



Εξελιξείς στην έμφυτη ανοσία του στοματικού επιθηλίου

Advances in the oral epithelial innate immunity

Δανάη Α. Απατζίδου¹, Johnah C. Galicia²,
Sven-Ulrik Gorr², Παναγιώτα Γ. Σταθοπούλου²,
Manjunatha M. Benakanakere², Denis F. Kinane³

¹Εργαστήριο Περιοδοντολογίας και Βιολογίας
Εμφυτευμάτων, Οδοντιατρική Σχολή, Αριστο-
τέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα,
²Οδοντιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Louisville,
Louisville, KY, ΗΠΑ, ³Τμήμα Παθολογίας και Περι-
οδοντολογίας, Οδοντιατρική Σχολή Πανεπιστημίου
Pennsylvania, Φιλαδέλφεια, PA, ΗΠΑ

Danae A. Apatzidou¹, Johnah C. Galicia²,
Sven-Ulrik Gorr², Panagiota G. Stathopoulou²,
Manjunatha M. Benakanakere², Denis F. Kinane³

¹Department of Periodontology and Implant
Biology, Aristotle University Dental School,
Thessaloniki, Greece, ²University of Louisville
Dental School, Louisville, KY, USA, ³Department
of Pathology and Periodontics, Penn School of
Dental Medicine, Philadelphia, PA, USA

Περίληψη

Ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας των περιοδοντικών νόσων είναι ο οδοντικός βιοϋμένας που συσσωρεύεται στην ουλοδοντική σχισμή. Οι φλεγμονώδεις διεργασίες που οργανώνονται ως αντίδραση σε μικροβιακούς παράγοντες αποτελούν τα πρώιμα στάδια της ανοσοποιητικής απόκρισης και είναι τμήμα του έμφυτου ανοσολογικού συστήματος. Παρόλο που η φλεγμονή κάποτε θεωρούνταν ως μη ειδικός μηχανισμός ανοσοαπόκρισης, οι σύγχρονες γνώσεις υποδεικνύουν την ύπαρξη αξιοσημείωτης ειδικότητας, με μεγάλη ποικιλία υποδοχέων και αντίστοιχων συνδετών. Η ιδιόζουσα φύση της φλεγμονής επιτρέπει την ταχεία αναγνώριση και την καλύτερα προσαρμοσμένη απόκριση στη λοίμωξη.

Τα επιθηλιακά κύτταρα λειτουργούν ως ένας διαπερατός φραγμός που καλύπτει το σώμα και προστατεύει από τα δυνητικά παθογόνα μικρόβια. Περίπλοκα μοντέλα από προειδοποιητικά σήματα που ακολουθούν την επιθηλιακή διέγερση από τα μικρόβια καθορίζουν εάν ένα κύτταρο θα δράσει κατά του μολυσματικού παράγοντα, θα πολλαπλασιαστεί ή θα πεθάνει. Οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs) διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην επαγωγή της έμφυτης ανοσίας και των φλεγμονωδών αποκρίσεων και εκφράζονται κυρίως σε κύτταρα που μεσολαβούν στην πρώτη γραμμή άμυνας. Αυτοί οι υποδοχείς έχουν εξελιχθεί έτσι ώστε να αναγνωρίζουν τα εξελικτικά συντηρημένα μοριακά πρότυπα των παθογόνων, προσδίδοντας στην έμφυτη ανοσία μια σχετική ειδικότητα. Επιπλέον, το στοματικό επιθήλιο εκφράζει πολλαπλές αντιμικροβιακές πρωτεΐνες που δρουν ως πρώιμη άμυνα του ξενιστή κατά των μικροβιακών προκλήσεων. Η παρούσα ανασκόπηση σχολιάζει τις αρχικές βακτηριακές-επιθηλιακές αλληλεπιδράσεις και τις ακόλουθες αντιδράσεις των επιθηλιακών TLRs στις βακτηριακές προκλήσεις, την απελευθέρωση αντιμικροβιακών πεπτιδίων και τις σηματοδοτικές αποκρίσεις του ξενιστή που προκαλούν την απελευθέρωση αυτών των μορίων.

Περιοδοντολογικά Ανάλεκτα 2010, 21(5):1-13

Λέξεις κλειδιά: περιοδοντική νόσος, μικροβιολογία, οδοντική πλάκα, βακτήρια, υποουλικό οικοσύστημα, βιοϋμένας

Abstract

The primary etiologic agent of periodontal diseases is the dental biofilm which accumulates in the gingival crevice. The inflammatory processes in response to microbial challenges represent early stages of the immune response and are part of the innate immune system. Although inflammation was once considered a nonspecific arm of the immune response, current knowledge indicates remarkable specificity, with the involvement of a wide-ranging assortment of receptors and matching ligands. The specific nature of inflammation allows rapid identification and a better tailored response to infection.

Epithelial cells function as a permeable barrier that covers the body and protects against putative pathogenic microbes. Complex patterns of warning signs that follow epithelial stimulation by microbes determine whether a cell takes action against the infectious agent, proliferates, or dies. Toll-like receptors (TLRs) play a central role in the induction of innate immune and inflammatory responses and are expressed predominantly in cells that mediate the first line of defense. These receptors have evolved to recognize highly conserved pathogen-associated molecular patterns, endowing the innate response with a relative specificity. In addition, oral epithelia express multiple antimicrobial proteins that act as an early host defense against microbial challenges. The present review addresses the early bacterial-epithelial cell interactions and subsequent responses of epithelial TLRs to various bacterial challenges, the release of variable antimicrobial peptides, and the host signaling responses that trigger the release of these molecules.

Analecta Periodontologica 2010, 21(5):1-13

Key words: periodontal disease, microbiology, dental plaque, bacteria, subgingival ecosystem, biofilm

Εισαγωγή

Ο πρωταρχικός παράγοντας στην έναρξη της περιοδοντικής νόσου είναι η οδοντική πλάκα, ένα μικροβιακός βιοϋμένας που συσσωρεύεται στα δόντια και αποτελείται από εκατοντάδες διαφορετικά είδη βακτηρίων σε μια οργανωμένη δομή (Socransky και Haffajee 1994, Slots 1999, 2005). Τα βακτήρια του βιοϋμένα και τα υποπροϊόντα τους, που πλαισιώνουν την οδοντική επιφάνεια από τη μια πλευρά και τα επιθηλιακά κύτταρα του περιοδοντίου από την άλλη πλευρά ερεθίζουν τους ουλικούς ιστούς προκαλώντας μια «φλεγμονώδη αντίδραση» (Kinane και συν. 1991, Kornman και συν. 1997). Αυτές οι φλεγμονώδεις διεργασίες που οργανώνονται ταχύτατα ως απάντηση στις μικροβιακές προκλήσεις, αντιπροσωπεύουν τα πρώτα στάδια της ανοσολογικής απάντησης, και αποτελούν μέρος του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, δηλαδή τις αποκρίσεις του ξενιστή που δεν απαιτούν προηγούμενη προσαρμογή ή εμπειρία (Matzinger 2002, Dixon και συν. 2004). Η φλεγμονή είναι μια καλά συντονισμένη διαδικασία, που περιλαμβάνει αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα ακολουθούμενη από τη μετανάστευση πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων, μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων στη βλάβη και την ενεργοποίηση των κυττάρων για απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών που καθοδηγούν μια αλληλουχία βιοχημικών και κυτταρικών γεγονότων (Larsen και Henson 1983, Sharma και Mohsin 1990). Αν και η φλεγμονή κάποτε θεωρούνταν μη ειδικό τμήμα της ανοσοαπάντησης, οι παρούσες γνώσεις υποδεικνύουν αξιοσημείωτη ειδικότητα με μια ευρεία ποικιλία εμπλεκόμενων υποδοχέων και συνδετών. Η ειδικότητα της φλεγμονής επιτρέπει την ταχεία αναγνώριση και την καλύτερα προσαρμοσμένη απάντηση στη λοίμωξη (Janeway 1992) ή σε άλλα απειλητικά εξωτερικά ερεθίσματα (Matzinger 2002).

Ο πρωταρχικός ρόλος της φλεγμονώδους αντίδρασης είναι η προστασία του ξενιστή κατά της βακτηριακής εισβολής. Ένας φραγμός ουδετερόφιλων είναι στρατηγικά εγκατεστημένος μεταξύ των υποουλικά συσσωρευμένων βακτηρίων και του προσπεφυκός επιθηλίου αποτελώντας την πρώτη γραμμή άμυνας. Σε καταστάσεις υγείας, κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη-8 (IL-8) και άλλα μόρια που περιλαμβάνουν την E-σελεκτίνη και το διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1 (ICAM-1) που εκφράζονται από τα ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα, τους ινοβλάστες και τα μακροφάγα των ούλων επιτρέπουν την εξαγωγή και συσσώρευση των ουδετερόφιλων στους ουλικούς ιστούς, κοντά στην αποικισμένη ριζική επιφάνεια. Τα ουδετερόφιλα μεταναστεύουν από τα περιοδοντικά αιμοφόρα αγγεία διαμέσου της βασικής μεμβράνης του χορίου προς στο προσπεφυκός επιθήλιο και τελικά στην ουλοδοντική σχισμή όπου και σχηματίζουν ένα τείχος κατά του επιφανειακού στρώματος του βιοϋμένα, προσπαθώντας να εξουδετερώσουν τα βακτήρια της μικροβιακής πλάκας (Ryder 2010). Τα συγκεκριμένα γεγονότα που διαδραματίζονται πριν γίνει εμφανής οποιαδήποτε κλινική ή ιστολογική ένδειξη φλεγμονής, διατηρούν το περιοδόντιο σε κατάσταση υγείας. Η αποτυχία της φλεγμονώδους διήθησης λόγω λειτουργικών διαταραχών των ουδετερόφιλων/μακροφάγων ή προβλημάτων στη διαπήδηση, χημειοταξία και εγκατάσταση των λευκοκυττάρων στους ουλικούς ιστούς κάνουν τον ξενιστή επιρρεπή σε στοματικές λοιμώξεις (Dixon και συν. 2004). Η υπέρσχυση της μικροβιακής λοιμογόνου δύναμης έναντι της αντίστασης του ξενιστή οδηγεί στα κλινικά σημεία της νόσου και κατά συνέπεια στην

Introduction

The primary initiating agent in periodontal disease is dental plaque, a microbial biofilm that accumulates on teeth and is composed of hundreds of different bacterial species within an organized structure (Socransky and Haffajee 1994, Slots 1999, 2005). The bacteria in the biofilm and their by-products, which line the tooth surface on one hand and the epithelial cells of the periodontium on the other hand, irritate the gingival tissues, inducing an “inflammatory response” (Kinane et al. 1991, Kornman et al. 1997). These inflammatory processes that rapidly occur in response to microbial challenges represent early stages of the immune response and are part of the innate immune system, i.e., host responses that require no prior adaptation or experience (Matzinger 2002, Dixon et al. 2004). Inflammation is a well-coordinated process that involves increased vascular permeability, followed by migration of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and lymphocytes into the lesion and activation of cells to secrete inflammatory mediators that guide a cascade of biochemical and cellular events (Larsen and Henson 1983, Sharma and Mohsin 1990). Although inflammation was once considered a nonspecific arm of the immune response, current knowledge indicates remarkable specificity, with the involvement of a wide-ranging assortment of receptors and matching ligands. The specific nature of inflammation allows rapid identification and a better tailored response to infection (Janeway 1992) or to other threatening external stimuli (Matzinger 2002).

The primary role of the inflammatory reaction is to protect the host against bacterial invasion. A barrier of neutrophils is strategically located between the subgingivally accumulated bacteria and the junctional epithelium to form the first line of defense. In healthy conditions, cytokines such as interleukin-8 (IL-8) and other molecules, including E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), which are expressed by endothelial and epithelial cells, fibroblasts, and macrophages in the gingivae, allow extravasation of the neutrophil and accumulation into the gingival tissues in proximity to the colonized root surface. Neutrophils migrate out of a blood vessel in the periodontal tissues into the lamina propria and through there into the junctional epithelium and eventually into the gingival crevice, where they form a wall against the surface layer of the biofilm, trying to neutralize bacteria in the plaque biofilm (Ryder 2010). These specific events, which take place before any clinical or histological sign of inflammation becomes evident, retain the healthy state of the periodontium. Failure of this inflammatory infiltrate owing to functional disorders of the neutrophils/macrophages or deficiencies in diapedesis, chemotaxis, and homing of these leukocytes into the gingival tissues makes the host susceptible to oral infections (Dixon et al. 2004). Microbial virulence overriding the host resistance results in clinical signs of disease and therefore tissue destruction until

ιστική καταστροφή μέχρι ο ξενιστής να απαντήσει με αμυντικές στρατηγικές για τη ρύθμιση και αποκατάσταση της βλάβης λόγω της μικροβιακής πλάκας και την αποκατάσταση της ισορροπίας στο τοπικό περιβάλλον (Page και συν. 1997).

Οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται στην απόκριση του ξενιστή μεταξύ ατόμων θα μπορούσαν να σχετίζονται με μικροβιολογικές αλλαγές στη σχετική σύνθεση ανάμεσα στα συμβιωτικά και παθογόνα μικρόβια ή/και αλλαγές στις έμφυτες, φλεγμονώδεις ή ανοσολογικές αντιδράσεις του ξενιστή. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να οδηγήσουν σε διαταραχή ανάμεσα στην άμυνα του ξενιστή και τη μικροβιακή προσβολή που εκφράζεται κλινικά ως ουλίτιδα. Η εμμένουσα φύση της νόσου οδηγεί τελικά σε περιοδοντίτιδα που χαρακτηρίζεται από καταστροφή των στηρικτικών περιοδοντικών ιστών όπως ο συνδετικός ιστός και το οστό, η οποία τελικά οδηγεί σε απώλεια δοντιών. Η εξέλιξη της περιοδοντικής νόσου οφείλεται σε συνδυασμό παραγόντων που σχετίζονται με το περιβάλλον, τον ξενιστή και το γενετικό υπόβαθρο που περιλαμβάνουν παθογόνα βακτήρια, υψηλά επίπεδα φλεγμονωδών ιστικών κυτοκινών, καταστρεπτικά για τους ιστούς ένζυμα όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας και τα χαμηλά επίπεδα των αντιφλεγμονωδών κυτοκινών (Page και συν. 1997). Τα υψηλά επίπεδα των βιοενεργών φλεγμονωδών κυτοκινών όπως η IL-1 και ο ογκονεκρωτικός παράγοντας (TNF) έχουν περιγραφεί σε προσβεβλημένους περιοδοντικούς ιστούς (Kinane και συν. 1991, Stashenko και συν. 1991). Αυτές και άλλες κυτοκίνες διεγείρουν την παραγωγή πολλών μεσολαβητών που επιταχύνουν τη φλεγμονώδη διαδικασία. Ανεξέλεγκτη παραγωγή αυτών των φλεγμονωδών κυτοκινών μπορεί να συμβάλει στην παθογένεια της νόσου. Παρόλο ότι οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες είναι απαραίτητες για την εκκαθάριση μερικών βακτηριακών λοιμώξεων (O'Reilly και συν. 1992), η ίδια ενισχυμένη ευεργετική απόκριση μπορεί επίσης να προκαλέσει ιστική καταστροφή που παρατηρείται σε χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως η περιοδοντική νόσος. Οι δυσλειτουργίες της έμφυτης ανοσίας μπορεί να είναι καθοριστικές για την πρόκληση ευπάθειας στη φλεγμονή και επομένως υπεύθυνες για την επίπτωση και τη βαρύτητα των χρόνιων φλεγμονωδών νόσων (Darveau και συν. 1997). Η αιτιοπαθογένεια της περιοδοντικής νόσου περιλαμβάνει την διέγερση της φυσικής, φλεγμονώδους και επίκτητης ανοσίας από μικρόβια που βρίσκονται στο περιοδόντιο και φαίνεται να είναι μια αρκετά περίπλοκη διαδικασία. Οι περιοδοντικές βλάβες μοιάζουν με τον χρόνιο κοκκιωματώδη ιστό έχοντας ένα ευρύ φάσμα φλεγμονωδών και ανοσοποιητικών κύτταρων και ένα σημαντικό μέρος κατεστραμμένων κυττάρων που αποτελούν τη «συσκευή» του περιοδοντίου. Επίσης, παρατηρείται διαταραχή της επούλωσης με πολλαπλασιασμό του επιθηλίου των ούλων και του κοκκιώδους ιστού (Page και συν. 1997).

Η ανασκόπηση αυτή αναπτύσσει τις πρώιμες βακτηριακές-επιθηλιακές αλληλεπιδράσεις και τις επακόλουθες αντιδράσεις των επιθηλιακών κυττάρων και συνεπώς του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή προς στα βακτήρια, λαμβάνοντας υπόψιν ότι αυτό είναι μόνο ένα μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος, με την επίκτητη απάντηση να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Πιο πρόσφατα, το έμφυτο και το φλεγμονώδες σκέλος έχουν συγκεντρώσει αυξανόμενο επιστημονικό ενδιαφέρον και έχουν τεράστια επιρροή στη μετέπειτα πορεία της χρόνιας φλεγμονώδους περιοδοντικής νόσου. Οι αλληλεπιδράσεις με-

the host responds with defensive strategies to regulate and restore the damage from the microbial plaque and to reestablish the equilibrium in the local environment (Page et al. 1997).

Variations in the host response across subjects occur and could be related to changes in the microbial plaque in terms of relative composition of commensal and pathogenic bacterial flora and/or changes in innate, inflammatory, or immune responses of the host. These alterations may lead to an imbalance between the host defense and the microbial offense that is expressed clinically as gingivitis. The persisting disease process eventually leads to periodontitis, characterized by destruction of tissues surrounding and supporting the teeth, including connective tissue and bone, which finally results in tooth loss. Progression of periodontal disease is due to a combination of environment, host-derived, and genetic factors, including pathogenic bacteria, high tissue levels of inflammatory cytokines, tissue-destructive enzymes such as matrix metalloproteinases, and low levels of anti-inflammatory cytokines (Page et al. 1997). High levels of bioactive inflammatory cytokines such as interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) have been described in diseased periodontal tissues (Kinane et al. 1991, Stashenko et al. 1991). These and other cytokines stimulate the production of many mediators that accelerate the inflammatory process. Uncontrolled production of these inflammatory cytokines may contribute to the pathogenesis of the disease. Although inflammatory cytokines are essential for clearing some bacterial infections (O'Reilly et al. 1992), the same beneficial enhanced response can also induce the tissue destruction observed in chronic inflammatory conditions such as periodontal disease. Dysfunctions of the innate responses may be critical in creating susceptibility to inflammation and thus responsible for the incidence and severity of chronic inflammatory diseases (Darveau et al. 1997). The etiopathogenesis of periodontal disease involves stimulation of innate, inflammatory, and adaptive immune systems by microorganisms residing in the periodontium and seems to be a rather complicated process. Periodontal lesions resemble chronic granulation tissue, with a wide range of inflammatory and immune cells and a substantial amount of damaged cells forming the periodontal apparatus. A frustrated healing response with proliferation of the gingival epithelium and granulation tissue is also noted (Page et al. 1997).

This review addresses the early bacterial-epithelial cell interactions and the subsequent responses of the epithelial cell and thus the innate immune system of the host against bacteria, while taking into consideration that this is only one component of the immune system, with the adaptive response also thought to play an important role. More recently, the innate and inflammatory systems have gained increasing scientific attention and clearly have enormous influence on the subsequent course of chronic inflammatory periodontal disease. The bacterial-cell interactions, the role of

ταξύ βακτηρίων-κυττάρων, ο ρόλος των υποδοχέων τύπου Toll (TLRs) των επιθηλιακών κυττάρων που ανταποκρίνονται σε διάφορες βακτηριακές προκλήσεις, η ποικιλότητα των αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs) που απελευθερώνονται ως απάντηση στις μικροβιακές προσβολές και οι σηματοδοτικές αντιδράσεις του ξενιστή που παράγουν τις κυτοκίνες και συνολικά η κυτταρική απόκριση που αφορά την έκκριση πρωτεϊνών, την απόπτωση ή την κυτταρική λύση αναλύονται στις επόμενες ενότητες.

Πρώιμες βακτηριακές-κυτταρικές αλληλεπιδράσεις

Στην ουλοδοντική σχισμή ο βακτηριακός πληθυσμός έχει με τη μορφή βιοϋμένα προσκολλημένου στη ριζική επιφάνεια, όπου είναι συνεχώς εκτεθειμένος στον ορό και στο υγρό της ουλοδοντικής σχισμής που προέρχεται από τους ιστούς. Η σύγχρονη γνώση φανερώνει ότι ο βακτηριακός βιοϋμένας διεγείρει συνεχώς τον ξενιστή με την παραγωγή πρωτεασών ο οποίος παράγει τοπικά AMPs. Όλη η περιοχή διαβρέχεται από ορώδες εξίδρωμα που περιέχει μια τεράστια ποικιλία μορίων, όπως οι αναστολείς πρωτεασών (Kinane και συν. 1991, Adonogianaki και συν. 1994, 1996) και άλλα μόρια της συστηματικής άμυνας του ξενιστή, όπως αντισώματα και συμπλήρωμα. Ενώ είναι σαφές ότι υπάρχει ισορροπία μεταξύ παθογόνων-ξενιστή, όπως στη νόσο του Crohn (Wehkamp και συν. 2005b), αλλαγές στο ισοζύγιο μπορεί να οδηγήσουν σε επεισόδια ιστικής καταστροφής με εμφανή κλινικά σημεία τη διαπύση και αιμορραγία. Πρόσφατα, η κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους το επιθήλιο των ούλων ρυθμίζει τις βακτηριακές προκλήσεις έχει συγκεντρώσει αυξανόμενο βιβλιογραφικό ενδιαφέρον. Τα μικρόβια του βιοϋμένα παράγουν πρωτεάσες για τη συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών από τους ιστούς του ξενιστή, ενώ παράλληλα παρεμποδίζουν την επίθεση του ξενιστή προς αυτά με τη βοήθεια AMPs, συστηματικών αντισωμάτων και συμπληρώματος. Η απελευθέρωση τόσο των κυτοκινών από τα επιθηλιακά κύτταρα όσο και των χημειοκινών και χημειοτακτικών παραγόντων από τα βακτήρια και την ενεργοποίηση του συμπληρώματος εξασφαλίζουν την προσέλευση των φαγοκυττάρων και την περαιτέρω επίθεση στο βιοϋμένα. Η εκτενής ανάπτυξη των φαγοκυττάρων είναι πέρα από τον σκοπό της παρούσας ανασκόπησης, αλλά είναι σαφές ότι τα κύτταρα αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά στις αλληλεπιδράσεις ξενιστή και μικροβίων στο περιοδόντιο.

Η απομάκρυνση βακτηρίων από το βιοϋμένα, η προσκόλλησή τους στον επιθηλιακό φραγμό του ξενιστή και η ακόλουθη διείσδυση, απόπτωση, καταστροφή κυττάρων, αποτελούν μία επιπρόσθετη σύνθετη αλληλεπίδραση, η οποία σύμφωνα με τη σύγχρονη γνώση θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν, χωρίς να υπάρχει σαφής τεκμηρίωση από *in vivo* μελέτες. Συνεπώς, το αρχικό αποτέλεσμα της διαμάχης μεταξύ μικροβίων και ξενιστή καθορίζεται από το μέγεθος και τη φύση τόσο της μικροβιακής πρόκλησης όσο και της έκκρισης κυτοκινών και AMPs από τα επιθηλιακά κύτταρα και τα φαγοκύτταρα και σε μετέπειτα στάδια από την επίκτητη ανοσολογική απάντηση.

Οι αντιδράσεις των επιθηλιακών κυττάρων στην άμυνα του ξενιστή

Τα επιθηλιακά κύτταρα λειτουργούν σαν μια διαπερατή μεμβράνη που καλύπτει το σώμα και επιτρέπει την ανταλλαγή ουσιών όπως ιόντα, μόρια και βακτήρια (Shimono και συν. 2003). Η εξωτερική στιβάδα των επιθηλιακών κυττάρων συνιστά μία

epithelial cell Toll-like receptors (TLRs) responding to different bacterial challenges, the variable antimicrobial peptides (AMPs) released in response to these insults, and the host signaling responses that produce cytokines and overall cellular response of these cells in terms of protein secretion, apoptosis, or cell lysis are comprehensively discussed in the following sections.

Early bacterial-cell interactions

Within the gingival crevice, the bacterial population is present as a biofilm adherent to the root surface where there is constant exposure to serum and tissue-derived gingival crevicular fluid. Current knowledge suggests that the bacterial biofilm constantly challenges the host by producing proteases, with the host producing local AMPs. The whole area is bathed in serum transudate, which contains a vast range of molecules, including protease inhibitors (Kinane et al. 1991, Adonogianaki et al. 1994, 1996) and other systemic host defense molecules such as antibodies and complement. Clearly there is a balance between pathogen and host, as in the case of Crohn's disease (Wehkamp et al. 2005b), but changes in the equilibrium could lead to episodes of tissue breakdown with evident clinical signs of pus formation and bleeding. Lately, the understanding of the mechanisms by which gingival epithelial cells modulate bacterial challenges has received increasing attention in the literature. The bacteria that form the biofilm produce proteases ostensibly to help garner host tissue molecules for nutrition, but also to disrupt host attack on the biofilm through AMPs and systemically derived complement and antibodies. The release of cytokines by the epithelial cells, as well as chemokines and chemotactic molecules produced by bacteria and from complement activation, ensures the ingress of phagocytes to further attack the microbial biofilm. A discourse on the professional phagocytes is beyond the scope of the current review, but clearly these cells are immensely important in periodontal host-microbe interactions.

The shedding of bacteria from the biofilm, which then attach to the host epithelial barrier and undertake invasion, apoptosis, cell killing, seems to be a complex additional immunological interaction that current knowledge suggests should be considered, although definite *in vivo* evidence is lacking relevant to these events. Thus, the initial outcome of the microbial-host conflict depends on the magnitude and nature of both the microbial biofilm challenge and the cytokine and AMP secretion by epithelial cells, as well as by phagocytes and adaptive immune responses in the later stages.

Responses of the epithelial cells in host defense

Epithelial cells function as a permeable barrier that covers the body and allows the exchange of substances such as ions, molecules, and bacteria (Shimono et al. 2003). The outer epithelial cell layer constitutes

θέση που καταλαμβάνεται από μεγάλο αριθμό συμβιωτικών βακτηρίων και αποτελεί το πρώτο εμπόδιο με το οποίο βρίσκονται αντιμέτωπα τα δυνητικά παθογόνα βακτήρια (Shimono και συν. 2003, Aas και συν. 2005). Στη βακτηριακή πρόκληση, τα επιθηλιακά κύτταρα συνεργάζονται για να οργανώσουν φλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές αποκρίσεις, ενώ μπορεί να εμπλέκονται και στην διέγερση προσαρμοστικών ανοσοαπαντήσεων, συνήθως μέσω αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων όπως τα δενδριτικά κύτταρα ή τα κύτταρα του Langerhans που βρίσκονται ανάμεσα στις επιθηλιακές στιβάδες (Walsh 2003, Cutler και Jotwani 2006). Τα επιθηλιακά κύτταρα του στοματικού βλεννογόνου είναι πλακώδη, οργανωμένα σε στιβάδες και λειτουργούν ομαδικά στις αμυντικές τους αντιδράσεις. Αυτή η συμπεριφορά αντιδιαστέλλεται με τα υψηλής ικανότητας ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα, που χρησιμοποιούν υποδοχείς και μόρια και λειτουργούν αποτελεσματικά, μόνα τους ή σε συνεργασία με άλλους κυτταρικούς τύπους, ως «επαγγελματίες» αμυντικά κύτταρα. Συνεπώς, οι αυτοκρινείς επιδράσεις των μορίων που απελευθερώνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα και διεγείρουν άλλα κύτταρα του επιθηλίου, είναι σημαντικές. Σε αυτά τα ρυθμιστικά μόρια περιλαμβάνονται οι χημειοκίνες που ως σήματα συναγερευμού στρατολογούν «επαγγελματίες» φαγοκύτταρα και λεμφοκύτταρα στην περιοχή.

Τα επιθηλιακά κύτταρα είναι ευέλικτα και εμπλέκονται σε πολλές λειτουργίες:

- (1) απόπτωση, με στόχο τον περιορισμό των επιβλαβών επιδράσεων της κυτταρικής λύσης μέσω του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, καθώς κατά την κυτταρόλυση απελευθερώνονται στην περιοχή μόρια με δυνητικά καταστρεπτικές συνέπειες για τα γειτονικά κύτταρα του ξενιστή,
- (2) έναρξη της φλεγμονής και άλλων αμυντικών μηχανισμών μέσω των προφλεγμονωδών κυτοκινών και της απελευθέρωσης χημειοκινών,
- (3) άμεση καταστροφή των μικροβίων με την παραγωγή AMPs,
- (4) απελευθέρωση μορίων για την αύξηση της ακεραιότητας της μεμβράνης και πολλαπλασιασμός για κάλυψη πιθανών κενών της επιθηλιακής επένδυσης και
- (5) επαγωγή των προσαρμοστικών ανοσοαπαντήσεων μέσω της αρμονικής συνεργασίας με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα έναντι των παθογόνων ή ανάπτυξη ανοχής σε συμβιωτικά μικρόβια που δεν επηρεάζουν δυσμενώς τον ξενιστή

(LeClair 2003, Walsh 2003, Dixon και συν. 2004, Brozovic και συν. 2006, Cutler και Jotwani 2006).

Τα επιθηλιακά κύτταρα βομβαρδίζονται συνεχώς από πληθώρα ερεθισμάτων, από ορμόνες και ένζυμα μέχρι μικρόβια και κυτοκίνες. Οι σύνθετες διατάξεις προειδοποιητικών σημάτων που οφείλονται στη διέγερση του επιθηλίου από τα μικρόβια, καθορίζουν εάν ένα κύτταρο θα δράσει εναντίον του μολυσματικού παράγοντα, αν θα πολλαπλασιαστεί ή αν θα πεθάνει.

Ο ρόλος των TLRs στην έμφυτη ανοσία

Η έμφυτη ανοσία θεωρείται πλέον υψίστης σημασίας για την άμυνα του ξενιστή, είναι πλήρης και μπορεί να καθορίζει τις μεταγενέστερες φλεγμονώδεις διεργασίες και επίκτητες ανοσολογικές απαντήσεις. Η ποικιλία αυτών των διεργασιών, ίσως εξηγεί κάποιες από τις διαφορές που παρατηρούνται σε άτομα με πειραματική ουλίτιδα (Trombelli 2004) και την ποικιλότητα στον τρόπο εκδήλωσης της νόσου σε άτομα που είναι ευαίσθητα

a niche occupied by massive amounts of commensal bacteria and is the first physical obstacle that putative pathogenic microbes encounter (Shimono et al. 2003, Aas et al. 2005). Upon bacterial challenge, epithelial cells collaborate in mounting inflammatory and antimicrobial responses and may be involved in triggering adaptive immune responses to microbes, often through antigen-presenting cells such as dendritic cells or Langerhans cells located within the epithelial cell layers (Walsh 2003, Cutler and Jotwani 2006). Epithelial cells of the oral mucosa are stratified squamous cells, grouped in layers, and work as a team in their defensive responses. This functional behavior is in contrast with the highly capable neutrophils and monocytes, which utilize additional receptors and molecules and can function very effectively on their own and with other cell types as “professional” defense cells. Therefore, the importance of the autocrine effects of molecules released by epithelial cells to trigger other cells of the epithelium is highlighted. These regulatory molecules include chemokines which act as alarm signals to recruit professional phagocytes and lymphocytes into the region.

Epithelial cells are versatile and can be engaged in multiple tasks:

- (1) apoptosis, designed to restrict the harmful effects of cell lysis by programmed cell death, rather than cytolysis, where molecules would be released in the area with potential detrimental consequences to the adjacent host cells,
- (2) initiation of inflammation and other host defensive responses by proinflammatory cytokine and chemokine release,
- (3) immediate killing of microbes by AMP production,
- (4) release of molecules to increase membrane integrity and proliferation to cover potential gaps in the epithelial lining, and
- (5) induction of adaptive immune responses working in harmony with antigen-presenting cells against pathogens or tolerance to commensal microbes that do not adversely affect the host

(LeClair 2003, Walsh 2003, Dixon et al. 2004, Brozovic et al. 2006, Cutler and Jotwani 2006).

Epithelial cells are constantly bombarded by a vast array of stimuli, from hormones and enzymes to microbes and cytokines. Complex patterns of warning signs that follow epithelial stimulation by microbes determine whether a cell takes action against the infectious agent, proliferates, or dies.

The role of TLRs in the innate immunity

Innate immunity is now recognized as being crucial to the host response, is comprehensive, and may determine subsequent inflammatory and adaptive immune processes. Variability in these processes may explain some of the differences seen in subjects undergoing experimental gingivitis (Trombelli 2004) and the variability in disease experience seen in subjects who

ή ανθεκτικά στη χρόνια φλεγμονώδη περιοδοντική νόσο (Jenkins και Kinane 1989).

Η οργάνωση του καλά δομημένου υποουλικού μικροβιακού βιοϋμένα παίζει σημαντικό ρόλο στις ποσότητες και τους τύπους των αντιγόνων που απελευθερώνονται στην ουλοδοντική σχισμή. Τα βακτήρια του οδοντικού βιοϋμένα αλληλεπιδρούν με τον ξενιστή με: (α) άμεσους μηχανισμούς προσκόλλησης, (β) εισβολή σε συγκεκριμένα κύτταρα όπως τα επιθηλιακά κύτταρα των ούλων, (γ) απελευθέρωση προϊόντων που ανιχνεύονται από υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRRs). Οι υποδοχείς αυτοί που εμπλέκονται σε συγκεκριμένες απαντήσεις της έμφυτης ανοσίας, είναι στρατηγικά τοποθετημένοι στη διεπιφάνεια μεταξύ ξενιστή και μικροβίων και έχουν εξελιχθεί για να αναγνωρίζουν εξελικτικά συντηρημένα μοριακά μικροβιακά πρότυπα (MAMPs) (Medzhitov και Janeway 2000). Οι TLRs είναι σημαντικοί PRRs και παίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της έμφυτης ανοσίας και των φλεγμονωδών αποκρίσεων (Akira 2001, Beutler 2004). Δεν είναι τυχαίο ότι οι TLRs εκφράζονται κυρίως σε κύτταρα που μεσολαβούν στην πρώτη γραμμή άμυνας, όπως στα ουδετερόφιλα, στα δενδριτικά κύτταρα, στα μονοκύτταρα/μακροφάγα, καθώς και σε κύτταρα που εκτίθενται άμεσα στο εξωτερικό περιβάλλον, όπως τα επιθηλιακά κύτταρα.

Συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας TLR ανταποκρίνονται σε διαφορετικούς τύπους MAMPs, παρέχοντας έτσι στην έμφυτη ανοσία μια σχετική ειδικότητα (Akira 2001, Beutler 2004). Για παράδειγμα, ο TLR2 ανταποκρίνεται στο λιποτειχοϊκό οξύ (LTA) και σε μικροβιακές λιποπρωτεΐνες, ο TLR4 στους λιποπολυσακχαρίτες (LPS), ο TLR5 στη φλαγγελίνη και ο TLR9 στις θέσεις του βακτηριακού DNA με αλληλουχία «-C-φωσφορικό-G-» (Akira 2001, Beutler 2004). Αν και ο TLR2 εμπλέκεται κυρίως στην αναγνώριση πεπτιδογλυκανών και λιποτειχοϊκού οξέος των Gram-θετικών βακτηρίων (Underhill και συν. 1999, Arbour και συν. 2000), τόσο ο TLR2 όσο και ο TLR4 εμπλέκονται στην αναγνώριση LPS και άλλων στοιχείων του κυτταρικού τοιχώματος του *Porphyromonas gingivalis* (Hayashi και συν. 2010).

Η ανακάλυψη των TLRs και η ταυτοποίηση του συνόλου των συνδετών τους ώθησε στην υπόθεση του «γραμμωκόδικα» στην έμφυτη αναγνώριση των βακτηρίων. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, οι TLR αναγνωρίζουν έναν «γραμμωκόδικα» στα μικρόβια για να σχεδιάσουν την κατάλληλη έμφυτη ανοσοαπάντηση (Aderem 2003). Για παράδειγμα, ταυτόχρονη ενεργοποίηση των TLR5 και TLR4 θα μπορούσε να ερμηνευθεί σαν μόλυνση από κάποιο μαστιγοφόρο Gram-αρνητικό βακτήριο. Έτσι, το ανοσολογικό σύστημα του ξενιστή εντοπίζει τα παθογόνα που έχουν εισβάλλει κυρίως μέσω μιας σειράς PRRs που ονομάζονται TLRs.

Οι LPS είναι το κύριο συστατικό του εξωτερικού κυτταρικού τοιχώματος των Gram-αρνητικών περιοπαθογόνων. Πρόκειται για παράγοντα κλειδί στην έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης (Suffredini 1999) και θεωρείται σημαντικός λοιμογόνος παράγοντας στην παθογένεια της περιοδοντικής νόσου. Η αναγνώριση των LPS από φλεγμονώδη κύτταρα και η μεταγωγή του LPS σήματος εμπλέκει τους TLRs και διάφορα άλλα μόρια, ιδιαίτερα τον υποδοχέα CD14 και την λιποπολυσακχαριτιδική συνδετική πρωτεΐνη (LBP) (Shapira και συν. 1994, Chow και συν. 1999). Οι TLRs εμπλέκονται κυρίως στη διαφοροποίηση των συμβιωτικών από τα παθογόνα και συνεπώς ξεκινούν μια ανοσοαντίδραση ενάντια στα τελευταία, αγνοώντας τα πρώτα. Έτσι, ο ξενι-

are susceptible or resilient to chronic inflammatory periodontal disease (Jenkins and Kinane 1989).

The organization of the well-structured subgingival microbial biofilm plays a key role in the quantities and types of antigens released in the gingival crevice. The bacteria of the dental biofilm interact with the host by (a) direct adherence mechanisms, (b) invading specific cells such as gingival epithelial cells, (c) releasing products that are detected by the pattern-recognition receptors (PRRs). These receptors are implicated in specific responses of the innate immunity, are strategically located at the interface between the mammalian host and microbes, and have evolved to recognize highly conserved microbe-associated molecular patterns (MAMPs) (Medzhitov and Janeway 2000). TLRs are important PRRs and play a central role in the induction of innate immune and inflammatory responses (Akira 2001, Beutler 2004). Not surprisingly, TLRs are expressed predominantly in cells that mediate the first line of defense, such as neutrophils, dendritic cells, monocytes/macrophages, and in cells that are directly exposed to the outer environment, such as epithelial cells.

Distinct members of the TLR family respond to different types of MAMPs, endowing the innate response with a relative specificity (Akira 2001, Beutler 2004). For example, TLR2 responds to lipoteichoic acid (LTA) and microbial lipoproteins, TLR4 to lipopolysaccharide (LPS), TLR5 to flagellin, and TLR9 to bacterial “-C-phosphate-G-” DNA sequence sites (Akira 2001, Beutler 2004). Although TLR2 is primarily involved in the recognition of peptidoglycans and lipoteichoic acid of Gram-positive bacteria (Underhill et al. 1999, Arbour et al. 2000), both TLR2 and TLR4 are involved in recognizing LPS and other cell wall components of *Porphyromonas gingivalis* (Hayashi et al. 2010).

The discovery of TLRs and the identification of their ligand repertoire have prompted the “bar code” hypothesis of the innate recognition of microbes. According to this concept, TLRs read a “bar code” on microbes to tailor an appropriate innate response (Aderem 2003). For instance, simultaneous activation of TLR5 and TLR4 would be interpreted as infection with a flagellated Gram-negative bacterium. Thus, the host immune system detects invading pathogens primarily through an array of PRRs called the TLRs.

LPS is a major component of the outer cell wall of Gram-negative periodontal pathogenic bacteria. LPS is a key factor in eliciting the inflammatory response (Suffredini 1999) and is considered an important virulence factor in the pathogenesis of periodontal disease. The recognition of LPS by inflammatory cells and the transduction of LPS signal involve the TLRs and several additional molecules, particularly the CD14 receptor and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) (Shapira et al. 1994, Chow et al. 1999). TLRs are primarily involved in differentiating commensals from pathogens and, as a result, they initiate an immune response to the latter and ignore the former. Thus,

στής μπορεί να ανταποκριθεί μέσω της φλεγμονής σε μια μεγάλη ποικιλία ερεθισμάτων, από μια μόλυνση που προκαλείται από Gram-αρνητικά βακτήρια μέχρι την παρουσία αυξημένων επιπέδων χοληστερόλης (Dixon και συν. 2004). Ωστόσο, η φύση των αποκρίσεων διαφέρει και ο χαρακτήρας τους εξαρτάται από συγκεκριμένους υποδοχείς και οδούς μεταγωγής σημάτων.

Αντιμικροβιακά πεπτιδία

Για να διατηρηθεί η υγεία, οι εκκρίσεις του στοματικού επιθηλίου περιέχουν πολλές αντιμικροβιακές πρωτεΐνες που λειτουργούν σαν πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των μικροβιακών προκλήσεων. Το σάλιο είναι ένα πολύπλοκο μείγμα πρωτεϊνικού εξιδρώματος των σιελογόνων αδένων και περιέχει πολλά AMPs. Οι Abiko και συν. (2003) έχουν μελετήσει τις αμυνίνες του σάλιου και των σιελογόνων αδένων και υπέθεσαν πως η πλειοψηφία των AMPs του σάλιου εκκρίνονται επίσης από τα στοματικά κερατινοκύτταρα. Πάνω από 800 ευκαρυωτικά AMPs έχουν ταυτοποιηθεί και ανευρίσκονται σε βάσεις δεδομένων AMPs. Οι αμυνίνες έχουν τυπικά μερικά κοινά αμινοξέα που είναι απαραίτητα για τη βασική δομή, αλλά κατά τ' άλλα, τα μέλη της οικογένειας διαφέρουν μεταξύ τους με μέγεθος από 5 ως 50 kDa και συνολικά θετικό φορτίο (Lynn και συν. 2004, Ganz 2005). Η ποικιλότητα των AMPs επιτρέπει στο έμφυτο ανοσολογικό σύστημα να αντιδράει αποτελεσματικά σε ευρύ φάσμα μικροβίων. Επιπλέον, η αντιμικροβιακή ανθεκτικότητα είναι λιγότερο πιθανό να εκδηλωθεί όταν η απάντηση του ξενιστή περιλαμβάνει πολλαπλές αντιμικροβιακές πρωτεΐνες εναντίον ενός μόνο παθογόνου.

Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι πολλές αντιμικροβιακές πρωτεΐνες, όπως οι αμυνίνες των ουδετερόφιλων, οι β-αμυνίνες, η λυσοζύμη, η βακτηριοκτόνος/αύξησης της διαπερατότητας πρωτεΐνη (BPI), οι πρωτεΐνες τύπου BPI, οι ιστατίνες, οι πλουσίνες σε προλίνη πρωτεΐνες, η καθελιδίνη LL-37, οι κυστατίνες, οι βλεννίνες και οι εκκρινόμενοι αναστολείς της λευκοπρωτεϊνάσης (SLPI) ανιχνεύονται στο στόμα (Ghafouri και συν. 2003, Yao και συν. 2003, Huang 2004, Vitorino και συν. 2004, Wilmarth και συν. 2004, Hardt και συν. 2005, Hu και συν. 2005, Xie και συν. 2005, Guo και συν. 2006, Walz και συν. 2006). Αυτές οι οικογένειες πρωτεϊνών εκφράζουν μια ποικιλία αντιμικροβιακών λειτουργιών που περιλαμβάνουν τη διαπερατότητα των μεμβρανών, την αποδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος, τη βακτηριακή οξειδωτική και άλλες (Dale και Fredericks 2005, Tabak 2006). Πολλά μοντέλα έχουν προταθεί για το μηχανισμό δράσης των AMPs. Τα κατιονικά πεπτιδία αλληλεπιδρούν με τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες φωσφολιπιδίων στην εξωτερική μεμβράνη μικροβιακών κυττάρων στόχων μέσω ηλεκτροστατικής έλξης (Zasloff 2002). Σύμφωνα με το μοντέλο «Shai-Matsuzaki-Huang», οι αμυνίνες καταστρέφουν τα μικρόβια διαταράσσοντας την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης (Zasloff 2002). Εκτός από τα βακτήρια, οι ανθρώπινες αμυνίνες φαίνεται να δρουν και ενάντια σε μύκητες, ιούς και πρωτόζωα (Lehrer και συν. 1993, Lehrer 2004). Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι αμυνίνες έχουν επίσης και χημειοτακτικές ιδιότητες για τα κύτταρα που εκφράζουν τον χημειοκινικό υποδοχέα CCR-6, όπως τα δένδριτικά κύτταρα (Yang και συν. 1999). Αυτό υποδηλώνει ότι οι αμυνίνες παίζουν καίριο ρόλο γεφυρώνοντας το έμφυτο και το επίκτητο σκέλος του ανοσολογικού συστήματος (Wehkamp και συν. 2005a, 2005b).

Οι κατιονικές πρωτεΐνες αποτελούν μια μεγάλη ομάδα αντιμικροβιακών πρωτεϊνών με διαφορετικές αντιμικροβιακές δραστη-

the host may respond through inflammation to a wide variety of challenges, ranging from a Gram-negative bacterial infection to excess cholesterol (Dixon et al. 2004). However, the nature of the response differs and its character depends on specific receptors and signal transduction pathways.

Antimicrobial peptides

To maintain health, the secretions of oral epithelia contain multiple antimicrobial proteins that act as an early host defense against microbial challenges. Saliva is a complex mixture of protein exudates from salivary glands and contains several AMPs. Abiko and coworkers (2003) have reviewed defensins in saliva and salivary glands and speculated that the majority of AMPs that are present in saliva are also secreted by oral keratinocytes. Over 800 eukaryotic AMPs have been identified and are accessible in AMP databases. Defensins typically share a few key amino acids that are needed for overall structure, but otherwise, they vary greatly between the different family members, ranging from 5 to 50 kDa with a net positive charge (Lynn et al. 2004, Ganz 2005). The diversity of AMPs allows the innate immune system to respond effectively to a wide range of microorganisms. Moreover, antimicrobial resistance may be less likely to develop when the host responses to a single pathogen involve multiple antimicrobial proteins.

Recent studies indicate that numerous antimicrobial proteins, such as neutrophil defensins, beta defensins, lysozyme, bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), BPI-like proteins, histatins, proline-rich proteins, cathelicidin LL-37, cystatins, mucins, and secretory leukoprotease inhibitors (SLPI), are found in the oral cavity (Ghafouri et al. 2003, Yao et al. 2003, Huang 2004, Vitorino et al. 2004, Wilmarth et al. 2004, Hardt et al. 2005, Hu et al. 2005, Xie et al. 2005, Guo et al. 2006, Walz et al. 2006). These antimicrobial protein families represent a variety of antimicrobial functions, including membrane permeabilization, cell wall degradation, bacterial oxidation, and others (Dale and Fredericks 2005, Tabak 2006). Several models have been proposed for the mechanism of action of these AMPs. The cationic peptides interact with negatively charged phospholipid groups on the outer membrane of the microbial target cells via electrostatic attraction (Zasloff 2002). According to the “Shai-Matsuzaki-Huang” model, defensins destroy microbes by disrupting the membrane integrity (Zasloff 2002). Apart from bacteria, human defensins have been shown to have activity against fungi, viruses, and protozoa (Lehrer et al. 1993, Lehrer 2004). Recent evidence suggests defensins also have chemoattractant properties for cells expressing the chemokine receptor CCR-6, such as dendritic cells (Yang et al. 1999). This suggests that defensins play a crucial role in bridging innate and adaptive immune systems (Wehkamp et al. 2005a, 2005b).

Cationic proteins constitute a large group of antimicrobial proteins that represent different antimicro-

ριότητες. Η σημαντικότητά τους απεικονίζεται από το γεγονός ότι η εξάντληση των κατιονικών πρωτεϊνών στα σωματικά υγρά απομακρύνει επίσης και την αντιβακτηριδιακή δραστηριότητα (Cole και συν. 2002). Τα διάφορα κατιονικά πεπτιδία έχουν συγκεκριμένες αντιμικροβιακές δράσεις:

- (1) οι αμυνίνες, η καθελιδίνη και οι PLUNC πρωτεΐνες (κλώνοι-πρωτεΐνες υπερώας, πνεύμονα, ρινικού επιθηλίου) αλληλεπιδρούν άμεσα με τη βακτηριακή κυτταρική μεμβράνη κάνοντάς την διαπερατή (Ganz και Lehrer 1998),
- (2) η λυσοζύμη διασπά τις πεπτιδογλυκάνες βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων και οδηγεί στη ρήξη της μεμβράνης και
- (3) οι αντιμυκητιασικές ιστατίνες συνδέονται με υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, εισέρχονται στο κύτταρο του μύκητα και εμποδίζουν τη μιτοχονδριακή λειτουργία (Kavanagh και Dowd 2004).

Τόσο η υπερέκφραση, όσο και η έλλειψη AMPs έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη στοματικών νοσημάτων. Η έκφραση αμυνινών επάγεται από στοματικά βακτήρια (Vankeerberghen και συν. 2005) και τα επίπεδα αμυνίνης-1 είναι σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με φλεγμονή του στόματος σε σύγκριση με υγιή άτομα (Mizukawa και συν. 1999). Ένα τυπικό παράδειγμα που υπογραμμίζει το σημαντικό αντιμικροβιακό ρόλο των AMPs είναι το σύνδρομο Kostmann, μια συγγενής ουδετεροπενία, η οποία σχετίζεται με υποτροπιάζουσες λοιμώξεις, εμφάνιση περιοδοντικής νόσου και έλλειψη της καθελιδίνης LL-37 και των ανθρωπινών αμυνινών των ουδετερόφιλων (hNP)1-3 (Putsep και συν. 2002). Το εύρημα πως ένας ασθενής με σύνδρομο Kostmann ο οποίος υποβλήθηκε σε μεταμόσχευση μυελού των οστών είχε φυσιολογικά επίπεδα LL-37 αλλά όχι περιοδοντική νόσο, υπογραμμίζει το δυναμικό ρόλο των AMPs στην άμυνα της στοματικής κοιλότητας του ξενιστή (Putsep και συν. 2002). Ωστόσο, ο *P. gingivalis* παρουσιάζει ανθεκτικότητα τόσο στην ανθρώπινη προέλευσης LL-37 όσο και στο συνθετικό πεπτιδίο ιστατίνης «dhvar4a» (Altman και συν. 2006). Το LL-37 πεπτιδίο είναι πιο ευαίσθητο στα βακτήρια καθώς έχει υψηλότερο δυναμικό σύνδεσης με πρωτεΐνες και μικρότερη υδροφοβικότητα συγκριτικά με την ανθρώπινη β-αμυνίνη (hBD)-2 (Agerberth και συν. 1995).

Η αξιολόγηση των επιπέδων AMPs μπορεί να έχει διαγνωστική αξία. Τα χαμηλά επίπεδα hNP1-3 συσχετίζονται με υψηλό επιπολασμό τερηδόνας σε παιδιά ενώ άλλα AMPs (π.χ. hBD-3, LL-37) δε φαίνεται να σχετίζονται καλά με τον επιπολασμό της τερηδόνας (Tao και συν. 2005). Ενώ αυτές οι ελλείψεις μεμονωμένων πρωτεϊνών συνδέονται με συγκεκριμένες ασθένειες, είναι διαφορετικές από άλλες καταστάσεις όπως η ξηροστομία στο σύνδρομο Sjögren όπου μπορεί να προκύψουν ανεξέλεγκτες στοματικές λοιμώξεις και τερηδόνα ως αποτέλεσμα εξάντλησης όλων των σιαλικών πρωτεϊνών. Αυτή η διαφοροποίηση τονίζει τη σημαντικότητα της συμπληρωματικότητας στην έμφυτη ανοσολογική άμυνα του βλεννογόνου (Tabak 2006). Μια πιο αναλυτική κατανόηση των αντιμικροβιακών πρωτεϊνών της στοματικής κοιλότητας μπορεί να οδηγήσει στην ανίχνευση υπογραφών πρωτεϊνικής έκφρασης (δακτυλικά αποτυπώματα) για τη διάγνωση διάφορων στοματικών νόσων ή την αναγνώριση ατόμων υψηλού κινδύνου, πριν την εκδήλωση της νόσου. Αρκετές οικογένειες αντιμικροβιακών πρωτεϊνών έχουν ήδη μελετηθεί ενδελεχώς (Bals 2000, Boman 2003, Ganz 2003, Kavanagh και Dowd 2004, Dale και Fredericks 2005).

bial activities. Their importance is illustrated by the fact that depletion of cationic proteins in body fluids also removes antibacterial activity (Cole et al. 2002). The different cationic peptides express specific antimicrobial functions:

- (1) defensins, cathelicidin, and palate lung nasal epithelium clone (PLUNC) proteins interact directly with the bacterial cell membrane leading to permeabilization (Ganz and Lehrer 1998),
- (2) lysozyme cleaves the peptidoglycans of bacterial cell walls leading to membrane rupture, and
- (3) antifungal histatins bind to fungal cell membrane receptors, enter the fungal cells and block the mitochondrial cell function (Kavanagh and Dowd 2004).

Both the overexpression and the lack of AMPs have been linked with the development of oral diseases. Defensin expression is induced by oral bacteria (Vankeerberghen et al. 2005) and the levels of defensin-1 are significantly higher in patients with oral inflammation compared with healthy controls (Mizukawa et al. 1999). A typical example to underline the important role of AMPs is morbus Kostmann disease, a congenital neutropenia that is associated with recurrent infections, periodontal disease, and deficiencies in cathelicidin LL-37 and human neutrophil defensins (hNP)1-3 (Putsep et al. 2002). The finding that one morbus Kostmann patient who had undergone bone marrow transplant had normal levels of LL-37 and no periodontal disease underscores the potential role of AMPs in host defense of the oral cavity (Putsep et al. 2002). However, *P. gingivalis* has been shown to be resistant to both human-derived LL-37 and synthetic histatin-derived peptide “dhvar4a” (Altman et al. 2006). LL-37 peptide is more sensitive to bacteria, as it has higher protein binding potential and lower hydrophobicity compared with human β-defensin (hBD)-2 (Agerberth et al. 1995).

Evaluation of the AMP levels may have a diagnostic value. Low levels of hNP1-3 correlated with a high incidence of caries in children, even though other AMPs (e.g., hBD-3, LL-37) may not correlate well with caries incidence (Tao et al. 2005). While these single protein deficiencies are linked to specific diseases, they are different from other conditions such as xerostomia in Sjögren syndrome, where rampant oral infections and dental decay occur as a result of the depletion of all salivary proteins. This difference emphasizes the importance of complementarity in the mucosal innate immune defense (Tabak 2006). A more comprehensive understanding of the oral antimicrobial proteins may lead to the development of protein expression signatures (fingerprints) which could be utilized in the diagnosis of individual oral diseases or the identification of individuals at risk, prior to the development of the disease. Several families of antimicrobial proteins have already been extensively reviewed (Bals 2000, Boman 2003, Ganz 2003, Kavanagh and Dowd 2004, Dale and Fredericks 2005).

Τα συνθετικά AMPs hBD-1, -2, και -3 και η LL-37 έχουν δοκιμαστεί εναντίον παθογόνων της στοματικής κοιλότητας και τερηδογόνων βακτηριών (Ouhara και συν. 2005). Το *Fusobacterium nucleatum* βρέθηκε να είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στα hBD-2 και -3 και ο *Streptococcus mutans* ήταν επίσης εξαιρετικά ευαίσθητος στο hBD-3. Σε μια άλλη σχετική μελέτη, 100% των αερόβιων ήταν ευαίσθητα στα hBD-2 και -3, ενώ μόνο 21,4% και 50% των αναερόβιων ήταν ευαίσθητα στα hBD-2 και -3, αντίστοιχα (Joly και συν. 2004). Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα των συνθετικών hBD-2 εναντίον των *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* και *S. mutans* διερευνήθηκε με βακτηριοκτόνες δοκιμασίες σε υγρά θρεπτικά υλικά και δοκιμασίες διάχυσης (Mineshiba και συν. 2003). Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα του hBD-2 ήταν σχεδόν παρόμοια με αυτή της μινocυκλίνης σε ισομοριακές συγκεντρώσεις. Το hBD-3 έχει βακτηριοκτόνο δράση σε στοματικά βακτήρια όπως ο *S. mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus*, *A. actinomycetemcomitans* και *P. gingivalis* (Maisetta και συν. 2003). Επίσης, μέλη της οικογένειας των καθελιδινών, που περιλαμβάνουν το πρόβιο SMAP29 και την καθελιδίνη (CAP)18 εκδηλώνουν αντιμικροβιακές ιδιότητες ενάντια στον *P. gingivalis* (Guthmiller και συν. 2001). Οι κυστεϊνικές πρωτεάσες, η κυστατίνη και τα πεπτιδία κυστατίνης επίσης εμφανίζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες (Blankenvoorde και συν. 1998).

Απαντήσεις σε σήματα του ξενιστή

Η ενεργοποίηση του συμπλέγματος TLR με επαγωγή αγωνιστών υποκινεί μία σειρά ενδοκυττάρων μονοπατιών σηματοδότησης με μεγάλη ποικιλομορφία που καθορίζει τόσο τις ποιοτικές όσο και τις ποσοτικές διαστάσεις της φλεγμονώδους απάντησης του ξενιστή. Αυτή η αρχική, TLR-εξαρτώμενη μεταγωγή σήματος βασίζεται στη συσχέτιση καθώς και στη στρατολόγηση ποικίλων προσαρμοστικών μορίων που περιέχουν τη δομικά διατηρημένη θέση του Toll/ιντερλευκίνης-1 (TIR) υποδοχέα. Προς το παρόν, η πιο αναλυτική περιγραφή προσαρμοστικών μορίων που περιέχουν τον TIR και μεταδίδουν ειδικότητα σε κάποια διαδρομή μεταγωγής του σήματος TLR περιλαμβάνουν το γονίδιο 88 πρωταρχικής απάντησης μυελοειδούς διαφοροποίησης (MYD88), την προσαρμοστική πρωτεΐνη που περιέχεται στη θέση-TIR (TIRAP), την ιντερφερόνη-β που επάγει την προσαρμογή και περιέχεται στη θέση-TIR (TRIF), το προσαρμοστικό μόριο που περιέχεται στη θέση-TIR (TRAM) και τους επιλεκτικούς ρυθμιστές του υποδοχέα ανδρογόνου (SARMs) (Medzhitov και συν. 1998, Kawai και συν. 1999, Fitzgerald και συν. 2001, Hoebe και συν. 2003, Yamamoto και συν. 2003, O'Neill & Bowie 2007). Διαδοχικά, αυτά τα προσαρμοστικά μόρια παρέχουν τη βάση για στρατολόγηση και ενεργοποίηση καταβολικών κινασών και μεταγραφικών παραγόντων, τα οποία μεταγενέστερα ελέγχουν τη φύση, το μέγεθος και τη διάρκεια των MyD88-εξαρτώμενων και MyD88-ανεξάρτητων αποκρίσεων (Medzhitov και συν. 1998, Kawai και συν. 1999, Fitzgerald και συν. 2001, Hoebe και συν. 2003, Yamamoto και συν. 2003). Η διάκριση των μοριακών διαφορών ανάμεσα στην MyD88-εξαρτώμενη και MyD88-ανεξάρτητη οδό έχει συγκεντρώσει πρόσφατα μεγάλο ενδιαφέρον. Η στρατολόγηση και ενεργοποίηση συγκεκριμένων οδών κίνησης φαίνεται να είναι ο κύριος μηχανισμός που ρυθμίζει τη φύση και το μέγεθος της φλεγμονώδους απάντησης σε μια ποικιλία TLR αγωνιστών. Από αυτή την άποψη, η πλειοψηφία

Synthetic AMPs hBD-1, -2, and -3 and LL-37 were tested against oral pathogens and cariogenic bacteria (Ouhara et al. 2005). *Fusobacterium nucleatum* was found to be highly susceptible to hBD-2 and -3, and *Streptococcus mutans* was highly susceptible to hBD-3. In another related study, aerobes were 100% susceptible to hBD-2 and -3, whereas only 21.4% and 50% of the anaerobes were susceptible to hBD-2 and -3, respectively (Joly et al. 2004). Antimicrobial activity of synthetic hBD-2 against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, and *S. mutans* was tested by antibacterial broth assay and diffusion assay (Mineshiba et al. 2003). The antimicrobial activity of hBD-2 was approximately equal to that of minocycline at equimolar concentrations. The hBD-3 has bactericidal activity on oral bacteria such as *S. mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus*, *A. actinomycetemcomitans*, and *P. gingivalis* (Maisetta et al. 2003). Members of the cathelicidin family, including the ovine SMAP29 and the cathelicidin (CAP)18 also exhibit antimicrobial activities against *P. gingivalis* (Guthmiller et al. 2001). Cysteine proteases, cystatin, and cystatin-derived peptides also displayed antimicrobial properties (Blankenvoorde et al. 1998).

Host signaling responses

Agonist-induced activation of the TLR complex initiates a range of intracellular signaling pathways of high diversity that determine both qualitative and quantitative aspects of the host inflammatory response. This initial TLR-mediated signal transduction is based on the association as well as the recruitment of various adapter molecules that contain the structurally conserved Toll/interleukin-1 (TIR) receptor domain. Currently, the best-described TIR-containing adaptor molecules that impart specificity to a given TLR signal transduction pathway include the myeloid differentiation primary response gene 88 (MYD88), TIR-domain-containing adapter protein (TIRAP), TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β (TRIF), TIR-domain-containing adapter molecule (TRAM), and selective androgen receptor modulators (SARMs) (Medzhitov et al. 1998, Kawai et al. 1999, Fitzgerald et al. 2001, Hoebe et al. 2003, Yamamoto et al. 2003, O'Neill & Bowie 2007). Consecutively, these adaptor molecules provide the basis to recruit and activate downstream kinases and transcription factors that subsequently control the nature, magnitude, and duration of MyD88-dependent and MyD88-independent responses (Medzhitov et al. 1998, Kawai et al. 1999, Fitzgerald et al. 2001, Hoebe et al. 2003, Yamamoto et al. 2003). The discrimination of the molecular differences between the MyD88-dependent and MyD88-independent pathways has recently gained much attention. The recruitment and activation of specific kinase pathways seems to be the main mechanism modulating the nature and magnitude of the inflammatory response to a variety of TLR agonists. In this regard,

των αναφορών που αναγνωρίζουν και περιγράφουν τις ρυθμιστικές διαδικασίες ελέγχου της φλεγμονώδους απάντησης κατά του *P. gingivalis* ή σχετικών τοξικών παραγόντων, υπογραμμίζουν τη σημαντικότητα των οδών τόσο των πρωτεϊνικών κινάσεων που ενεργοποιούνται με μίτωση (MARK), όσο και της κινάσης της φωσφατιδυλινοσιτόλης-3 (PI3K). Συνεπώς, αυτά τα μόρια και οι οδοί δράσης θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν θεραπευτικά στο μέλλον για την ανάπτυξη νέων ανασταλτικών φαρμάκων.

Συμπεράσματα

Οι κυτταρικοί και χυμικοί αμυντικοί μηχανισμοί της στοματικής κοιλότητας εμπλέκονται δυναμικά στη συνεχή απάντηση κατά των μικροβιακών προκλήσεων. Οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα δυναμικά περιοπαθογόνα και τα κύτταρα του επιθηλίου του στόματος, μέσω των TLRs, προκαλούν ποικίλες ανοσολογικές απαντήσεις που περιλαμβάνουν την έκκριση κυτοκινών και αντιμικροβιακών πρωτεϊνών, την απόπτωση και τη νέκρωση. Αυτές οι αποκρίσεις με στόχο το βιοϋμένα, πυροδοτούν πληθώρα τοπικών και συστηματικών αντιδράσεων που εμπλέκουν τη στρατολόγηση και ανάπτυξη φλεγμονωδών και ανοσιακών κυττάρων ώστε να εξουδετερωθεί η εστία της μόλυνσης και να ελαχιστοποιηθεί η κυτταρική και δομική απώλεια. Τα επιθηλιακά κύτταρα που είναι μέρος του έμφυτου ανοσιακού συστήματος, διαθέτουν τη φυσική ικανότητα να αγνοούν, να μάχονται ενάντια σε επιτιθέμενους μικροοργανισμούς και/ή να καλούν σε βοήθεια μέσω κυτοκινών και χημειοκινών, ανάλογα με τις ανάγκες.

Δηλώσεις/Ευχαριστίες

Οι συγγραφείς δηλώνουν ότι δεν υπάρχουν οικονομικές ή άλλες αντιθέσεις συμφερόντων σε σχέση με την παρούσα δημοσίευση.

the majority of reports that identify and describe the regulatory procedures governing the inflammatory response to *P. gingivalis* or associated virulence factors underline the significance of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) pathways. Consequently, these molecules and pathways could be utilized therapeutically in the future for the development of novel inhibitory drugs.

Conclusions

The cellular and soluble defenses of the oral cavity are engaged dynamically in a continuous response to microbial challenges. The interactions between putative periodontal pathogens with oral epithelial cells through TLRs elicit various responses including cytokine and antimicrobial protein secretion, apoptosis, and necrosis. These responses are directed toward the microbial biofilm and trigger a plethora of local and systemic reactions that involve the recruitment and development of inflammatory and immune cells in order to eliminate the source of infection and minimize cellular and structural loss. The epithelial cells, being part of the innate immune system, possess a natural ability to ignore offending microorganisms, fight against them, and/or call for help via the cytokines and chemokines as needed.

Acknowledgments

The authors declare that there are no financial or other conflicts of interest related to this publication.

Βιβλιογραφία - References

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I. & Dewhirst, F. E. (2005) Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 5721-5732.
- Abiko, Y., Nishimura, M. & Kaku, T. (2003) Defensins in saliva and the salivary glands. *Medical Electron Microscopy* **36**, 247-252.
- Aderem, A. (2003) Phagocytosis and the inflammatory response. *The Journal of Infectious Diseases* **187** (Suppl. 2), S340-S345.
- Adonogianaki, E., Moughal, N. A., Mooney, J., Stirrups, D. R. & Kinane, D. F. (1994) Acute-phase proteins in gingival crevicular fluid during experimentally induced gingivitis. *Journal of Periodontal Research* **29**, 196-202.
- Adonogianaki, E., Mooney, J. & Kinane, D.F. (1996) Detection of stable and active periodontitis sites by clinical assessment and gingival crevicular acute-phase protein levels. *Journal of Periodontal Research* **31**, 135-143.
- Agerberth, B., Gunne, H., Odeberg, J., Kogner, P., Boman, H. G. & Gudmundsson, G. H. (1995) FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 195-199.
- Akira, S. (2001) Toll-like receptors and innate immune system (in Japanese). *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **46**, 562-566.
- Altman, H., Steinberg, D., Porat, Y., Mor, A., Fridman, D., Friedman, M. & Bachrach, G. (2006) In vitro assessment of antimicrobial peptides as potential agents against several oral bacteria. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **58**, 198-201.
- Arbour, N. C., Lorenz, E., Schutte, B. C., Zabner, J., Kline, J. N., Jones, M., Frees, K., Watt, J. L. & Schwartz, D. A. (2000) TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nature Genetics* **25**, 187-191.
- Bals, R. (2000) Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respiratory Research* **1**, 141-150.
- Beutler, B. (2004) Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* **430**, 257-263.
- Blankenvoorde, M. F., van't Hof, W., Walgreen-Weterings, E., van Steenberghe, T. J., Brand, H. S., Veerman, E. C. & Nieuw Amerongen, A. V. (1998) Cystatin and cystatin-derived peptides have antibacterial activity against the pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Biological Chemistry* **379**, 1371-1375.
- Boman, H.G. (2003) Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine* **254**, 197-215.
- Brozovic, S., Sahoo, R., Barve, S., Shiba, H., Uriarte, S., Blumberg, R. S. & Kinane, D. F. (2006) *Porphyromonas gingivalis* enhances FasL expression via up-regulation of NFκB-mediated gene transcription and induces apoptotic cell death in human gingival epithelial cells. *Microbiology* **152**, 797-806.
- Chow, J. C., Young, D. W., Golenbock, D. T., Christ, W. J. & Gusovsky, F. (1999) Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 10689-10692.
- Cole, A.M., Liao, H. I., Stuchlik, O., Tilan, J., Pohl, J. & Ganz, T. (2002) Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid. *Journal of Immunology* **169**, 6985-6991.
- Cutler, C. W. & Jotwani, R. (2006) Dendritic cells at the oral mucosal interface. *Journal of Dental Research* **85**, 678-689.
- Dale, B. A. & Fredericks, L. P. (2005) Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Current Issues in Molecular Biology* **7**, 119-133.
- Darveau, R. P., Tanner, A., Page, R. C. (1997) The microbial challenge in periodontitis. *Periodontology* **2000** **14**, 12-32.
- Dixon, D. R., Bainbridge, B. W. & Darveau, R. P. (2004) Modulation of the innate immune response within the periodontium. *Periodontology* **2000** **35**, 53-74.
- Fitzgerald, K. A., Palsson-McDermott, E. M., Bowie, A. G., Jefferies, C. A., Mansell, A. S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M. T., McMurray, D., Smith, D. E., Sims, J. E., Bird, T. A. & O'Neill, L. A. (2001) Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* **413**, 78-83.
- Ganz, T. (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews. Immunology* **3**, 710-720.
- Ganz, T. (2005) Defensins and other antimicrobial peptides: a historical perspective and an update. *Combinational Chemistry and High Throughput Screening* **8**, 209-217.
- Ganz, T. & Lehrer, R. I. (1998) Antimicrobial peptides of vertebrates. *Current Opinion in Immunology* **10**, 41-44.
- Ghafouri, B., Tagesson, C. & Lindahl, M. (2003) Mapping of proteins in human saliva using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. *Proteomics* **3**, 1003-1015.
- Guo, T., Rudnick, P. A., Wang, W., Lee, C. S., Devoe, D. L. & Balgley, B. M. (2006) Characterization of the human salivary proteome by capillary isoelectric focusing/nanoreversed-phase liquid chromatography coupled with ESI-tandem MS. *Journal of Proteome Research* **5**, 1469-1478.
- Guthmiller, J. M., Vargas, K. G., Srikantha, R., Schomberg, L. L., Weistroffer, P. L., McCray, P. B., Jr. & Tack, B. F. (2001) Susceptibilities of oral bacteria and yeast to mammalian cathelicidins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 3216-3219.
- Hardt, M., Thomas, L. R., Dixon, S. E., Newport, G., Agabian, N., Prakobphol, A., Hall, S. C., Witkowska, H. E. & Fisher, S. J. (2005) Toward defining the human parotid gland salivary proteome and peptidome: identification and characterization using 2D SDS-PAGE, ultrafiltration, HPLC, and mass spectrometry. *Biochemistry* **44**, 2885-2899.
- Hayashi, C., Madrigal, A. G., Liu, X., Ukai, T., Goswami, S., Gudino, C. V., Gibson, F. C. 3rd, Genco, C. A. (2010) Pathogen-mediated inflammatory atherosclerosis is mediated in part via Toll-like receptor 2-induced inflammatory responses. *Journal of Innate Immunity* **2**, 334-343.
- Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabeta, K., Kim, S. O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Han, J. & Beutler, B. (2003) Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* **424**, 743-748.
- Hu, S., Xie, Y., Ramachandran, P., Ogorzalek Loo, R. R., Li, Y., Loo, J. A. & Wong, D. T. (2005) Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. *Proteomics* **5**, 1714-1728.
- Huang, C. M. (2004) Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Archives of Oral Biology* **49**, 951-962.
- Janeway, C. A., Jr. (1992) The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annual Review of Immunology* **10**, 645-674.
- Jenkins, W. M., Kinane, D. F. (1989) The 'high risk' group in periodontitis. *British Dental Journal* **167**, 168-171.

- Joly, S., Maze, C., McCray, P. B., Jr. & Guthmiller, J. M. (2004) Human beta-defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 1024-1029.
- Kavanagh, K. & Dowd, S. (2004) Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* **56**, 285-289.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. & Akira, S. (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**, 115-122.
- Kinane, D. F., Adonogianaki, E., Moughal, N., Winstanley, F. P., Mooney, J. & Thornhill, M. (1991) Immunocytochemical characterization of cellular infiltrate, related endothelial changes and determination of GCF acute-phase proteins during human experimental gingivitis. *Journal of Periodontal Research* **26**, 286-288.
- Kornman, K. S., Page, R. C. & Tonetti, M. S. (1997) The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology 2000* **14**, 33-53.
- Larsen, G. L. & Henson, P. M. (1983) Mediators of inflammation. *Annual Review of Immunology* **1**, 335-359.
- LeClair, E. E. (2003) Four reasons to consider a novel class of innate immune molecules in the oral epithelium. *Journal of Dental Research* **82**, 944-950.
- Lehrer, R. I., Lichtenstein, A. K. & Ganz, T. (1993) Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annual Reviews of Immunology* **11**, 105-128.
- Lehrer, R.I. (2004) Primate defensins. *Nature Reviews. Microbiology* **2**, 727-738.
- Lynn, D. J., Lloyd, A. T., Fares, M. A. & O'Farrelly, C. (2004) Evidence of positively selected sites in mammalian alpha-defensins. *Molecular Biology and Evolution* **21**, 819-827.
- Maisetta, G., Batoni, G., Esin, S., Luperini, F., Pardini, M., Bottai, D., Florio, W., Giuca, M. R., Gabriele, M. & Campa, M. (2003) Activity of human beta-defensin 3 alone or combined with other antimicrobial agents against oral bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**, 3349-3351.
- Matzinger, P. (2002) An innate sense of danger. *Annals of New York Academy of Science* **961**, 341-342.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S. & Janeway, C. A., Jr. (1998) MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Molecular Cell* **2**, 253-258.
- Medzhitov, R. & Janeway, C., Jr. (2000) Innate immunity. *The New England Journal of Medicine* **343**, 338-344.
- Mineshiba, F., Takashiba, S., Mineshiba, J., Matsuura, K., Kokeguchi, S. & Murayama, Y. (2003) Antibacterial activity of synthetic human B defensin-2 against periodontal bacteria. *Journal of the International Academy of Periodontology* **5**, 35-40.
- Mizukawa, N., Sugiyama, K., Ueno, T., Mishima, K., Takagi, S. & Sugahara, T. (1999) Levels of human defensin-1, an antimicrobial peptide, in saliva of patients with oral inflammation. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **87**, 539-543.
- O'Neill, L. A. & Bowie, A. G. (2007) The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews. Immunology* **7**, 353-364.
- O'Reilly, M., Silver, G. M., Davis, J. H., Gamelli, R. L. & Herbert, J. C. (1992) Interleukin 1 beta improves survival following cecal ligation and puncture. *The Journal of Surgical Research* **52**, 518-522.
- Ouhara, K., Komatsuzawa, H., Yamada, S., Shiba, H., Fujiwara, T., Ohara, M., Sayama, K., Hashimoto, K., Kurihara, H. & Sugai, M. (2005) Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, [beta]-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55**, 888-896.
- Page, R. C., Offenbacher, S., Schroeder, H. E., Seymour, G. J. & Kornman, K. S. (1997) Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology 2000* **14**, 216-248.
- Putsep, K., Carlsson, G., Boman, H. G. & Andersson, M. (2002) Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study. *Lancet* **360**, 1144-1149.
- Ryder, M. I. (2010) Comparison of neutrophil functions in aggressive and chronic periodontitis. *Periodontology 2000* **53**, 124-137.
- Shapira, L., Takashiba, S., Amar, S. & Van Dyke, T. E. (1994) Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide stimulation of human monocytes: dependence on serum and CD14 receptor. *Oral Microbiology and Immunology* **9**, 112-117.
- Sharma, J. N. & Mohsin, S. S. (1990) The role of chemical mediators in the pathogenesis of inflammation with emphasis on the kinin system. *Experimental Pathology* **38**, 73-96.
- Shimono, M., Ishikawa, T., Enokiya, Y., Muramatsu, T., Matsuzaka, K., Inoue, T., Abiko, Y., Yamaza, T., Kido, M. A., Tanaka, T. & Hashimoto, S. (2003) Biological characteristics of the junctional epithelium. *Journal of Electron Microscopy* **52**, 627-639.
- Slots, J. & Chen, C. (1999) The oral microbiota and human periodontal disease, *Medical importance of the normal microflora*. Editor: Tannock G. W., Kluwer Academic Publishers, London, UK, pp. 101-127.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1994) Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontology 2000* **5**, 7-25.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000* **38**, 135-187.
- Stashenko, P., Fujiyoshi, P., Obernesser, M.S., Probst, L., Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1991) Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **18**, 548-554.
- Suffredini, A. F. & O'Grady N. P. (1999) Pathophysiological responses to endotoxin in humans, *Endotoxin in health and disease*. Editors: Brade, H., Opal, S. M., Vogel, S. N. & Morrison, D. C., 1st edition, Marcel Dekker, New York, USA, pp. 817-830.
- Tabak, L. A. (2006) In defense of the oral cavity: the protective role of the salivary secretions. *Pediatric Dentistry* **28**, 110-117.
- Tao, R., Jurevic, R. J., Coulton, K. K., Tsutsui, M. T., Roberts, M. C., Kimball, J. R., Wells, N., Berndt, J. & Dale, B. A. (2005) Salivary antimicrobial peptide expression and dental caries experience in children. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 3883-3888.
- Trombelli L. (2004) Susceptibility to gingivitis: a way to predict periodontal disease? *Oral Health and Preventive Dentistry* **2** (Suppl 1), 265-269.
- Underhill, D. M., Ozinsky, A., Smith, K. D. & Aderem, A. (1999) Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 14459-14463.
- Vankeerberghen, A., Nuytten, H., Dierickx, K., Quirynen, M., Cassiman, J. J. & Cuppens, H. (2005) Differential induc-

- tion of human beta-defensin expression by periodontal commensals and pathogens in periodontal pocket epithelial cells. *Journal of Periodontology* **76**, 1293-1303.
- Vitorino, R., Lobo, M. J., Ferrer-Correira, A. J., Dubin, J. R., Tomer, K. B., Domingues, P. M. & Amado, F. M. (2004) Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics* **4**, 1109-1115.
- Walsh, L. J. (2003) Mast cells and oral inflammation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **14**, 188-198.
- Walz, A., Stuhler, K., Wattenberg, A., Hawranke, E., Meyer, H. E., Schmalz, G., Bluggel, M. & Ruhl, S. (2006) Proteome analysis of glandular parotid and submandibular-sublingual saliva in comparison to whole human saliva by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* **6**, 1631-1639.
- Wehkamp, J., Fellermann, K., Herrlinger, K. R., Bevins, C. L. & Stange, E. F. (2005a) Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nature Clinical Practice. Gastroenterology and Hepatology* **2**, 406-415.
- Wehkamp, J., Fellermann, K. & Stange, E. F. (2005b) Human defensins in Crohn's disease. *Chemical Immunology and Allergy* **86**, 42-54.
- Wilmarth, P. A., Riviere, M. A., Rustvold, D. L., Lauten, J. D., Madden, T. E. & David, L. L. (2004) Two-dimensional liquid chromatography study of the human whole saliva proteome. *Journal of Proteome Research* **3**, 1017-1023.
- Xie, H., Rhodus, N. L., Griffin, R. J., Carlis, J. V. & Griffin, T. J. (2005) A catalogue of human saliva proteins identified by free flow electrophoresis-based peptide separation and tandem mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics* **4**, 1826-1830.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. & Akira, S. (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640-643.
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., Anderson, M., Schroder, J. M., Wang, J. M., Howard, O. M. & Oppenheim, J. J. (1999) Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* **286**, 525-528.
- Yao, Y., Berg, E. A., Costello, C. E., Troxler, R. F. & Oppenheim, F. G. (2003) Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 5300-5308.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides in health and disease. *The New England Journal of Medicine* **347**, 1199-1200.

Επικοινωνία: Καθηγητής Denis F. Kinane, Dean Morton Amsterdam, Τμήμα Παθολογίας και Περιοδοντολογίας, Οδοντιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Pennsylvania, Spruce & 40th Street, Φιλαδέλφεια, PA 19104, ΗΠΑ, Τηλ: 215 898 8941, e-mail: dfkina01@upenn.edu

Correspondence: Professor Denis F. Kinane, Morton Amsterdam Dean, Department of Pathology and Periodontics, School of Dental Medicine, University of Pennsylvania, Spruce & 40th Street, Philadelphia, PA 19104, USA, Tel: 215 898 8941, e-mail: dfkina01@upenn.edu