Proteinkinase B/Akt zu einem Überleben der Zellen führt, indem das pro-apoptotische Protein Bad durch diese phosphoryliert wird [28], liegt die Vermutung nahe, dass die

Inaktivierung von Bad durch *P. gingivalis* auf der in dieser Arbeit gezeigten Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges beruht. Ferner konnte, wie zuvor beschrieben, gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von Snail erhöht wurde und eine Akkumulation im Zellkern erfolgte (Abbildung 4.6). Snail induziert nicht nur eine epithelial-mesenchymale Transition, sondern hat auch die Funktion, Zellen vor dem extrinsisch-ausgelösten Zelltod zu schützen [213]. Die Publikationen bezüglich des Apoptoseverhaltens von gingivalen Epithelzellen als Antwort auf *P. gingivalis* sind kontrovers: An primären humanen gingivalen Epithelzellen wurde eine Induktion der Apoptose durch die Gingipaine von *P. gingivalis* beobachtet [214]. Nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen mit dem parodontopathogenen Bakterium konnte eine Erhöhung des Aktivitätslevels von Caspase-3 und eine DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden, wobei lediglich die Gingipaine ursächlich für die Apoptose waren, so dass davon ausgegangen wurde, dass die Invasion der Bakterien in die Zelle keinen Einfluss auf das Apoptoseverhalten der gingivalen Epithelzellen hat. In einer weiteren Studie von Nakhjiri *et al.* [215] wurde jedoch anhand von primären humanen gingivalen Epithelzellen eine Inhibition der Apoptose gezeigt. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit *P. gingivalis* wurde eine Erhöhung von Bcl-2 auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen im Vergleich zu der nicht-stimulierten Kontrolle. Unterstützend zu den Ergebnissen von Nakhjiri *et al.* [215] konnten Yilmaz *et al.* [216] zeigen, dass *P. gingivalis* die Proteinkinase B/Akt phosphoryliert, was einer Aktivierung gleichzusetzen ist, und somit den intrinsischen Apoptose-Signalweg inhibiert, indem keine Veränderung der mitochondrialen Permeabilität, der Sekretion von Cytochrom c und der DNA-Fragmentierung vorliegt [216]. Ferner konnte bereits eine direkte Verbindung zwischen der Aktivierung von Akt und einer verstärkten Phosphorylierung des pro-apoptotischen Proteins Bad aufgrund einer Infektion mit *P. gingivalis* hergestellt werden [217], was die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützt. Auch Mao *et al.* [218] haben eine Blockierung des intrinsischen apoptotischen Signalweges als Antwort auf *P. gingivalis* feststellen können, indem sie gezeigt haben, dass Caspase-3 inhibiert und zudem neben der Aktivierung des PI3K/Akt- auch der JAK/Stat-Signalweg durch das parodontopathogene Bakterium moduliert wird [218].

Neben der Apoptose spielt die Anoikis als Apoptose, die durch den Verlust von Zell-Matrix-Verbindungen ausgelöst wird, eine große Rolle. Im Laufe einer epithelial-mesenchymalen Transition verlieren die Epithelzellen ihre Polarität und lösen sich aus ihrem Zellverband, so dass sowohl Zell-Zell- als auch Zell-Matrix-Verbindungen gelöst werden. Normalerweise reagieren Anoikis-sensitive Zellen mit dem Zelltod, wohingegen Anoikis-resistente Zellen überleben. In gesunden Zellen spielt die Anoikis eine große Rolle, da so gewährleistet wird, dass differenzierte Zellen nicht an ungeeignete Stellen im Körper gelangen und zu neoplastischem Wachstum führen können. In Bezug auf die Metastasierung eines Tumors ist die Anoikis-Resistenz ein unerlässliches Charakteristikum maligner Zellen [219].

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine Infektion mit *P. gingivalis* zu einer Anoikis-Resistenz in den immortalisierten gingivalen Epithelzellen führt, da die Zellen auf poly-HEMA-beschichteten Zellkulturschalen unter *P. gingivalis*-Einfluss keine Apoptose eingingen (Abbildung 4.16 (A)). Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass *P. gingivalis* über das Auslösen einer EMT eine Anoikis-Resistenz hervorruft. Gestützt werden die Ergebnisse durch die Erkenntnisse von Onder *et al.* [220] und Derksen *et al.* [221]: Mittels RNA-Interferenz wurde E-Cadherin in immortalisierten Epithelzellen der Brustdrüsen stillgelegt, woraufhin die Zellen in der Lage waren einer Anoikis zu entgegen [220]. In einem Tumor-Mausmodell der Brust wurde gezeigt, dass die Zellen, die E-Cadherin exprimierten, nach dem Verlust von Zell-Matrix-Verbindungen in Apoptose gingen, wohingegen E-Cadherin-negative-Zellen eine Anoikis-Resistenz aufwiesen [221]. Neben der Reduktion von E-Cadherin erfolgt bei der EMT eine Zunahme des mesenchymalen Markers N-Cadherin. In Melanomzellen wurde dargestellt, dass N-Cadherin eine Anoikis verhindern kann, indem der PI3K/Akt-Signalweg aktiviert wird, was zu einer Inaktivierung des pro-apoptotischen Proteins Bad und einer Akkumulation von β -Catenin führt [222].

Die Induktion einer Anoikis kann durch eine Vielzahl von Faktoren erfolgen und ist Gegenstand aktueller Forschung. Ein Erklärungsversuch bezieht sich auf das Protein Ankyrin-G, welches das Aktin-Cytoskelett mit E-Cadherin verknüpft, und als Folge einer epithelial-mesenchymalen Transition supprimiert wird, so dass das Protein NRAGE (auch als MAGED1 bezeichnet) in den Kern transloziert wird und dort den Tumorsuppressor p14ARF reprimiert [223]. Eine weitere Erklärung beruht auf einer Stabilisierung von β -Catenin mit folgender Wnt-Aktivierung [220]. Weiterhin spielt der PI3K/Akt-Signalweg eine große Rolle, da pro-apoptotische Proteine wie Bad oder GSK3- β inhibiert werden, so dass das Überleben der Zelle gefördert wird. Die Korrelation zwischen der EMT und einer Resistenz gegenüber Anoikis spiegelt sich ferner in dem Vorhandensein gleicher Regulatoren wieder. Der Transkriptionsfaktor Snail kann eine EMT induzieren, indem die Transkription von E-Cadherin reprimiert wird und begünstigt gleichzeitig eine Anoikis-Resistenz durch die Suppression von Caspase-3 und die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges [213]. Anhand von Zellen der Brustdrüsen (MCF10A) wurde die Notwendigkeit des EGF-Rezeptors für das Überleben der Zellen gezeigt. Verloren die Zellen ihre Zell-Matrix-Verbindungen, so wurde vermindert EGF-Rezeptor auf der Zelloberfläche exprimiert, was mit einer Erhöhung von Bcl-2 einherging. In einer Tumorzelllinie der Brust hingegen konnte gezeigt werden, dass der Verlust der Verbindung zu der extrazellulären Matrix (EZM) keine Veränderung des EGFR-Levels mit sich führte und keine Anoikis eintrat. Eine Überexpression des EGF-Rezeptors führte in den MCF10A-Zellen zu einer Anoikis-Resistenz [168]. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass in immortalisierten gingivalen Epithelzellen als Antwort auf *P. gingivalis* eine Hochregulierung des EGF-Rezeptors

erfolgte, so dass von einem ähnlichen Mechanismus wie in den MCF10A-Zellen auszugehen ist. Weiterhin konnte eine vermehrte Expression von c-Met beobachtet werden. Für ovariäre Tumorzellen wurde die Vermutung aufgestellt, dass c-Met direkt mit PI3K interagieren kann, so dass c-Met eine Rolle bei dem Zell-Überleben zukommt [169].

Eine Infektion von immortalisierten gingivalen Epithelzellen mit *P. gingivalis* führte in der vorliegenden Arbeit zu einer Inhibition der Apoptose, indem Snail und pro- und anti-apoptotische Proteine reguliert wurden. Da die Zellen als Antwort auf eine bakterielle Stimulation einer epithelial-mesenchymalen Transition unterliegen, verlieren sie ihre Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen, so dass sie dem Prozess der Anoikis erliegen könnten. *P. gingivalis* scheint jedoch über die Aktivierung der Proteinkinase B/Akt und der Überexpression des EGF-Rezeptors (EGFR) und c-Met zu einer Stabilisierung von Snail und β -Catenin zu führen und gleichzeitig über den Cadherin-Switch von E-Cadherin zu N-Cadherin eine Anoikis-Resistenz in immortalisierten gingivalen Epithelzellen auszulösen.

Als Antwort auf *P. gingivalis* erfolgt keine Inflammasom-Aktivierung in Makrophagen

Die Umgebung eines Tumors, unter anderem bestehend aus Immunzellen, leistet einen Beitrag zu der Ausbildung einer Tumor-fördernden Inflammation. Makrophagen sind bei einer bakteriellen Infektion Hauptproduzenten von IL-1 β über eine Inflammasom-Aktivierung [224]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Aktivierung eines Inflammasoms in THP-1-Makrophagen als Antwort auf eine Stimulation mit *P. gingivalis* analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass das oralpathogene Bakterium zu einer Repression des Inflammasoms führt, indem weder das Cytokin IL-1 β sezerniert noch Caspase-1 aktiviert wurde. Ferner konnte keine Pyroptose beobachtet werden, wohingegen die eingesetzte Positivkontrolle (Nigericin) zu einem Zelltod führte (Abbildung 4.18). Gestützt werden die Ergebnisse durch Experimente von Taxman *et al.* [225], die ebenfalls eine Suppression des Inflammasoms als Antwort auf *P. gingivalis* beschreiben. Im Widerspruch dazu zeigten Park *et al.* [226] eine Inflammasom-Aktivierung durch *P. gingivalis*. Differenzierte THP-1-Zellen sezernierten Dosis- und Zeit-abhängig IL-1 β und aktive Caspase-1 nach einer Infektion mit *P. gingivalis*, was zu einem pyroptotischen Zelltod führte [226]. Die kontroversen Studien lassen keine eindeutigen Schlüsse bezüglich der Inflammasom-Aktivierung und IL-1 β -Produktion als Antwort auf das parodontopathogene Bakterium in Makrophagen zu. Auch im Allgemeinen wird die Rolle des Inflammasoms hinsichtlich der Tumorentstehung und -progression nicht klar: Entweder verstärkt eine Aktivierung des Inflammasoms das Tumorstadium und die Metastasierung oder sie bietet Schutz vor der Tumorentstehung. Guo *et al.* [227] schlussfolgern, dass Inflammasome die Entwicklung

eines Tumors fördern oder hemmen können, je nachdem welches Tumormodell und welche experimentellen Bedingungen gewählt werden. Angesichts dessen sind weitere Experimente nötig, um die Rolle des Inflammasoms und IL-1 β in Bezug auf eine *P. gingivalis*-ausgelöste maligne Transformation zu beleuchten. Bezüglich einer Infektion mit dem parodontopathogenen Bakterium konnte bereits evaluiert werden, dass *P. gingivalis* in Makrophagen invadieren kann [228], so dass eine Suppression des Inflammasoms eine replikative Nische für *P. gingivalis* bietet und so dessen Persistenz innerhalb der Immunzelle gewährleistet wird (Abbildung 5.2).

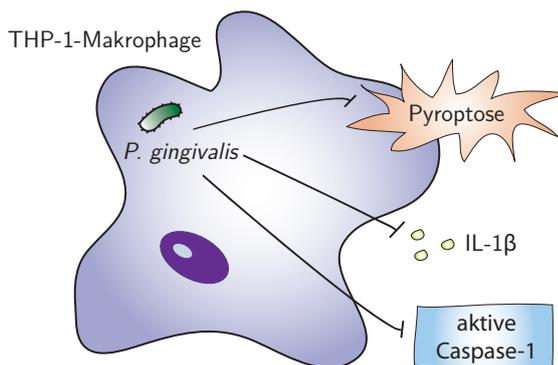


Abbildung 5.2 – *P. gingivalis* hemmt die Aktivierung eines Inflammasoms in differenzierten THP-1-Zellen. Das intrazellulär-vorkommende Bakterium *P. gingivalis* verhindert eine inflammatorische Antwort von THP-1-Makrophagen, indem keine Sekretion von IL-1 β und aktiver Caspase-1 vorliegt und der pyroptotische Zelltod verhindert wird.

5.3 Fazit

Anhand der beschriebenen Ergebnisse lässt sich ein hypothetischer Mechanismus ableiten, mit dem eine mögliche onkogene Wirkung von *P. gingivalis* erklärt werden kann. *P. gingivalis* löst über die Repression von E-Cadherin und einer Aktivierung des Akt-Signalweges eine Stabilisierung von β -Catenin und Snail aus, so dass eine epithelial-mesenchymale Transition eingeleitet wird, die in einem fibroblastären Phänotyp resultiert. Eine zusätzliche Produktion und Aktivierung von Matrixmetalloproteasen fördert den Abbau der extrazellulären Matrix und somit die Migration und Invasion der Zellen in das umliegende Gewebe (Abbildung 5.3 (A)). Durch eine aberrante Zell-Proliferation und Sekretion von VEGF proliferieren die Zellen unkontrolliert und regen die Bildung neuer Blutgefäße an (Abbildung 5.3 (B)) und 5.3 (C)). Indem die Zellen eine Anoikis-Resistenz ausbilden, gelingt es ihnen, trotz Verlust der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen zu überleben (Abbildung 5.3 (D)). Im Laufe der *P. gingivalis*-ausgelösten EMT entwickeln sich

neben mesenchymalen Zellen auch Zellen mit Stammzell-Charakteristika, die in der Lage sind, die Tumorgenese zu initiieren. Weiterhin übt *P. gingivalis* einen Einfluss auf die Tumor-Mikroumgebung aus: In Makrophagen wird die Aktivierung eines Inflammasoms verhindert, so dass eine Persistenz von *P. gingivalis* gewährleistet wird, was zur Folge hat, dass durch das so erzeugte tolerogene Milieu die Effekte des Bakteriums anhalten (Abbildung 5.2).

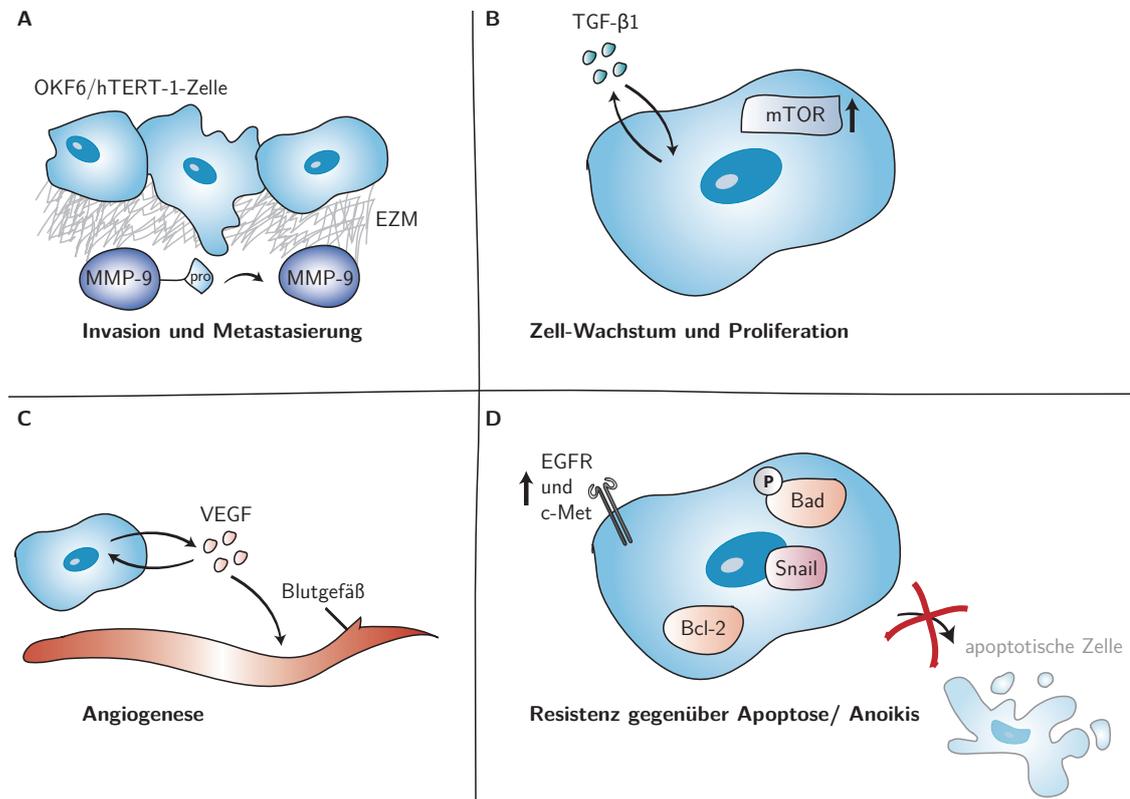


Abbildung 5.3 – *P. gingivalis* bildet Tumor-charakteristische Merkmale in OKF6/hTERT-1-Zellen aus. Eine Infektion mit *P. gingivalis* führte zu einer verstärkten Synthese und Aktivierung von MMP-9 und somit zu einer erhöhten Invasivität (A) und über die Sekretion von TGF- β 1 und der Aktivierung des mTOR-Signalweges zu Zell-Wachstum und Zell-Proliferation (B). Außerdem wurde vermehrt VEGF sezerniert, so dass von einem Einfluss auf die Angiogenese auszugehen ist (C). Die Resistenz gegenüber Apoptose und Anoikis wurde anhand einer erhöhten Expression von EGFR und c-Met, Snail und Bcl-2 sowie einer Phosphorylierung des pro-apoptotischen Proteins Bad ausgeprägt (D).

Die Ergebnisse der Arbeit können als Grundlage für Studien mit primären gingivalen Epithelzellen und *P. gingivalis*-Isolaten aus Patienten dienen. Denn es ist zu beachten, dass es sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten *in vitro*-Zellkulturmodell um immortalisierte gingivale Epithelzellen handelt, bei denen die Telomere durch eine Aktivierung der Telomerase stabilisiert werden (hTERT). Charakterisierte immortalisierte Zelllinien erzeugen

einheitliche und reproduzierbare Effekte, wohingegen primäre Zellen eine hohe geno- und phänotypische Variabilität aufgrund der verschiedenen Spender aufweisen, so dass vorab eine genotypische Charakterisierung der eingesetzten primären Zellen erfolgen muss. Sollte anhand von Patienten-Material bestätigt werden, dass *P. gingivalis* ein transformatorisches Potential besitzt, könnten therapeutische und diagnostische Einsätze hinsichtlich einer chronischen Parodontitis und eines oralen Plattenepithelkarzinoms neu überdacht werden: Eine frühzeitige Erkennung einer Infektion mit *P. gingivalis* und einhergehender Therapie könnte somit das Risiko einer Krebserkrankung verringern. In vorhergegangenen Studien konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass *P. gingivalis* in einem bereits etablierten Tumor-Zellmodell die Zell-Proliferation erhöht, was möglicherweise über eine Aktivierung des EGF-Signalweges durch antimikrobielle Peptide, die als Antwort auf das Bakterium gebildet werden, geschieht [41]. Die Verknüpfung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den publizierten lässt den Schluss zu, dass *P. gingivalis* nicht nur einen Einfluss auf die maligne Transformation von Epithelzellen hat, sondern auch auf die Progression eines bereits etablierten Tumors. Aus diesem Grund könnten therapeutische Maßnahmen zur Eliminierung des parodontopathogenen Bakteriums nicht nur zur Krebs-Prophylaxe, sondern auch zu dessen Behandlung einsetzbar sein.

Literaturverzeichnis

1. Kuper, H., Adami, H. O. & Trichopoulos, D. Infections as a major preventable cause of human cancer. *Journal of Internal Medicine* **248**, 171–183 (2000).
2. Preshaw, P. M., Seymour, R. A. & Heasman, P. A. Current concepts in periodontal pathogenesis. *Dental Update* **31**, 570–578 (2004).
3. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A. & Kent, R. L. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 134–144 (1998).
4. Balkwill, F. & Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357**, 539–545 (2001).
5. IARC. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. A review of carcinogens - Part B: Biological agents* 2011.
6. Kostic, A. D., Gevers, D., Pedamallu, C. S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A. M., Ojesina, A. I., Jung, J., Bass, A. J., Taberner, J., Baselga, J., Liu, C., Shivdasani, R. A., Ogino, S., Birren, B. W., Huttenhower, C., Garrett, W. S. & Meyerson, M. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Research* **22**, 292–298 (2012).
7. Rubinstein, M. R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G. & Han, Y. W. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesion. *Cell Host & Microbe* **14**, 195–206 (2013).
8. Dutta, U., Garg, P. K., Kumar, R. & Tandon, R. K. Typhoid carriers among patients with gallstones are at increased risk for carcinoma of the gallbladder. *American Journal of Gastroenterology* **95**, 784–787 (2000).
9. Shukla, V. K., Singh, H., Pandey, M., Upadhyay, S. K. & Nath, G. Carcinoma of the gallbladder - is it a sequel of typhoid? *Digestive Diseases and Sciences* **45**, 900–903 (2000).
10. Littman, A. J., White, E., Jackson, L. A., Thornquist, M. D., Gaydos, C. A., Goodman, G. E. & Vaughan, T. L. *Chlamydia pneumoniae* infection and risk of lung cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **13**, 1624–1630 (2004).

11. Koyi, H., Brandén, E., Gnarpe, J., Gnarpe, H. & Steen, B. An association between chronic infection with *Chlamydia pneumoniae* and lung cancer. A prospective 2-year study. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* **109**, 572–580 (2001).
12. Anttila, T., Koskela, P., Leinonen, M., Laukkanen, P., Hakulinen, T., Lehtinen, M., Pukkala, E., Paavonen, J. & Saikku, P. *Chlamydia pneumoniae* infection and the risk of female early-onset lung cancer. *International Journal of Cancer* **107**, 681–682 (2003).
13. Biarc, J., Nguyen, I. S., Pini, A., Gossé, F., Richert, S., Thiersé, D., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., Raul, F., P., K. J. & Schäller-Guinard, M. Carcinogenic properties of proteins with pro-inflammatory activity from *Streptococcus infantarius* (formerly *S. bovis*). *Carcinogenesis* **25**, 1477–1484 (2004).
14. Gold, J. S., Bayar, S. & Salem, R. R. Association of *Streptococcus bovis* bacteremia with colonic neoplasia and extracolonic malignancy. *Archives of Surgery* **139**, 760–765 (2004).
15. Ellmerich, S., Schöller, M., Durantou, B., Gossé, F., Galluser, M., Klein J., P. & Raul, F. Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. *Carcinogenesis* **21**, 753–756 (2000).
16. Chocolatewala, N., Chaturvedi, P. & Desale, R. The role of bacteria in oral cancer. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology* **31**, 126–131 (2010).
17. Meyer, M. S., Joshipura, K., Giovannucci, E. & Michaud, D. S. A review of the relationship between tooth loss, periodontal disease, and cancer. *Cancer Causes and Control* **19**, 895–907 (2008).
18. Hayashi, C., Gudino, C. V., Gibson, F. C. & Genco, C. A. Review: Pathogen-induced inflammation at sites distant from oral infection: bacterial persistence and induction of cell-specific innate immune inflammatory pathways. *Molecular Oral Microbiology* **25**, 305–316 (2010).
19. Tezal, M., Sullivan, M. A., Hayland, A., Marshall, J. R., Stoler, D., E., R. M., Loree, T. R., Rigual, N. R., Merzianu, M., Hauck, L., Lillis, C., Wactawski-Wende, J. & Scannapieco, F. A. Chronic periodontitis and the incidence of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **18**, 2406–2412 (2009).
20. Nagy, K., Sonkodi, I., Szöke, I., Nagy, E. & Newman, H. N. The microflora associated with human oral carcinomas. *Oral Oncology* **34**, 304–308 (1998).

21. Katz, J., Onate, M. D., Pauley, K. M., Bhattacharyya, I. & Cha, S. Presence of *Porphyromonas gingivalis* in gingival squamous cell carcinoma. *International Journal of Oral Science* **3**, 209–215 (2011).
22. Salaspuro, M. P. Acetaldehyde, microbes, and cancer of the digestive tract. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **40**, 183–208 (2003).
23. Weinberg, R. A. *The Biology of Cancer* (Hrsg. Weinberg, R. A.) (Garland Science, 2006).
24. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
25. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
26. Farrow, S. N. & Brown, R. New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Current Opinion in Genetics & Development* **6**, 45–49 (1996).
27. Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B. & Korsmeyer, S. J. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-x and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* **80**, 285–291 (1995).
28. Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. & Greenberg, M. E. Akt phosphorylation of Bad couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231–241 (1997).
29. Frisch, S. M. & Francis, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *Journal of Cell Biology* **124**, 619–626 (1994).
30. Meredith, J. E., Fazeli, B. & Schwartz, M. A. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Molecular Biology of the Cell* **4**, 953–961 (1993).
31. Kepp, O., Galluzzi, L., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Pyroptosis - a cell death modality of its kind? *European Journal of Immunology* **40**, 627–630 (2010).
32. Fink, S. L. & Cookson, B. T. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cellular Microbiology* **8**, 1812–1825 (2006).
33. Brough, D. & Rothwell, N. J. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1 β is cytosolic and precedes cell death. *Journal of Cell Science* **120**, 772–781 (2007).
34. Miao, E. A., Leaf, I. A., Treuting, P. M., Mao, D. P., Dors, M., Sarkar, A., Warren, S. E., Wewers, M. D. & Aderem, A. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nature Immunology* **11**, 1136–1142 (2010).

35. Winter, R. N., Kramer, A., Borkowski, A. & Kyprianou, N. Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer. *Cancer Research* **61**, 1227–1232 (2001).
36. Hu, B., Elinav, E., Huber, S., Booth, C. J., Strowig, T., Jin, C., Eisenbarth, S. C. & Flavell, R. A. Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 21635–21640 (2010).
37. Okamoto, M., Liu, W., Luo, Y., Tanaka, A., Cai, X., Norris, D. A., Dinarello, C. A. & Fujita, M. Constitutively active inflammasome in human melanoma cells mediating autoinflammation via caspase-1 processing and secretion of interleukin-1 β . *Journal of Biological Chemistry* **285**, 6477–6488 (2010).
38. Qin, Y., Ekmekcioglu, S., Liu, P., Duncan, L. M., Lizée, G., Poindexter, N. & Grimm, E. A. Constitutive aberrant endogenous interleukin-1 facilitates inflammation and growth in human melanoma. *Molecular Cancer Research* **9**, 1537–1550 (2011).
39. Tu, S., Bhagat, G., Cui, G., Takaischi, S., Kurt-Jones, E. A., Rickman, B., Betz, K. S., Penz-Oesterreicher, M., Bjorkdahl, O., Fox, J. G. & Wang, T. C. Overexpression of interleukin-1 β induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer cell* **14**, 408–419 (2008).
40. Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Teran, L. M., Schwichtenberg, L., Bartels, J., Maune, S. & Schröder, J.-M. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF- α , and IL-1 β , but not IL-6, induce human β -defensin-2 in respiratory epithelia. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **22**, 714–721 (2000).
41. Hoppe, T., Kraus, D., Novak, N., Probstmeier, R., Frentzen, M., Wenghoefer, M., Jepsen, S. & Winter, J. Oral pathogens change proliferation properties of oral tumor cells by affecting gene expression of human defensins. *Tumor Biology* **37**, 13789–13798 (2016).
42. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249–257 (2000).
43. Klagsbrun, M. & Soker, S. VEGF/VPF: the angiogenesis factor found? *Current Biology* **3**, 699–702 (1993).
44. Kalluri, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer* **3**, 422–433 (2003).
45. De Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N. & Williams, L. T. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* **255**, 989–991 (1992).

46. Yap, K. L., Ames, J. B., Swindells, M. B. & Ikura, M. Diversity of conformational states and changes within the EF-hand protein superfamily. *Proteins* **37**, 499–507 (1999).
47. Salama, I., Malone, P. S., Mihaimed, F. & Jones, J. L. A review of the S100 proteins in cancer. *European Journal of Surgical Oncology* **34**, 357–364 (2008).
48. Koboldt, D. C., Fulton, R. S. *et al.* Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature* **490**, 61–70 (2012).
49. Hunter, K. D., Parkinson, E. K. & Harrison, P. R. Profiling early head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer* **5**, 127–135 (2005).
50. Barbieri, C. E., Demichelis, F. & Rubin, M. A. Molecular genetics of prostate cancer: emerging appreciation of genetic complexity. *Histopathology* **60**, 187–198 (2012).
51. Flaherty, K. T., Hodi, F. S. & Fisher, D. E. From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nature Reviews Cancer* **12**, 349–361 (2012).
52. De Craene, B. & Berx, G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature Reviews Cancer* **13**, 97–110 (2013).
53. Nguyen, D. X., Bos, P. D. & Massagué, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature Reviews Cancer* **9**, 274–284 (2009).
54. Bosman, F. T., Havenith, M. & Cleutjens, J. P. Basement membranes in cancer. *Ultrastructural Pathology* **8**, 291–304 (1985).
55. Visse, R. & Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research* **92**, 827–839 (2003).
56. Egelblad, M. & Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer* **2**, 161–174 (2002).
57. Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Harti, I., Foltz, C. M. & Shafie, S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* **284**, 67–68 (1980).
58. Farquhar, M. G. & Palade, G. E. Junctional complexes in various epithelia. *Journal of Cell Biology* **17**, 375–412 (1963).
59. Thiery, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer* **2**, 442–454 (2002).
60. Patel, S. D., Chen, C. P., Bahna, F., Honig, B. & Shapiro, L. Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family. *Current Opinion in Structural Biology* **13**, 690–698 (2003).

61. Behrens, J., Mareel, M. M., Van Roy, F. M. & Birchmeier, W. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell-adhesion. *Journal of Cell Biology* **108**, 2435–2447 (1989).
62. Batlle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J. & García De Herreros, A. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature Cell Biology* **2**, 84–89 (2000).
63. Cano, A., Pérez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F. & Nieto, M. A. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biology* **2**, 76–83 (2000).
64. Hajra, K. M., Chen, D. Y. & Fearon, E. R. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Research* **62**, 1613–1618 (2002).
65. Eger, A., Aigner, K., Sonderegger, S., Dampier, B., Oehler, S., Schreiber, M., Berx, G., Cano, A., Beug, H. & Foisner, R. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* **24**, 2375–2385 (2005).
66. Aigner, K., Dampier, B., Descovich, L., Mikula, M., Sultan, A., Schreiber, M., Mikulits, W., Brabletz, T., Strand, D., Obrist, P., Sommergruber, W., Schweifer, N., Wernitznig, A., Beug, H., Foisner, R. & Eger, A. The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene* **26**, 6979–6988 (2007).
67. Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschueren, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D. & van Roy, F. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Molecular Cell* **7**, 1267–1278 (2001).
68. Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A. & Weinberg, R. A. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* **117**, 927–939 (2004).
69. Tamura, G., Yin, J., Wang, S., Fleisher, A. S., Zou, T., Abraham, J. M., Kong, D., Smolinski, K. N., Wilson, K. T., James, S. P., Silverberg, S. G., Nishizuka, S., Terashima, M., Motoyama, T. & Meltzer, S. J. E-cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute* **92**, 569–573 (2000).

70. Becker, K. F., Atkinson, M. J., Reich, U., Becker, I., Nekarda, H., Siewert, J. R. & Höfler, H. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Research* **54**, 3845–3852 (1994).
71. Berx, G., Cleton-Jansen, A. M., Nollet, F., de Leeuw, W. J., van de Vijver, M., Cornelisse, C. & van Roy, F. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO Journal* **14**, 6107–6115 (1995).
72. Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H. E., Behrens, J., Sommer, T. & Birchmeier, W. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nature Cell Biology* **4**, 222–231 (2002).
73. Lochter, A., Galosy, S., Muschler, J., Freedman, N., Werb, Z. & Bissell, M. J. Matrix metalloproteinase Stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *Journal of Cell Biology* **139**, 1861–1872 (1997).
74. Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., de Strooper, B., Hartmann, D. & Saftig, P. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 9182–9187 (2005).
75. Marambaud, P., Shiol, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., Wisniewski, T. & Robakis, N. K. A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO Journal* **21**, 1948–1956 (2002).
76. Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Schipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J. & Weinberg, R. A. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704–715 (2008).
77. Morel, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S. & Puisieux, A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE* **3**, 2888 (2008).
78. Kong, D., Banerjee, S., Ahmad, A., Li, Y., Wang, Z., Sethi, S. & Sarkar, F. H. Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells. *PLoS ONE* **5**, 12445 (2010).
79. Chiou, S. H., Wang, M. L., Chou, Y. T., Chen, C. J., Hong, C. F., Hsieh, W. J., Chang, H. T., Chen, Y. S., Lin, T. W., Hsu, H. S. & Wu, C. W. Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer

- stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cancer Research* **70**, 10433–10444 (2010).
80. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine* **3**, 730–737 (1997).
 81. Rodriguez-Pinilla, S. M., Sarrio, D., Moreno-Bueno, G., Rodriguez-Gil, Y., Martinez, M. A., Hernandez, L., Hardisson, D., Reis-Filho, J. S. & Palacios, J. Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer. *Modern Pathology* **20**, 474–481 (2007).
 82. Lu, Y., Futtner, C., Rock, J. R., Xu, X., Whitworth, W., Hogan, B. L. M. & Onaitis, M. W. Evidence that Sox2 overexpression is oncogenic in the lung. *PLoS ONE* **5**, 11022 (2010).
 83. Gong, S., Li, Q., Jeter, C. R., Fan, Q., Tang, D. G. & Liu, B. Regulation of NANOG in cancer cells. *Molecular Carcinogenesis* **54**, 679–687 (2015).
 84. Gidekel, S., Pizov, G., Bergman, Y. & Pikarsky, E. Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell* **4**, 361–370 (2003).
 85. Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**, 178–196 (2014).
 86. Ozawa, M., Baribault, H. & Kemler, R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO Journal* **8**, 1711–1717 (1989).
 87. Rimm, D. L., Koslov, E. R., Kebriaei, P., Cianci, C. D. & Morrow, J. S. Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 8813–8817 (1995).
 88. Vasioukhin, V. & Fuchs, E. Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. *Current Opinion in Cell Biology* **13**, 76–84 (2001).
 89. Kemler, R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends in Genetics* **9**, 316–321 (1993).
 90. Müller, T., Choidas, A., Reichmann, E. & Ullrich, A. Phosphorylation and free pool of β -catenin are regulated by Tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 10173–10183 (1999).
 91. Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. & Kemler, R. β -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO Journal* **16**, 3797–3804 (1997).

92. Cook, D., Fry, M. J., Hughes, K., Sumathipala, R., Woodgett, J. R. & Dale, T. C. Wingless inactivates glycogen synthase kinase-3 via an intracellular signalling pathway which involves a protein kinase C. *EMBO Journal* **15**, 4526–4536 (1996).
93. Fang, D., Hawke, D., Zheng, Y., Xia, Y., Meisenhelder, J., Nika, H., Mills, G. B., Kobayashi, R., Hunter, T. & Lu, Z. Phosphorylation of β -catenin by AKT promotes β -catenin transcriptional activity. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 11221–11229 (2007).
94. Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785–789 (1995).
95. Cantley, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655–1657 (2002).
96. Bellacosa, A., Testa, J. R., Moore, R. & Larue, L. A portrait of Akt kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities. *Cancer Biology & Therapy* **3**, 268–275 (2004).
97. Kandel, E. S. & Hay, N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Experimental cell research* **253**, 210–229 (1999).
98. Vivanco, I. & Sawyers, C. L. The phosphatidylinositol 3-kinase-akt pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer* **2**, 489–501 (2002).
99. Altomare, D. A. & Testa, J. R. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* **24**, 7455–7464 (2005).
100. Bergin, E., Levine, J. S., Koh, J. S. & Lieberthal, W. Mouse proximal tubular cell-cell adhesion inhibits apoptosis by a cadherin-dependent mechanism. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **278**, 758–768 (2000).
101. Alessi, D. R., Andjelkovich, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. & Hemmings, B. A. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO Journal* **15**, 6541–6551 (1996).
102. Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B. & Cohen, P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Current Biology* **7**, 261–269 (1997).
103. Sutherland, C., Leighton, I. A. & Cohen, P. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochemical Journal* (1993).

104. Zhou, B. P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y. M., Gunduz, M. & Hung, M.-C. Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Cell Biology* **6**, 931–940 (2004).
105. Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. & Guan, K.-L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology* **4**, 648–657 (2002).
106. Potter, C. J., Pedraza, L. G. & Xu, T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nature Cell Biology* **4**, 658–665 (2002).
107. Sancak, Y., Thoreen, C. C., Peterson, T. R., Lindquist, R. A., Kang, S. A., Spooner, E., Carr, S. A. & Sabatini, D. M. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Molecular Cell* **25**, 903–915 (2007).
108. Isotani, S., Hara, K., Tokunaga, C., Inoue, H., Avruch, J. & Yonezawa, K. Immunopurified mammalian target of rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 kinase alpha *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 34493–34498 (1999).
109. Miettinen, P. J., Ebner, R., Lopez, A. R. & Derynck, R. TGF- β induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type 1 receptors. *Journal of Cell Biology* **127**, 2021–2036 (1994).
110. Derynck, R. & Zhang, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* **425**, 577–584 (2003).
111. López-Novoa, J. M. & Nieto, M. A. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Molecular Medicine* **1**, 303–314 (2009).
112. Fuxe, J. & Karisson, M. C. TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition: a link between cancer and inflammation. *Seminars in Cancer Biology* **22**, 455–461 (2012).
113. Reed, S. G. TGF- β in infections and infectious diseases. *Microbes and Infection* **1**, 1313–1325 (1999).
114. Zhao, L., Yang, R., Cheng, L., Wang, M., Jiang, Y. & Wang, S. LPS-induced epithelial-mesenchymal transition of intrahepatic biliary epithelial cells. *Journal of Surgical Research* **171**, 819–825 (2011).
115. Papini, E., Satin, B., Norais, N., de Bernard, M., Telford, J. L., Rappuoli, R. & Montecucco, C. Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Journal of Clinical Investigation* **102**, 813–820 (1998).

116. Amieva, M. R., Vogelmann, R., Covacci, A., Tompkins, L. S., Nelson, W. J. & Falkow, S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* **300**, 1430–1434 (2003).
117. Lee, D. G., Kim, H. S., Lee, Y. S., Kim, S., Cha, S. Y., Ota, I., Kim, N. H., Cha, Y. H., Yang, D. H., Lee, Y., Park, G. J., Yook, J. I. & Lee, Y. C. *Helicobacter pylori* CagA promotes Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition by reducing GSK-3 activity. *Nature Communications* **5**, 4423 (2014).
118. Coykendall, A. L., Kaczmarek, F. S. & Slots, J. Genetic heterogeneity in *Bacteroides asaccharolyticus* (Holdeman and Moore 1970) Finegold and Barnes 1977 (Approves Lists, 1980) and proposal of *Bacteroides gingivalis* sp. nov. and *Bacteroides macacae* (Slots and Genco) comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **30**, 559–564 (1980).
119. Shah, H. N. & Collins, M. D. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**, 128–131 (1988).
120. Gibbons, R. J. & Macdonald, J. B. Hemin and Vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of *Bacteroides melaninogenicus*. *Journal of Bacteriology* **80**, 164–170 (1960).
121. Rizza, V., Sinclair, P. R., White, D. C. & Courant, P. R. Electron transport system of the protoheme-requiring anaerobe *Bacteroides melaninogenicus*. *Journal of Bacteriology* **96**, 665–671 (1968).
122. Holdeman, L. V., Kelley, R. & Moore, W. E. C. *Bacteroidaceae* in *Bergys Manual of Systematic Bacteriology* (Hrsg. Krieg, N. R. & Holt, J. G.) 602–662 (1984).
123. Shah, H. N. & Williams, R. A. Dehydrogenase patterns in the taxonomy of *Bacteroides*. *Journal of General Microbiology* **128**, 2955–2965 (1982).
124. Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000* **5**, 78–111 (1994).
125. Shah, H. N., Williams, R. A., Bowden, G. H. & Hardie, J. M. Comparison of the biochemical properties of *Bacteroides melaninogenicus* from human dental plaque and other sites. *Journal of Applied Bacteriology* **41**, 473–492 (1976).
126. Slots, J. *Importance of black-pigmented Bacteroides in human periodontal disease in Host-parasite interactions in periodontal diseases* (Hrsg. Genco, R. J. & Mergenhagen, S. E.) 27–45 (American Society for Microbiology, 1982).
127. Datta, H. K., Ng, W. F., Walker, J. A., Tuck, S. P. & Varanasi, S. S. The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology* **61**, 577–587 (2008).

128. Herzberg, M. C. & Weyer, M. W. Dental plaque, platelets, and cardiovascular diseases. *Annals of Periodontology* **3**, 151–160 (1998).
129. Offenbacher, S., Boggess, K. A., Murtha, A. P., Jared, H. L., Lieff, S., McKaig, R. G., Mauriello, S. M., Moss, K. L. & Beck, J. D. Progressive periodontal disease and risk of very preterm delivery. *Obstetrica si Ginecologia* **107**, 29–36 (2006).
130. Tonetti, M. S. Periodontitis and risk for atherosclerosis: an update on intervention trials. *Journal of Clinical Periodontology* **10**, 15–19 (2009).
131. Bohnstedt, S., Cullinan, M. P., Ford, P. J., Palmer, J. E., Leishman, S. J., Westerman, B., Marshall, R. I., West, M. J. & Seymour, G. J. High antibody levels to *P. gingivalis* in cardiovascular disease. *Journal of Dental Research* **89**, 938–942 (2010).
132. Michaud, D. S., Izard, J., Wilhelm-Benartzi, C. S., You, D. H., Grote, V. A., Tjonneland, A., Dahm, C. C., Overvad, K., Jenab, M., Fedirko, V., Boutron-Ruault, M. C., Clavel-Chapelon, F., Racine, A., Kaaks, R., Boeing, H., Foerster, J., Trichopoulou, A., Lagiou, P., Trichopoulos, D., Sacerdote, C., Sieri, S., Palli, D., Tumino, R., Panico, S., Siersema, P. D., Peeters, P. H., Lund, E., Barricarte, A., Huerta, J. M., Molina-Montes, E., Dorronsoro, M., Quirós, J. R., Duell, E. J., Ye, W., Sund, M., Lindkvist, B., Johanse, D., Khaw, K. T., Wareham, N., Travis, R. C., Vineis, P., Bueno-de-Mesquita, H. B. & Riboli, E. Plasma antibodies to oral bacteria and risk of pancreatic cancer in a large European prospective cohort study. *Gut* **62**, 1764–1770 (2013).
133. Lamont, R. J., Odo, D., Persson, R. E. & Persson, G. R. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with gingival epithelial cells maintained in culture. *Molecular Oral Microbiology* **7**, 364–367 (1992).
134. Duncan, M. J., Nakao, S., Skobe, Z. & Xie, H. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infection and Immunity* **61**, 2260–2265 (1993).
135. Nakagawa, I., Amano, A., Kuboniwa, M., Nakamura, T., Kawabata, S. & Hamada, S. Functional differences among FimA variants of *Porphyromonas gingivalis* and their effects on adhesion to and invasion of human epithelial cells. *Infection and Immunity* **70**, 277–285 (2002).
136. Watanabe, K., Yamaji, Y. & Umemoto, T. Correlation between cell-adherent activity and surface structure in *Porphyromonas gingivalis*. *Molecular Oral Microbiology* **7**, 357–363 (1992).
137. Amano, A. Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. *Journal of Periodontology* **74**, 90–96 (2003).

138. Houalet-Jenne, S., Pellen-Mussi, S., Tricot-Doleux, S., Apiou, J. & Bonnaure-Mallet, M. Assessment of internalization and viability of *Porphyromonas gingivalis* in KB epithelial cells by confocal microscopy. *Infection and Immunity* **69**, 7146–7151 (2001).
139. Madianos, P. N., Papapanou, P. N., Nannmark, U., Dahlén & Sandros, J. *Porphyromonas gingivalis* FDC381 multiplies and persists within human oral epithelial cells *in vitro*. *Infection and Immunity* **64**, 660–664 (1996).
140. Lamont, R. J., Chan, A., Belton, C. M., Izutsu, K. T., Vasel, D. & Weinberg, A. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infection and Immunity* **63**, 3878–3885 (1995).
141. Noiri, Y., Ozaki, K., Nakae, H., Matsuo, T. & Ebisu, S. An immunohistochemical study on the localization of *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus* and *Actinomyces viscosus* in human periodontal pockets. *Journal of Periodontal Research* **32**, 598–607 (1997).
142. Rudney, J. D., Chen, R. & Sedgewick, G. J. Intracellular *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells collected from human subjects. *Infection and Immunity* **69**, 2700–2707 (2001).
143. Holt, S. C., Kesavalu, L., Walker, S. & Genco, C. A. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology 2000* **20**, 168–238 (1999).
144. Potempa, J., Pike, R. & Travis, J. Titration and mapping of the active site of cysteine proteinase from *Porphyromonas gingivalis* (gingipains) using peptidyl chloromethanes. *The Journal of Biological Chemistry* **378**, 223–230 (1997).
145. Abe, N., Kadowaki, T., Okamoto, K., Nakayama, K., Ohishi, M. & Yamamoto, K. Biochemical and functional properties of lysine-specific cysteine proteinase (Lys-gingipain) as a virulence factor of *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. *The Journal of Biochemistry* **123**, 305–312 (1998).
146. Imamura, T., Travis, J. & Potempa, J. The biphasic virulence activities of gingipains: activation and inactivation of host proteins. *Current Protein and Peptide Science* **4**, 443–450 (2003).
147. Uphoff, C. C. & Drexler, H. G. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* **38**, 79–85 (2002).
148. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, 2002–2007 (2001).

149. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. & Wittwer, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* **55**, 611–622 (2009).
150. Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T. & Tada, K. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by phorbol diester. *Cancer Research* **42**, 1530–1536 (1982).
151. Williamson, D. H. & Fennell, D. J. The use of fluorescent DNA-binding agent for detecting and separating yeast mitochondrial DNA. *Methods in Cell Biology* **12**, 335–351 (1975).
152. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**, 156–159 (1987).
153. *Molecular cloning: a laboratory manual* Cold Spring Harbor Laboratory (Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T., Cold Spring Harbor, New York, 1989).
154. Mullis, K. B. & Faloona, F. A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**, 335–350 (1987).
155. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* **10**, 413–417 (1992).
156. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11**, 1026–1030 (1993).
157. Schreiber, E., Matthias, P., Mueller, M. M. & Schaffner, W. Rapid detection of octamer binding proteins with "mini-extracts", prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Research* **17**, 6419 (1989).
158. Frede, S., Stockmann, C., Freitag, P. & Fandrey, J. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/p42 MAPK and NF- κ B. *Biochemical Journal* **396**, 517–527 (2006).
159. Compton, S. J. & Jones, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry* **151**, 369–374 (1985).
160. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254 (1976).
161. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).

162. *Antibodies - A laboratory manual* Cold Spring Harbor Laboratory (Harlow, E. und Lane, D., Cold Spring Harbor, New York, 1988).
163. Kyhse-Andersen, J. Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus with buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **10**, 203–209 (1984).
164. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9**, 671–675 (2012).
165. Legocki, R. P. & Verma, D. P. Multiple immunoreplica technique: screening for specific proteins with a series of different antibodies using one polyacrylamide gel. *Analytical Biochemistry* **111**, 385–392 (1981).
166. Wang, K. K. W. 4: *Detection of proteolytic enzymes using protein substrates* in *Proteolytic Enzymes: Tools and Targets* 49–62 (Springer Verlag, Heidelberg, 1999).
167. Jakowlew, S. B. Transforming growth factor- β in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews* **25**, 435–457 (2006).
168. Reginato, M. J., Mills, K. R., Paulus, J. K., Lynch, D. K., Sgroi, D. C., Debnath, J., Muthuswamy, S. K. & Brugge, J. S. Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nature Cell Biology* **5**, 733–740 (2003).
169. Tang, M. K. S., Zhou, H. Y., Yam, J. W. P. & Wong, A. S. T. c-Met overexpression contributes to the acquired apoptotic resistance of nonadherent ovarian cancer cells through a cross talk mediated by phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Neoplasia* **12**, 128–138 (2010).
170. Zhou, G., Xie, T.-X., Zhao, M., Jasser, S. A., Younes, M. N., Sano, D., Lin, J., Kupferman, M. E., Santillan, A. A., Patel, V., Gutkind, J. S., El-Naggar, A. K., Emberley, E. D., Watson, P. H., Matsuzawa, S.-I., Reed, J. C. & Myers, J. N. Reciprocal negative regulation between S100A7/psoriasin and β -catenin signaling plays an important role in tumor progression of squamous cell carcinoma of oral cavity. *Oncogene* **27**, 3527–3538 (2008).
171. Wikner, J., Gröbe, A., Pantel, K. & Riethdorf, S. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and circulating tumour cells. *World Journal of Clinical Oncology* **5**, 114–124 (2014).
172. Wynder, E. L. & Stellman, S. D. Comparative epidemiology of tobacco-related cancers. *Cancer Research* **37**, 4608–4622 (1977).

173. Sztukowska, M. N., Ojo, A., Ahmed, S., Carenbauer, A. L., Wang, Q., Shumway, B., Jenkinson, H. F., Wang, H., Darling, D. S. & Lamont, R. J. *Porphyromonas gingivalis* initiates a mesenchymal-like transition through ZEB1 in gingival epithelial cells. *Cellular Microbiology* **18**, 844–858 (2016).
174. Nieman, M. T., Prudoff, R. S., Johnson, K. R. & Wheelock, M. J. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *Journal of Cell Biology* **147**, 631–644 (1999).
175. Ye, P., Chapple, C. C., Kumar, R. K. & Hunter, N. Expression patterns of E-cadherin, involucrin, and connexin gap junction proteins in the lining epithelial of inflamed gingiva. *Journal of Pathology* **192**, 58–66 (2000).
176. Katz, J., Sambandam, V., Wu, J. H., Michalek, S. M. & Balkovetz, D. F. Characterization of *Porphyromonas gingivalis*-induced degradation of epithelial cell junctional complexes. *Infection and Immunity* **68**, 1441–1449 (2000).
177. Katz, J., Yang, Q. B., Zhang, P., Potempa, J., Travis, J., Michalek, S. M. & Balkovetz, D. F. Hydrolysis of epithelial junctional proteins by *Porphyromonas gingivalis* gingipains. *Infection and Immunity* **70**, 2512–2518 (2002).
178. Yoneda, M. The analysis of expression pattern of claudins family, E-cadherin, JAM-A and occludin in periodontal diseases. *Shikoku Dental Research* **20**, 89–103 (2007).
179. Abe-Yutori, M., Chikazawa, T., Shibasaki, K. & Murakami, S. Decreased expression of E-cadherin by *Porphyromonas gingivalis*-lipopolysaccharide attenuates epithelial barrier function. *Journal of Periodontal Research*. doi:10.1111/jre.12367 (2016).
180. Chen, Z., Casiano, C. A. & Fletcher, H. M. Protease-active extracellular protein preparations from *Porphyromonas gingivalis* W83 induce N-cadherin proteolysis, loss of cell adhesion, and apoptosis in human epithelial cells. *Journal of Periodontology* **72**, 641–650 (2001).
181. Naito, M., Hirakawa, H., Yamashita, A., Ohara, N., Shoji, M., Yukitake, H., Nakayama, K., Toh, H., Yoshimura, F., Kuhara, S., Hattori, M., Hayashi, T. & Nakayama, K. Determination of the genome sequence of *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in *P. gingivalis*. *DNA Research* **15**, 215–225 (2008).
182. Orsulic, S., Huber, O., Aberle, H., Arnold, S. & Kemler, R. E-cadherin binding prevents β -catenin nuclear localization and β -catenin/LEF-1-mediated transactivation. *Journal of Cell Science* **112**, 1237–1245 (1999).

183. Zhou, Y., Sztukowska, M., Wang, Q., Inaba, H., Potempa, J., Scott, D. A., Wang, H. & Lamont, R. J. Noncanonical activation of β -catenin by *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity* **83**, 3195–3203 (2015).
184. Leygue, E., Snell, L., Hiller, T., Dotzlaw, H., Hole, K., Murphy, L. C. & Watson, P. H. Differential expression of Psoriasin messenger RNA between *in situ* and invasive human breast carcinoma. *Cancer Research* **56**, 4606–4609 (1996).
185. De Craene, B., van Roy, F. & Berx, G. Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cellular Signalling* **17**, 535–547 (2005).
186. Yook, J. I., Li, X. Y., Ota, I., Hu, C., Kim, H. S., Cha, S. Y., Ryu, J. K., Choi, Y. J., Kim, J., Fearon, E. R. & Weiss, S. J. A Wnt-Axin2-GSK3 β cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nature Cell Biology* **8**, 1398–1406 (2006).
187. Bachelder, R. E., Yoon, S.-O., Franci, C., de Herreros, A. G. & Mercurio, A. M. Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Biology* **168**, 29–33 (2005).
188. Bisson, I. & Prowse, D. M. WNT signaling regulates self-renewal and differentiation of prostate cancer cells with stem cell characteristics. *Cell Research* **19**, 683–687 (2009).
189. Su, Y. J., Chang, Y. W., Lin, W. H., Liang, C. L. & Lee, J. L. An aberrant nuclear localization of E-cadherin is a potent inhibitor of Wnt/ β -catenin-elicited promotion of the cancer stem cell phenotype. *Oncogenesis* **4**, 157 (2015).
190. Scheel, C., Eaton, E. N., Chaffer, C. L., Reinhardt, F., Kah, K. J., Bell, G., Guo, W., Rubin, J., Richardson, A. & Weinberg, R. A. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* **145**, 926–940 (2011).
191. Chang, Y. W., Su, Y. J., Hsiao, M., Wei, K. C., Lin, W. H., Liang, C. L., Chen, S. C. & Lee, J. L. Diverse targets of β -catenin during the epithelial-mesenchymal transition define cancer stem cells and predict disease relapse. *Cancer Research* **75**, 3398–3410 (2015).
192. Ghuwalewala, S., Ghatak, D., Das, P., Dey, S., Sarkar, S., Alam, N., Panda, C. K. & Roychoudhury, S. CD44(high)CD24(low) molecular signature determines the cancer stem cell and EMT phenotype in oral squamous cell carcinoma. *Stem Cell Research* **16**, 405–417 (2016).
193. Sternlicht, M. D. & Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **17**, 463–516 (2001).

194. Andrian, E., Mostefaoui, Y., Rouabhia, M. & Grenier, D. Regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by *Porphyromonas gingivalis* in an engineered human oral mucosa model. *Journal of Cellular Physiology* **211**, 56–62 (2007).
195. Jotwani, R., Eswaran, S. V., Moonga, S. & Cutler, C. W. MMP-9/TIMP-1 imbalance induced in human dendritic cells by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **58**, 314–321 (2010).
196. Zhou, J., Zhang, J. & Chao, J. *Porphyromonas gingivalis* promotes monocyte migration by activating MMP-9. *Journal of Periodontal Research* **47**, 236–242 (2012).
197. Inaba, H., Sugita, H., Kuboniwa, M., Iwai, S., Hamada, M., Noda, T., Morisaki, I., Lamont, R. J. & Amano, A. *Porphyromonas gingivalis* promotes invasion of oral squamous cell carcinoma through induction of proMMP9 and its activation. *Cellular Microbiology* **16**, 131–145 (2014).
198. Murphy, G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biology* **12**, 233 (2011).
199. Stafford, P., Higham, J., Pinnock, A., Murdoch, C., Douglas, C. W., Stafford, G. P. & Lambert, D. W. Gingipain-dependent degradation of mammalian target of rapamycin pathway proteins by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* during invasion. *Molecular Oral Microbiology* **28**, 366–378 (2013).
200. Dickson, M., Hahn, W. C., Ino, Y., Ronfard, V., Wu, J. Y., Weinberg, R. A., Louis, D. N., Li, F. P. & Rheinwald, J. G. Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16INK4a-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Molecular Cell Biology* **20**, 1436–1447 (2000).
201. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593–602 (1997).
202. Kamb, A., Gruis, N. A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavitgian, S. V., Stockert, E., Day, R. S., Johnson, B. E. & Skolnick, M. H. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* **264**, 436–440 (1994).
203. Kubinowa, M., Hasegawa, Y., Mao, S., Shizukuishi, S., Amano, A., Lamont, R. J. & Yilmaz, Ö. *P. gingivalis* accelerates gingival epithelial cell progression through the cell cycle. *Microbes and Infection* **10**, 122–128 (2008).

204. Pan, C., Xu, X., Tan, L., Lin, L. & Pan, Y. The effects of *Porphyromonas gingivalis* on the cell cycle progression of human gingival epithelial cells. *Oral Diseases* **20**, 100–108 (2014).
205. Inman, G. J. Switching TGF- β from a tumor suppressor to a tumor promoter. *Current Opinion in Genetics & Development* **21**, 93–99 (2011).
206. Wanami, L. S., Chen, H. Y., Peiró, S., de Herreros, A. G. & Bachelder, R. E. Vascular endothelial growth factor-A stimulates Snail expression in breast tumor cells: implications for tumor progression. *Experimental Cell Research* **314**, 2448–2453 (2008).
207. Vasconcelos, R. C., Costa Ade, L., Freitas Rde, A., Bezerra, B. A., Santos, B. R., Pinto, L. P. & Gurgel, B. C. Immunoexpression of HIF-1 α and VEGF in periodontal disease and healthy gingival tissues. *Brazilian Dental Journal* **27**, 117–122 (2016).
208. Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z. & Hanahan, D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biology* **2**, 737–744 (2000).
209. Fulda, S. & Debatin, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anti-cancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4798–4811 (2006).
210. Cory, S. & Adams, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellcell life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* **2**, 647–656 (2002).
211. Saelens, X., Festjens, N., Walle, L. V., van Gurp, M., van Loo, G. & Vandenabeele, P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* **23**, 2861–2874 (2004).
212. Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305–1308 (1998).
213. Vega, S., Morales, A. V., Ocana, O. H., Valdés, F., Fabregat, I. & Nieto, M. A. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes & Development* **18**, 1131–1143 (2004).
214. Stathopoulou, P. G., Galicia, J. C., Benakanakere, M. R., Garcia, C. A., Potempa, J. & Kinane, D. F. *Porphyromonas gingivalis* induce apoptosis in human gingival epithelial cells through a gingipain-dependent mechanism. *BMC Microbiology* **9**, 107 (2009).
215. Nakhjiri, S. F., Park, Y., Yilmaz, Ö., Chung, W. O., Watanabe, K., El-Sabaeny, A., Park, K. & Lamont, R. J. Inhibition of epithelial cell apoptosis by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiology Letters* **200**, 145–149 (2001).

216. Yilmaz, Ö., Jungas, T., Verbeke, P. & Ojcius, D. M. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity* **72**, 3743–3751 (2004).
217. Yao, L., Jermanus, C., Barbetta, B., Verbeke, P., Ojcius, D. M. & Yilmaz, Ö. *Porphyromonas gingivalis* infection sequesters pro-apoptotic Bad through Akt in primary gingival epithelial cells. *Molecular Oral Microbiology* **25**, 89–101 (2010).
218. Mao, S., Park, Y., Hasegawa, Y., Tribble, G. D., James, C. E., Handfield, M., Stavropoulos, M. F., Yilmaz, Ö. & Lamont, R. J. Intrinsic apoptotic pathways of gingival epithelial cells modulated by *Porphyromonas gingivalis*. *Cellular Microbiology* **9**, 1997–2007 (2007).
219. Guadamillas, M. C., Cerezo, A. & del Pozo, M. A. Overcoming anoikis - pathways to anchorage-independent growth in cancer. *Journal of Cell Science* **124**, 3189–3197 (2011).
220. Onder, T. T., Gupta, P. B., Mani, S. A., Yang, J., Lander, E. S. & Weinberg, R. A. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Research* **68**, 3645–3654 (2008).
221. Derksen, P. W., Liu, X., Saridin, F., van der Gulden, H., Zevenhoven, J., Evers, B., van Beijnum, J. R., Griffioen, A. W., Vink, J., Krimpenfort, P., Peterse, J. L., Cardiff, R. D., Berns, A. & Jonkers, J. Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. *Cancer Cell* **10**, 437–449 (2006).
222. Li, G., Satyamoorthy, K. & Herlyn, M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Research* **61**, 3819–3825 (2001).
223. Kumar, S., Park, S. H., Cieply, B., Schupp, J., Killiam, E., Zhang, F., Rimm, D. L. & Frisch, S. M. A pathway for the control of anoikis sensitivity by E-cadherin and epithelial-to-mesenchymal transition. *Molecular Cell Biology* **31**, 4036–4051 (2011).
224. Van de Veerdonk, F. L., Netea, M. G., Dinarello, C. A. & Joosten, L. A. Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends in Immunology* **32**, 110–116 (2011).
225. Taxman, D. J., Swanson, K. V., Broglie, P. M., Wen, H., Holley-Guthrie, E., Huang, M. T.-H., Callaway, J. B., Eitas, T. K., Duncan, J. A. & Ting, J. P. Y. *Porphyromonas gingivalis* mediates inflammasome repression in polymicrobial cultures through a novel mechanism involving reduced endocytosis. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 32791–32799 (2012).

226. Park, E., Na, H. S., Song, Y.-R., Shin, S. Y., Kim, Y.-M. & Chung, J. Activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes by *Porphyromonas gingivalis* infection. *Infection and Immunity* **82**, 112–123 (2014).
227. Guo, B., Fu, S., Zhang, J., Liu, B. & Li, Z. Targeting inflammasome/ IL-1 pathways for cancer immunotherapy. *Scientific Reports* **6**, 36107 (2016).
228. Giacona, M. B., Papapanou, P. N., Lamster, I. B., Rong, L. L., D'Agati, V. D., Schmidt, A. M. & Lalla, E. *Porphyromonas gingivalis* induces its uptake by human macrophages and promotes foam cell formation *in vitro*. *FEMS Microbiology Letters* **241**, 95–101 (2004).

A Appendix: Ergebnisse II

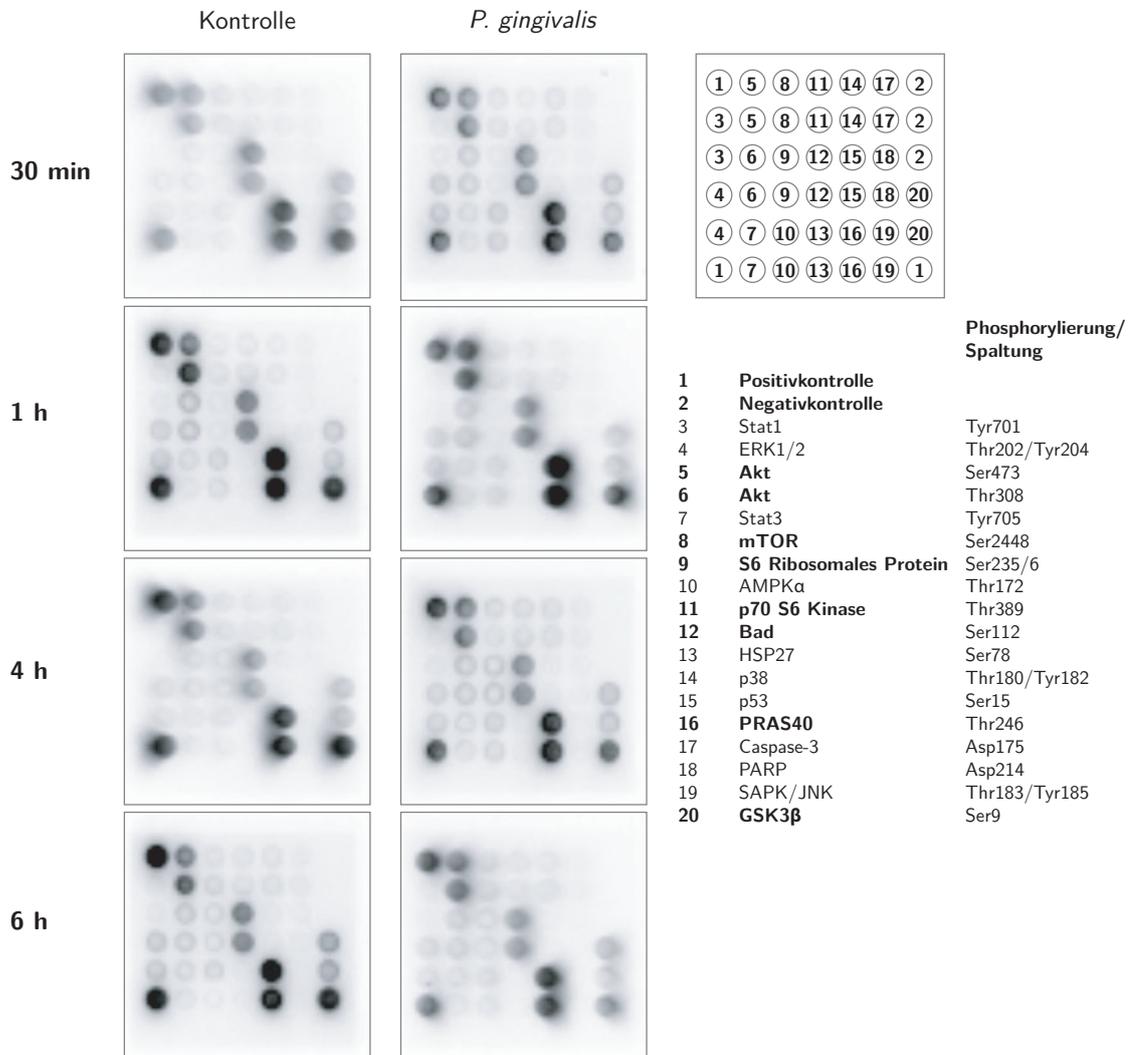


Abbildung A.1 – Exemplarischer Protein-Array intrazellulärer Signalmoleküle in OKF6/hTERT-1-Zellen nach Stimulation mit *P. gingivalis* (MOI 100) für 30 min, 1 h, 4 h und 6 h. Dieser Array steht repräsentativ für insgesamt zwei Versuchsdurchführungen.

B Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

Hoppe, T., Kraus, D., Novak, N., Probstmeier, R., Frentzen, M., Wenghoefer, M. & Winter, J. Oral pathogens change proliferation properties of oral tumor cells by affecting gene expression of human defensins. *Tumor Biology* **37**, 13789-13798 (2016)

Hoppe, T., Göser, V., Kraus, D., Probstmeier, R., Frentzen, M., Wenghoefer, M., Jepsen, S. & Winter, J. Response of osteoblast-like MG63 cells on bacterial challenge is dependent on the state of differentiation. *Submitted*

Hoppe, T., Kraus, D., Probstmeier, R., Jepsen, S. & Winter, J. Bacterial-induced malignant transformation of oral keratinocytes by *Porphyromonas gingivalis* through epithelial-mesenchymal transition and anoikis resistance. *Manuscript in preparation*

Vorträge

Effects of periopathogenic factors on oral bone-invasive tumor cells (2014). 6th Workshop of the Clinical Research Unit 208 in Bonn.

C Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Jochen Winter, für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe „Orale Zell- und Tumorbiologie“ durchzuführen. Ferner danke ich ihm für die Hilfsbereitschaft und wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Weiterhin gilt mein großer Dank Herrn Prof. Dr. Erwin A. Galinski für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof Dr. Matthias Frentzen danke ich für die Bereitstellung eines Büroplatzes sowohl in der Klinik, als auch im Schwesternwohnheim.

Herrn Dr. Dominik Kraus danke ich für seine Diskussionsbereitschaft und zahlreichen Anregungen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Bei allen Kollegen aus dem Labor möchte ich mich für die Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima bedanken. Mein spezieller Dank geht an Dr. Jan Reckenbeil (auch für das Korrekturlesen), Imke Beier, Diana Lalaouni, Beate Schiermeyer-Dunkhase, Dr. Anna Damanaki und Michael Marder.

Zudem danke ich Charlotte Petruschke für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die gute Nachbarschaft.

Mein herzlichster Dank geht an meine Eltern, Großeltern und Felix.

D Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Bonn, Februar 2017

(Tatjana Hoppe)

E Lebenslauf