

**Aus dem Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. Markus Böck

**Einfluss mikrobieller Substanzen von Parodontitis-assoziierten Bakterien
auf die Funktion humaner Thrombozyten**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

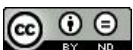
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sophie Karolina Wiebecke

aus Würzburg

Würzburg, Februar 2023



Referent bzw. Referentin:

Prof. Dr. Markus Böck

Korreferent bzw. Korreferentin:

Prof. Dr. Dr. Christian Linz

Dekan:

Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2023

Die Promovendin ist Zahnärztin

Diese Arbeit ist meinem Großvater
Professor Dr. med. Dieter Wiebecke
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Morphologie und Funktion von Thrombozyten | 1 |
| 1.2 | Signalwege in Thrombozyten | 4 |
| 1.2.1 | Aktivierende Signalwege | 4 |
| 1.2.2 | Inhibitorische Signalwege | 6 |
| 1.3 | Parodontitis | 8 |
| 1.3.1 | Pathogenese und Prävalenz | 8 |
| 1.3.2 | Diagnosestellung und Therapie | 12 |
| 1.3.3 | Wirkung von oralen Bakterien auf Blutzellen | 13 |
| 1.4 | Fragestellung | 16 |
| 2 | Material und Methoden | 17 |
| 2.1 | Übersicht Chemikalien | 17 |
| 2.2 | Übersicht Lösungen und Puffer | 18 |
| 2.3 | Thrombozytenaktivatoren | 18 |
| 2.4 | Bakterienbestandteile | 19 |
| 2.5 | Antikörper | 19 |
| 2.6 | Verbrauchsmaterialien | 20 |
| 2.7 | Geräte | 21 |
| 2.8 | Software | 22 |
| 2.9 | Vorbereitung der Proben | 22 |
| 2.10 | Ethik- und Tierversuchsvotum | 23 |
| 2.11 | Gewinnung von Blutproben | 23 |
| 2.12 | Aggregationstestung | 23 |
| 2.13 | Fluorescence-activated-cell sorting (FACS) | 25 |
| 2.14 | Chemokin-Messung mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) | 29 |
| 2.15 | Statistische Auswertung | 31 |
| 3 | Ergebnisse | 32 |
| 3.1 | Analytische Vorgehensweise | 32 |
| 3.2 | Keine Aggregationsinduktion durch die alleinige Toxinexposition | 32 |
| 3.3 | Die Wirkung von LTX auf die Thrombozytenfunktion | 33 |
| 3.3.1 | LTX und Thrombozytenaggregation | 33 |
| 3.3.2 | LTX und VASP-Phosphorylierung | 34 |
| 3.3.3 | LTX und Chemokin-Sekretion | 35 |
| 3.4 | Die Wirkung von C14 auf die Thrombozytenfunktion | 36 |
| 3.4.1 | C14 und Thrombozytenaggregation | 36 |
| 3.4.2 | C14 und VASP-Phosphorylierung | 37 |
| 3.4.3 | C14 und Chemokin-Sekretion | 38 |
| 3.5 | Die Wirkung von LPS auf die Thrombozytenfunktion | 39 |
| 3.5.1 | LPS und Thrombozytenaggregation | 39 |
| 3.5.2 | LPS und CD62P Expression | 40 |
| 3.5.3 | LPS und Chemokin-Sekretion | 41 |

| | | |
|----------|-----------------------------|-----------|
| 4 | Diskussion | 43 |
| 4.1 | Limitationen | 48 |
| 4.2 | Ausblick | 49 |
| 5 | Zusammenfassung | 50 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 51 |

Appendix

I. Abkürzungsverzeichnis

II. Abbildungsverzeichnis

III. Tabellenverzeichnis

IV. Danksagung

V. Lebenslauf

In meiner Arbeit verzichte ich nach Möglichkeit auf die Verwendung des generischen Maskulinums. Stattdessen verwende ich bevorzugt neutrale Formulierungen oder Doppelnennungen. Sollte dies an einzelnen Stellen nicht möglich gewesen sein, weise ich darauf hin, dass die entsprechenden Formulierungen ausdrücklich alle Geschlechter umfassen.

1 Einleitung

1.1 Morphologie und Funktion von Thrombozyten

Thrombozyten sind flache Zellen ohne Kern mit einem Durchmesser von etwa 2 μm . Sie entstehen durch Abschnürung aus Megakaryozyten im Knochenmark. Ihr Hauptanteil (150.000-400.000/ μl) zirkuliert durchschnittlich 5-7 Tage in den Blutgefäßen, wobei sie hier im Verlauf an Größe verlieren [1]. Am Ende ihrer Lebenszeit werden die Thrombozyten von Makrophagen in Leber und Milz phagozytiert [2]. Mikromorphologisch enthalten Thrombozyten neben dem Zytoplasma dichte Körperchen (sog. dense bodies), α -Granula und Lysosomen. α -Granula sind der Speicherort für Gerinnungsfaktoren und zahlreiche Proteine, wie zum Beispiel Plättchenfaktor 4 (PF4), platelet-derived growth factor (PDGF) oder P-Selektin [2]. In den dichten Körperchen sind z.B. Adenosindiphosphate (ADP) und Adenosintriphosphat (ATP) gespeichert und stehen über ein kanalikuläres System in Verbindung mit der Thrombozytenoberfläche. Die Lysosomen enthalten Enzyme und sind für den Abbau von Polysacchariden entscheidend [2].

Die Thrombozytenmembran besteht aus einer Doppel-Phospholipidschicht, in die unterschiedliche Rezeptoren eingebaut sind. Hierzu gehören u.a. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), Fc-Rezeptoren (FcR) oder Toll-like-Rezeptoren (TLRs) [3]. Durch Bindung von Agonisten und Liganden an die Rezeptoren werden Thrombozyten in ihrer Funktion reguliert [4].

Thrombozyten besitzen die Fähigkeit zur Adhäsion an Blutgefäßwänden sowie zur Aggregation [2]. Zu Beginn der primären Hämostase binden sie an Matrixproteine des verletzten Gefäßendothels [5].

Der von Willebrand-Faktor (vWF) bindet an freie Kollagenenden und an den GPIb/V/IX Rezeptorkomplex in der Thrombozytenmembran. Somit ist der vWF eine Art Verbindungsanker für die Thrombozyten insbesondere bei schneller Strömungsgeschwindigkeit und Scherstress [5].

Ein Mangel oder molekulare Veränderungen des vWF führen zur Blutungsneigung und zu einer verlängerten Blutungszeit, im Sinne eines von Willebrand-Syndroms [6].

Thrombozyten binden außerdem selbstständig über den GPIIb/IIIa-Rezeptor an freie Kollagenenden des verletzten Endothels [7]. Nach der initialen Adhäsion werden durch Freisetzung von Agonisten weitere Blutplättchen im Bereich der Gefäßläsion gebunden und es erfolgt die Aktivierung der Thrombozyten [5].

ADP gilt hier als ein Schlüsselmolekül [8, 9]:

Die Bindung an den P2Y₁-Rezeptor in der Thrombozytenmembran führt zu einer Veränderung des Zytoskeletts (shape change). Es bilden sich armförmige Ausstülpungen – sogenannte Pseudopodien – die Kontakte untereinander ermöglichen [10]. Außerdem kommt es zu einer intrazellulären Freisetzung von Calcium (Ca²⁺) im Zytoplasma [11], wodurch die Exozytose der stimulierenden Agonisten, Adhäsionsmoleküle und Gerinnungsfaktoren aus dem Granulomer nach extrazellulär verstärkt wird. Dieses erhöhte Substratangebot am P2Y₁-Rezeptor führt wiederum zu einer erhöhten Stimulation [12].

Eine ADP-Bindung an den P2Y₁₂-Rezeptor führt zu einer Inhibition der Adenylatcyclase, verbunden mit einer Reduktion des cyclischen Adenosinmonophosphats-Spiegels [13] und der Proteinkinase A (PKA) - Aktivität, welche eine verringerte Hemmung der Thrombozytenreaktivität bewirkt [5]. Eine Stimulation der Cyclooxygenase [14] führt zur Thromboxan A₂ (TXA₂)-Freisetzung, wodurch die Degranulation weiter verstärkt wird [15].

Durch diese verschiedenen Schritte der Thrombozytenaktivierung wird schließlich eine Aggregation ausgelöst. Schlüsselrezeptor ist der GPIIb/IIIa-Rezeptor in der Membran, über den extrazelluläres Fibrinogen und zusätzlich der vWF an die Thrombozyten binden können. Es wird dabei ein Netz aus Fibrinogenbrücken zwischen den Blutplättchen gebildet [5].

Die Funktionen der Thrombozyten beschränkt sich aber bei Weitem nicht nur auf die Hämostase: so können sie immunologische Prozesse initiieren und modulieren sowie Entzündungsvorgänge abschwächen [16].

Über TLRs können Bakterienbestandteile gebunden und anschließend durch neutrophile Granulozyten phagozytiert werden [17- 19].

Außerdem sind unterschiedliche Reaktionen der Thrombozyten nach Kontakt mit Bakterien bekannt. So können Thrombozyten *Staphylococcus aureus* intrazellulär aufnehmen [20] oder *Escherichia coli*-Bakterien direkt über den FcγRIIA-Rezeptor binden [21].

PDGF ist ein Wachstumsfaktor, der aus einem Dimere aus zwei Polypeptidketten verbunden mit zwei Disulfidbrücken besteht, wobei drei verschiedene Kombinationen (AA, AB und BB) bekannt sind [22, 23]. Eine Freisetzung von PDGF aus den α-Granula der Thrombozyten wird durch eine erhöhte Konzentration von Agonisten wie ATP oder Thrombin, die unter anderem bei einer Gefäßwandverletzung verstärkt freigesetzt wurden, verursacht [24].

PDGF bindet an spezifische Rezeptoren, die als Tyrosinkinasen die Stimulation der Phospholipase C (PLC) sowie der Phosphatidylinositolkaskade (PI3K) bewirken. Außerdem besteht eine mitogene Wirkung auf Zellen wie zum Beispiel Fibroblasten, Monozyten oder glatte Muskelzellen [24- 26]. Gleichzeitig wird die Freisetzung von Superoxidanione aus Eosinophile stimuliert [27] und die Thrombozytenaggregation durch eine negative Feedbackreaktion gehemmt [28].

Sezernierte Chemokine haben eine entscheidende Rolle, um mit neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen zu interagieren. Als Beispiel ist der CD40-Ligand (CD40L) zu nennen, über den Thrombozyten sich mit neutrophilen Granulozyten verbinden können [29]. Außerdem ist eine Aktivierung sowohl von Makrophagen als auch von T- und B- Zellen über CD40L möglich [30, 31].

Auf der anderen Seite ist bekannt, dass bei akuten Entzündungsreaktionen Chemokine und Liganden mit einer proinflammatorischen Wirkung wie zum Beispiel Histamine, Serotonin, CD40 und platelet activating factor (PAF) aus den Thrombozyten ausgeschüttet werden [32].

PF4 ist ein Chemokin bestehend aus 4 Untereinheiten, die jeweils von einer Sequenz aus 70 Aminosäuren gebildet werden [33], und es besitzt vier voneinander getrennte Cysteine. Somit gehört es der Familie der CXC-Chemokine an [34]. Durch die hohe Affinität zu Heparin, wodurch die Antithrombinwirkung herabgesetzt wird, hat PF4 eine aggregationsfördernde Wirkung [35, 36]. Zudem beeinflusst PF4 Monozyten, indem es eine Zunahme der Zellgröße sowie eine Veränderung des Phänotyps bewirkt und die Monozyten vor Apoptose schützt [37].

RANTES (= Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted) ist ein Chemokin mit zwei aufeinander gelagerten Cysteinresten und ist demzufolge ein CC-Chemokin [38]. Nach der Freisetzung aus den Thrombozyten bindet es an das Endothelium und rekrutiert Monozyten [39, 40].

1.2 Signalwege in Thrombozyten

1.2.1 Aktivierende Signalwege

In der Thrombozytenmembran befindet sich eine Vielzahl an Rezeptoren, an denen Agonisten spezifisch binden können.

Abb. 1 zeigt eine Übersicht von Agonisten und ihren jeweiligen Rezeptoren. Einige dieser Rezeptoren sind der Familie der GPCR zuzuordnen.

Sie bestehen aus drei Untereinheiten: Die α -Einheit bestimmt die Funktion des Rezeptors und bindet Guanosindiphosphat (GDP). Man unterscheidet hier zwischen G α _s, G α _i, G α _q, G α ₁₂ [41].

Die β - und γ -Untereinheit werden aufgrund ihrer engen Beziehung als ein Komplex gesehen. Bei einer Aktivierung der Rezeptoren werden die Signale durch die G-Proteine weitergeleitet und GDP wird gegen Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht [41]. Bei diesem Austausch löst sich die α -Untereinheit von den beiden anderen Untereinheiten und es entstehen somit zwei unterschiedliche funktionelle Gruppierungen [41].

Die Signale werden dann an intrazelluläre Enzyme, wie die Proteinkinase C (PKC), die PLC und die PI3K weitergegeben [42]. Am Ende der Signaltransduktion kommt es zu einer verstärkten Sekretion von stimulierenden Substanzen oder zu einer Veränderung des Zytoskeletts [43].

Die PLC in Thrombozyten lässt sich in 2 Untergruppen einteilen: PLC β und PLC γ 2 [43]. Während PLC β durch ADP über P2Y₁/ P2Y₁₂ oder TXA₂ über den Thromboxan-A₂-Rezeptor (TP) aktiviert wird, wird PLC γ 2 durch eine Phosphorylierung des Tyrosinrestes aktiviert [43].

Mit Hilfe der PLC werden die Sekundärsignalmoleküle Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) gebildet. IP3 verstärkt rezeptorvermittelt die Freisetzung von Ca²⁺ ins Zytosol. Eine hohe intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration führt zu einer Veränderung des Zytoskeletts und zu einer Expression von stimulierenden Substanzen aus den Thrombozyten [43].

Ca²⁺ wird zudem für die Aktivierung der PKC benötigt, DAG erhöht hier die Affinität zur Kinase [45].

In Thrombozyten kommen unterschiedliche Isoformen der PKC vor. Durch ihren positiven Einfluss auf die Sekretion von Agonisten sowie der Synthese von TXA₂ bewirkt die PKC eine Stimulation der Thrombozyten. Auf der anderen Seite haben auch einige Isoformen inhibitorische Eigenschaften, auf die im späteren Verlauf noch eingegangen wird [43].

Durch die Phosphorylierung und damit Aktivierung der PI3K hat diese die Möglichkeit, das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP2) in Phosphatidylinositol-3,4,5- Triphosphat (PIP3) zu phosphorylieren [43].

1.2.2 Inhibitorische Signalwege

Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (PGI₂) sind wichtige Inhibitoren der Aggregation. NO bindet an die lösliche Guanylatzyklase, wodurch eine gesteigerte Synthese von zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) aus GTP resultiert. cGMP bewirkt wiederum eine Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) [43].

Über spezifische Rezeptoren (IP) bindet PGI₂ an die Thrombozytenmembran und aktiviert über GPCRs die Adenylatzyklase (AC). Diese katalysiert cAMP [13] aus Adenosinmonophosphat (AMP) [13], wodurch die PKA stimuliert wird [43].

PKA und PKG phosphorylieren verschiedene Proteine und Rezeptoren in den Thrombozyten und hemmen damit die Thrombozytenaktivität. Sie vermindern die Freisetzung von Ca²⁺ ins Zytosol, indem sie IP3-Rezeptoren phosphorylieren.

Außerdem wird durch die Phosphorylierung der Ras-Proteine die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration zusätzlich gesenkt [43].

Ein weiteres Substrat, welches durch die Proteinkinasen beeinflusst wird, ist das Vasodilator- stimulierte Phosphoprotein (VASP) [43]. VASP gehört zu der Gruppe der Ena/VASP-Proteine mit einer Molekülmasse von 50 kDa [46]. Obwohl VASP in vielen Zellen wie zum Beispiel T-Zellen und Makrophagen nachgewiesen wurden [47], ist in Thrombozyten die Konzentrationen mit 78 000 Kopien/Zelle besonders hoch [48]. VASP kann an Ser^{157} , Ser^{239} und Thr^{278} durch die PKA und PKG phosphoryliert werden [49].

In vitro präferiert PKA die Phosphorylierungsstelle Ser^{157} und PKG Ser^{239} . Thr^{278} wird zweitrangig nach Ser^{157} und Ser^{239} von beiden Kinasen phosphoryliert [49].

Außerdem wurde gezeigt, dass eine Phosphorylierung an Ser^{157} durch PLC unabhängig von PKA und PKG stattfinden kann [49].

Die inhibierende Funktion von VASP beruht auf mehreren Mechanismen. Durch die Phosphorylierung wird sowohl die Thrombozytenaggregation vermindert, als auch die Aktivität des Fibrinogenrezeptors Integrin $\alpha_{2b}\beta_3$ herabgesetzt [50]. Gleichzeitig wird der Auf- und Abbau von Aktinfilamenten negativ beeinflusst [51].

Untersuchungen an VASP-Knockout-Mäusen zeigten eine verstärkte Thrombozytenaggregation und gleichzeitige eine Schwächung der inhibitorischen Signalwege [52].

Neben NO und PGI_2 gibt es noch weitere Substanzen, die eine inhibitorische Wirkung auf die Thrombozyten haben. ATPasen wie das Oberflächenprotein CD39 spalten ADP/ATP in AMP und Adenosin [53]. Diese wiederum verstärken die Freisetzung von cAMP, welches auf oben beschriebenen Weg die Thrombozytenaggregation hemmt [14].

1.3 Parodontitis

1.3.1 Pathogenese und Prävalenz

Parodontitis ist eine chronische Erkrankung, die zur irreversiblen Destruktion des Zahnhalteapparates führt [54, 55]. Dieser Prozess ist verbunden mit einem Verlust des Knochenniveaus und der pathologischen Vertiefung von Zahnfleischtaschen [56].

Personen aller Altersgruppen können betroffen sein [54], allerdings wurde in vielen Studien bewiesen, dass ein höheres Lebensalter ein Risikofaktor ist [57]. Jedoch ist ein Krankheitsbeginn im jugendlichen oder frühen Erwachsenenalter möglich [58].

In der fünften deutschen Mundgesundheitsuntersuchung (erhoben von Oktober 2013 bis Juni 2014), bei der insgesamt 4600 Teilnehmende aus vier verschiedenen Altersgruppen untersucht wurden, zeigte sich, dass 43,4% der Erwachsenen zwischen 35-44 Jahren eine moderate Krankheitsform haben, 8,2% eine schwere. Personen zwischen 65 und 74 Jahren hatten zu 44,8% eine moderate Form, 19,8% eine schwere. Obwohl in beiden Altersgruppen über 50% unter einer parodontalen Erkrankung leiden, waren sowohl die Schwere als auch das Ausmaß bei beiden Gruppen im Vergleich zur Studie 2005 rückläufig. Eine Erklärung ist, dass prophylaktische Maßnahmen wie zahnärztliche Untersuchungen und professionelle Zahnreinigungen regelmäßiger in Anspruch genommen werden [59].

Seit Jahrzehnten wird versucht, die Pathogenese der Parodontitis zu verstehen, um eine möglichst erfolgreiche Therapie gestalten zu können. Diese Konzepte haben sich im Laufe der Zeit verändert [54]. Loe et al stellten 1965 fest, dass Plaque eine gingivale Entzündung hervorruft und diese durch dessen Entfernung eliminiert wird [60]. Mit der *unspezifischen Plaquehypothese* ging man davon aus, dass die Bakterienplaque ursächlich für die gingivale und parodontale Entzündung sei und deshalb als Therapie deren Entfernung angestrebt wurde [54]. Im Widerspruch zu dieser Theorie stand unter anderem die Studie von Brex et al 1988 [61], bei der einige der Probanden trotz monatelanger, ausbleibender häuslicher Mundhygiene keine gingivale Entzündung aufwiesen. In einer Studie bei Teearbeiter in Sri Lanka wurde ebenfalls festgestellt, dass trotz schlechter Mundhygiene und massiver Plaque-Akkumulation keine gingivale oder parodontale Erkrankung vorlag [62].

Aufgrund dieser Diskrepanzen entwickelte sich die *spezifische Plaquehypothese*. Hierbei geht man davon aus, dass nicht nur eine mangelhafte Mundhygiene, sondern

das Vorhandensein von besonders pathogenen Bakterien ein zusätzlicher Risikofaktor sei [63]. Socransky et al. ordnete die parodontalen Bakterien nach ihrer Pathogenität in Komplexen ein (**Abb. 2**), durch deren gemeinsame Interaktion die Bakterien im Sinne einer Symbiose interagieren [64].

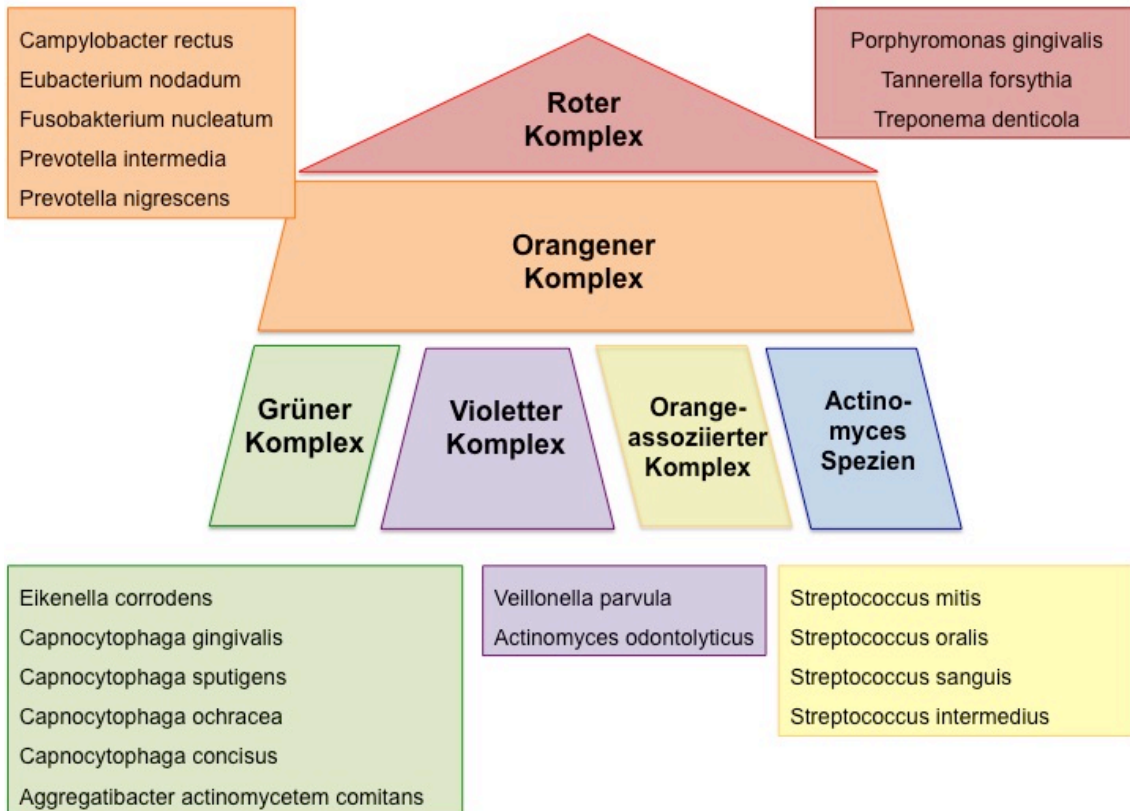


Abb. 2: Parodontale Bakterien eingeteilt in Komplexen.

Verschiedene Bakterienstämme sind an der Entstehung einer parodontalen Erkrankung beteiligt. Dabei spielt die Interaktion untereinander eine entscheidende Rolle. Durch diese Symbiose können Bakterien den Sulkus erfolgreicher besiedeln und haben gleichzeitig eine verbesserte Überlebenschance (eigene Darstellung modifiziert nach Socransky et al. [64] mit freundlicher Genehmigung des Verlags).

Bakterien des violetten und des orangen-assoziierten Komplexes haben trotz ihrer geringen Pathogenität eine wichtige Funktion, indem sie die Wurzeloberfläche als Erstes besiedeln und Grundlage für die Kolonisierung weiterer Bakterien sind.

Die Bakterien des orangenen Komplexes, die ein mittleres pathogenes Potential haben, haben eine enge Verbindung zu den Bakterien des roten Komplexes [64]. Ein wichtiger Vertreter dieses Komplexes, ist das *Fusobakterium nucleatum* (*F.nucleatum*), ein gram-negatives anaerobes Bakterium. In der dentalen Plaque fungiert es als Verbindung zwischen den „Frühbesiedlern“ und den Bakterien des roten

Komplexes [65]. Außerdem verbessern sie die Lebensgrundlage für diese strikt anaeroben Bakterien [66].

Tannerella forsythia (*T.forsythia*), *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) und *Treponema denticola* (*T.denticola*), die obligat anaerob sind, haben eine sehr hohe Pathogenität und bilden den roten Komplex. Durch die Freisetzung von Enzymen, die proteolytisch wirken, wird der Knochenabbau initiiert. Insbesondere *P.gingivalis* gilt aufgrund seiner Fähigkeit, Zytokine wie zum Beispiel Lipopolysaccharide (LPS) und Interleukine (IL) freizusetzen, als besonders pathogen [67, 68]. Zusätzlich kann es das Immunsystem des Wirtes unterwandern und die Entzündungsreaktion trotzdem aufrechterhalten, denn das Entzündungsexsudat bildet eine wichtige Nährstoffquelle [69]. Eine wichtige Überlebensstrategie ist zusätzlich die Resistenz gegen oxidativen Stress [70].

Bakterien des grünen Komplexes sind fakultativ anaerob, der Hauptvertreter ist *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.actinomycetemcomitans*). Er ist vor allem bei jungen Patientinnen und Patienten als Leitkeim der Parodontitis zu finden [71]. Seine hohe Pathogenität ist unter anderem auf die Freisetzung von Leukotoxinen (Ltx) zurückzuführen. Sie zerstören Makrophagen und Lymphozyten [72]. Gleichzeitig können sie Bakterien vor der Phagozytose schützen [73, 74]. Außerdem werden durch sie Caspasen aktiviert, die zu einer gesteigerten Produktion von Interleukin 1- β führen [75].

Aufgrund der Erkenntnisse der *spezifischen Plaquehypothesen* wurden Tests zur Bestimmung der bakteriellen Besiedelung entwickelt, um besonders pathogene Keime zu identifizieren und eine adjuvante antibiotische Therapie abstimmen zu können [76]. Jedoch zeigten sich bei dieser Hypothese wiederum Widersprüche: So wurden bei gesunden Patienten höchst pathogene Bakterien gefunden [77]. Man erklärte sich dies, dass die Parodontitis eine Erkrankung sei, die unter normaler immunologischer Regulation nicht auftritt. Verantwortlich für diese Dysregulation können neben exogenen Faktoren wie chronischer Stress [78] und Tabakrauchabusus [79] auch Grunderkrankungen wie ein Diabetes mellitus [13], rheumatoide Erkrankungen oder Adipositas sein [80, 81].

Die aktuelle ökologische Plaquehypothese besagt, dass ein gesunder Patient zwar auch pathogene Bakterien in der Plaque besitzt, diese jedoch durch das orale Immunsystem und die probiotische Bakterienflora unterdrückt werden [82]. Immunologische Störungen führen zu einem Überwachsen der gram-negativen,

pathologischen Bakterien [83, 84]. Eine gute Mundhygiene ist zwar im Sinne der Keimreduktion unterstützend, jedoch kann hierdurch eine Dysbiose subgingivaler Bakterien nicht verhindert werden [85].

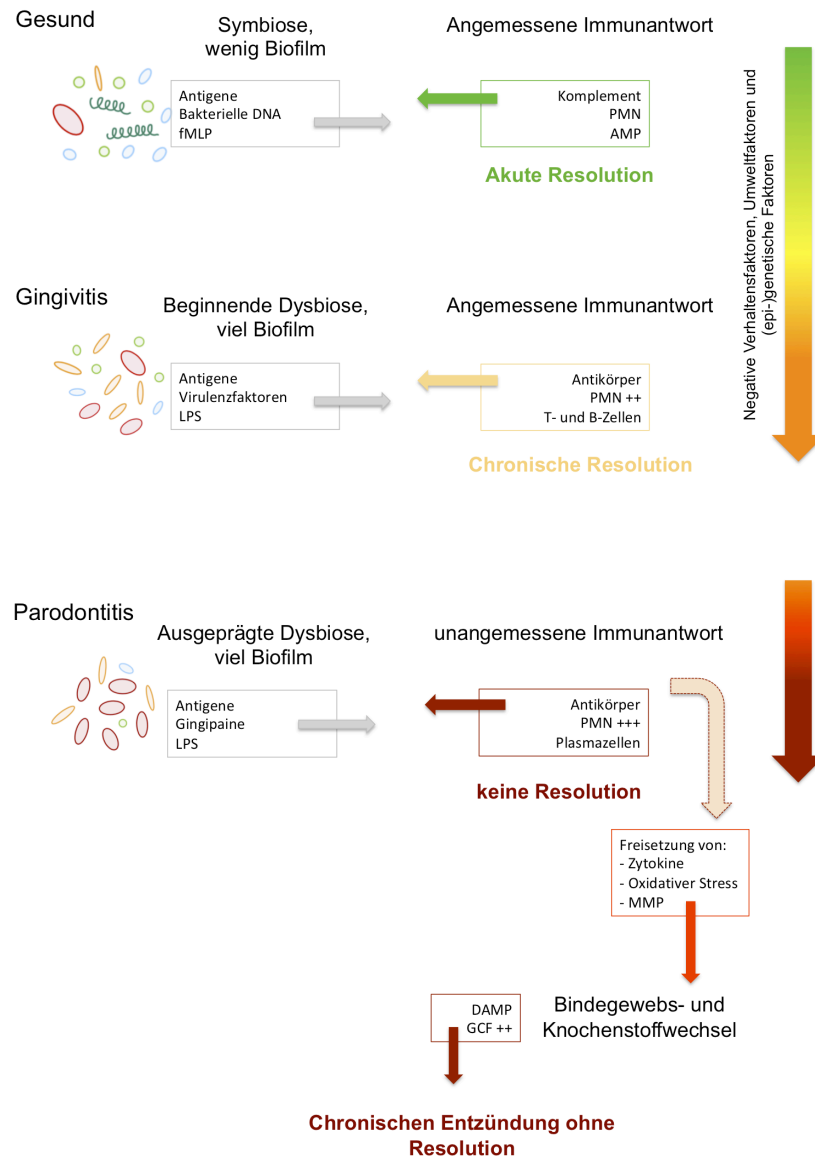


Abb. 3: Pathogenese der Parodontitis.

Dieses Modell, welches von Meyle and Chapple konfiguriert wurde, zeigt die Bedeutung von Mikroorganismen und der Immunantwort bei der Entstehung von gingivalen und parodontalen Erkrankungen [86]. (eigene Abbildung modifiziert nach Meyle und Chapple mit freundlicher Genehmigung des Verlags).

AMP: antimikrobielle Peptide, **DAMP:** Damage-associated Molecular Pattern, **DNA:** Desoxyribonukleinsäure, **fMLP:** f-Met-Leu-Phe, **GCF:** gingivale Sulkusflüssigkeit, **LPS:** Lipopolysaccharide, **MMP:** Matrix-Metalloproteinasen, **PMN:** polymorphkernige neutrophile Granulozyten.

Abb. 3 verdeutlicht, dass viel Plaque eine beginnende Dysbiose begünstigt, wodurch vermehrt inflammatorische Mediatoren freigesetzt werden. Durch eine angemessene Immunantwort manifestiert sich dies als rein gingivale Entzündung. Bei der Parodontitis wird durch die überschießende immunologische Reaktion die Freisetzung von weiteren Zytokinen und Entzündungsmediatoren verursacht, die zu einer Bindegewebs- und Knochenschädigung führen. Durch die gesteigerte gingivale Sulkusflüssigkeit (GCF) und die Freisetzung von Substanzen wie das Damage- associated Molecular Pattern (DAMP) wird die Inflammation weiter potenziert [86].

1.3.2 Diagnosestellung und Therapie

1992 entwickelten die *American Academy of Periodontology (AAP)* und die *American Dental Association* [87] den Parodontalen-Sondierungs-Index (PSI). Erhoben werden – aufgeteilt in Sextanten – die Taschentiefe, Blutung auf Sondierung (Bleeding on Probing = BOP) mittels einer speziell skalierten Sonde sowie das Vorhandensein von Zahnstein und defekten Füllungen. So ist eine schnelle Diagnostik und Differenzierung zwischen parodontal Gesunden und Erkrankten möglich. Durch die regelmäßige Durchführung ist eine ständige Verlaufskontrolle gegeben. Die Klassifikation erfolgt von PSI Code 0-4 mit jeweils unterschiedlichen therapeutischen Konsequenzen. PSI Code 0 gilt als gesund, es besteht – außer präventiven Maßnahmen – kein therapeutischer Handlungsbedarf. Bei einem PSI Code 1 und 2 liegt eine Gingivitis vor, die eine Entfernung supragingivalen Plaques und Zahnsteins durch eine professionelle Zahnreinigung erfordert. Patienten mit einem PSI Code 3 oder 4 haben eine manifestierte parodontale Erkrankung [88].

Es schließt sich die ausführliche parodontale Befunderhebung an. Neben der speziellen Parodontitis-Anamnese zur Abklärung möglicher Risikofaktoren ist die klinische Befunderhebung der entscheidende Pfeiler in der Diagnosestellung. Sie beinhaltet Taschensondierungstiefe (TT), Messung des Attachmentniveaus (Clinical Attachment Level (CAL)) und Rezessionen, Sondierung parodontaler Furkationsbeteiligung, Erhebung des BOPs sowie Lockerungsgrad der Zähne. Zusätzlich ist eine röntgenologische Kontrolle zur Beurteilung des Knochenniveaus und möglicher Furkationsbeteiligung und dentaler Fokussuche (z.B. Ausschluss einer apikaler Aufhellung) notwendig [56].

Mit der 2018 veröffentlichten Klassifikation wird das Krankheitsstadium mit dem sogenannten „*Staging*“ anhand des Schweregrads, der Komplexität und der Ausdehnung eingeteilt. Mit Hilfe des „*Grading*“ wird die Progressionsrate anhand von individuellen Risikofaktoren bewertet [89, 90].

Laut aktueller S3- Leitlinie (2020) ist ein 4-stufiges Therapiekonzept für alle Parodontitispatienten anzuwenden: Die erste Stufe bildet mit Aufklärung, Motivation des Patienten sowie Minimierung der Risikofaktoren die Grundlage für die Therapie. Es schließt sich die supra- und subgingivale Reinigung innerhalb von 24 Stunden an (Full-Mouth-Scaling). Diese kann gegebenenfalls durch eine adjuvante Antibiotikatherapie unterstützt werden. Mit der Befundreevaluation nach der Heilungsphase werden Therapieerfolge und -misserfolge festgestellt. Therapiebedürftige Zähne können gegebenenfalls noch einmal subgingival instrumental gereinigt oder chirurgisch behandelt werden. Es schließt sich die unterstützende Parodontaltherapie (UPT) an, deren Intervall individuell auf den Schweregrad und die Progressionsrate abgestimmt ist. Der regelmäßige Recall hat das Ziel, eine langfristige parodontale Stabilität zu erreichen [91].

1.3.3 Wirkung von oralen Bakterien auf Blutzellen

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die Parodontitis ein Risikofaktor für eine kardiovaskuläre Erkrankung darstellt. So haben Personen mit einer parodontalen Erkrankung ein erhöhtes Risiko eines Myokardinfarkts oder eines zerebralen Verschlusses [92]. Ursächlich ist der Einfluss parodontaler Bakterien auf die Blutzellen: Es wurde nachgewiesen, dass bei Parodontitispatienten unter anderem die Leukozytenzahl signifikant erhöht ist (laut einer Studie $7,1 \times 10^3$ Leukozyten/ μl verglichen mit $5,6 \times 10^3$ Leukozyten/ μl bei Gesunden) [93]. Dadurch werden auf der einen Seite vermehrt Entzündungsmediatoren aus den weißen Blutkörperchen freigesetzt [94]. Gleichzeitig wird auch die Viskosität des Blutes erhöht, wodurch das Risiko für ein thrombotisches Ereignis erhöht wird [95].

Die Rolle von Thrombozyten bei der Pathogenese der Parodontitis wurde bisher nur in wenigen Studien untersucht. Mario Romandini et al beschrieben 2018 eine gesteigerte Thrombozytenzahl bei Parodontitispatienten, die mutmaßlich auf eine erhöhte systemische Inflammation zurückzuführen ist [96]. Andere Studien jedoch wiesen dagegen nicht-signifikant erhöhte Thrombozytenwerte nach [95, 97].

Außerdem wurde das Mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) in mehreren Studien untersucht. Es wurde dabei gezeigt, dass bei Parodontitispatienten das MPV erhöht ist [95, 98].

Des Weiteren wurde festgestellt, dass der Thrombozytenhämatokrit (PCT) bei Personen mit einer parodontalen Erkrankung erhöht ist [95].

Die funktionelle Einordnung dieser Phänomene bleibt bislang allerdings unklar.

Die Erkennung und Eliminierung von Bakterien steht im Mittelpunkt der Immunabwehr. Über Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR) werden Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) erkannt und eine immunologische Reaktion eingeleitet. Zu dieser Rezeptorengruppe zählen auch die NOD-like-Rezeptoren (NLRs), welche zytosolische Proteine sind [98]. Es ist bekannt, dass NOD1 und NOD2 im Taschenepithel in der Mundhöhle vorkommen und mit Peptidoglycanen (PGNs) von oralen Bakterien interagieren [99]. Hier sind bestimmte Sequenzen der PGN entscheidend: Gramnegative Bakterien werden von NOD1 anhand der γ -D-Glutamyl-Meso-Diaminopimelinsäure (iE-DAP) erkannt [100] und von NOD2 durch das Muramyl-dipetid (MDP) [101].

Über die anschließende Aktivierung der Kaskade der NF- κ B (= nuclear factor- κ -light-chain-enhancer of activated B cells) kommt es zu einer immunologischen Reaktion mit Ausschüttung von proinflammatorischen Entzündungsmediatoren [102].

Okugawa et al. zeigten, dass verschiedene Bakterienstämme unterschiedliche Wirkung auf die NOD-Proteine haben: So wird NOD1 insbesondere durch PGNs von *A.actinomycetemcomitans* und *F.nucleatum* stimuliert, während es mit *P.gingivalis* schwächer reagiert. Ebenso ist bei NOD2 die Affinität mit *A.actinomycetemcomitans* am größten. Diese Unterschiede lassen sich mit dem strukturellen Aufbau der Sequenzen der PGNs erklären [103].

Das in den Experimenten verwendete C14-Tri-LAN-Gly (C14) ist ein synthetisch hergestellter NOD1-Ligand von *F.nucleatum*. Es besteht aus einer lipophilen Kette mit drei Peptiden und anstelle der Meso-DAP ist ein Meso-Lanthionin, welches spezifisch für PGN von gramnegativen Bakterien ist [104].

Eine weitere Gruppe der PRRs sind die TLRs. Diese sind im Vergleich zu den NOD-Proteinen Transmembranproteine. Mithilfe der Leucin-reichen Sequenz werden PAMPs erkannt. Man unterscheidet 10 humane TLRs, wobei 6 extrazellulär und 4 intrazellulär gelegen sind [105]. Nach der Bindung der Liganden und der damit

verbundenen Aktivierung der Rezeptoren, wird über die NF- κ B-Kaskade die Expression von proinflammatorischen Zytokinen stimuliert [105].

Es ist außerdem nachgewiesen, dass TLR2 und TLR4 in oralen Epithelzellen vorkommen [99].

LPS werden von gramnegativen Bakterien freigesetzt und besitzen eine sehr große Pathogenität. Sie besitzen ein acyliertes und phosphoryliertes Lipid A, welches mit dem Kern-Oligosaccharid verbunden ist. Die dritte strukturelle Gruppe ist das o-spezifische Polysaccharid [106, 107].

Per Exozytose wird LPS aus *P.gingivalis* ins parodontale Gewebe freigesetzt [108, 109] und verursacht dort eine starke Entzündungsreaktion [110]. Ausschlaggebend ist hier eine Aktivierung von Monozyten [111], aber auch von TLR2 und TLR4 [110].

Das Leukotoxin ItxA von *A.actinomycetemcomitans* (LTX) hat aufgrund seiner hohen Pathogenität eine zentrale Funktion bei inflammatorischen und immunsuppressiven Prozessen. Das ItxA-Gen kodiert das Toxin bestehend aus 10 055 Aminosäuren, welche wiederum 4 funktionelle Hauptgruppen bilden [112]. Die Proteine ItxB, ItxD bilden ein Transportsystem, durch das das Toxin nach extrazellulär gelangen kann [113]. Aufgrund der dort hohen Ca^{2+} -Konzentration ändert es seine Form und wird dadurch aktiviert [112].

Die Hauptfunktion von Itx besteht in dem Schutz des Bakteriums. Nach dem Kontakt mit dem Bakterium, strömen – als erste immunologische Reaktion – Granulozyten und andere Leukozyten in das Sulkusepithel [114]. Anhand eines spezifischen Integrins, des Lymphozytenfunktions-assoziierten Antigens 1 (LAF-1), erkennt Itx die Abwehrzellen und inaktiviert diese [115]. So umgeht das Bakterium die immunologische Reaktion und kann weiter kolonisieren [114].

1.4 Fragestellung

Untersuchungen zur Wechselwirkung von Bakterien mit Blutzellen bei der Pathogenese der Parodontitis fokussierten sich bisher auf Leukozyten, insbesondere auf neutrophile Granulozyten.

Die Rolle von Thrombozyten im Rahmen der Parodontitis ist dagegen noch nicht umfassend aufgeklärt.

In dieser Arbeit wird daher der Einfluss bakterieller Bestandteile auf die Thrombozytenfunktion näher analysiert. Für die Experimente werden definierte Pathogene von drei Bakterien die an der Entwicklung einer Parodontitis beteiligt sind, herangezogen: LPS von *P.gingivalis*, C14 von *F.nucleatum* und LTX von *A.actinomycetemcomitans*.

Ziel ist es, zu bestimmen, ob diese bakteriellen Bestandteile eine hemmende bzw. aktivierende Wirkung auf Thrombozyten entfalten, wodurch *in vivo* hämorrhagische bzw. thrombotische Effekte im Bereich parodontaler Veränderungen getriggert werden könnten.

Eine genauere Kenntnis über die Wirkung auf Thrombozyten könnten dabei auch Ansatzpunkte für die Therapie liefern, im Sinne von blutungsstillenden oder antithrombotischen Maßnahmen.

2 Material und Methoden

2.1 Übersicht Chemikalien

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|---|
| Bovine serum albumin (BSA) qua ad iniectabilia | Sigma-Aldrich by Merck KgaA (Darmstadt, Germany) A2153 |
| Calcium chloride dihydrate (CaCl ₂) | Merck KgaA (Darmstadt, Germany) 102382 |
| Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodium salt, 0,5 M | Sigma-Aldrich by Merck KgaA (Darmstadt, Germany) E7889 |
| Formaldehyde solution (FA) | Sigma-Aldrich by Merck KgaA (Darmstadt, Germany) F8775 |
| D-(+)-Glucose (glucose) | Sigma-Aldrich by Merck KgaA (Darmstadt, Germany) G7021 |
| Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraacetic acid (EGTA) | Sigma-Aldrich by Merck KgaA (Darmstadt, Germany) E3889 |
| Hydrochloric acid (HCl) | VWR International GmbH (Darmstadt, Germany) 20252.420 |
| Magnesium chloride Hexahydrate (MgCl ₂) | Merck KgaA (Darmstadt, Germany) 105833 |
| Phosphate-buffered saline (PBS), Ca ²⁺ - and Mg ²⁺ -free | Sigma-Aldrich by Merck KgaA (Darmstadt, Germany) D8537 |
| Potassium Chloride (KCl) | Merck KgaA (Darmstadt, Germany) 104936 |
| Prostaglandin E1 (PGE1) | Sigma-Aldrich by Merck KgaA (Darmstadt, Germany) P5515 |
| Sheath fluid for flow cytometry FACSTFlow | Becton Dickinson, (Franklin Lakes, NJ, USA) 342003 |
| Sodium Chloride (NaCl) | Sigma-Aldrich by Merck KgaA (Darmstadt, Germany) 31434-M |
| Sodium hydroxide solution (NaOH), 5 M | Merck KgaA (Darmstadt, Germany) 1.09913 |
| Sterile water (Ampuwa) | Fresenius Kabi Deutschland GmbH, (Bad Homburg, Germany) 2599.99.99; 1080181 |

| | |
|--|--|
| Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) | Merck KgaA (Darmstadt, Germany) 108382 |
| Tri-Sodium citrate dihydrate (citrate) | Merck KgaA (Darmstadt, Germany) 106448 |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich by Merck KgaA (Darmstadt, Germany) |
| Tyrode's Salt Solution (Tyrode's buffer) | Sigma-Aldrich by Merck KgaA (Darmstadt, Germany) T2397 |

2.2 Übersicht Lösungen und Puffer

| | |
|-------------------|---|
| CGS buffer pH 6.5 | pH 6,5 120 mM NaCl, 12,9 mM citrate, 30 mM glucose |
| FACS buffer | FACS buffer 5,5 mM glucose, 0,5 % (w/v) BSA in PBS |

2.3 Thrombozytenaktivatoren

| Thrombozytenaktivatoren | Hersteller |
|--|--|
| Adenosine diphosphate (ADP) | Haemochrom Diagnostica GmbH (Essen, Germany) HB-5502-FG |
| Collagen | Collagen Reagent Horm (Takeda, Osaka, Japan) 1130630 |
| Thrombin from human plasma, lyophilized powder | Sigma-Aldrich by Merck KgaA (Darmstadt, Germany) T7009-100UN |

2.4 Bakterienbestandteile

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|---|
| C14-Tri-LAN-Gly NOD1 ligand (C14) | Invivo Gen (Toulouse, France) tlr-ctlg |
| LPS- PG Ultrapure from Porphyromonas gingivalis, TRL2 & TLR4 Ligand | Invivo Gen (Toulouse, France) tlr-pglps |
| Leukotoxin LtxA (LTX), partial | Cusabio Technology (Houston, USA) CSB-YP322853AYK |

2.5 Antikörper

| Bezeichnung | Typ | Hersteller |
|--|--------------|---|
| Mouse monoclonal FITC anti-phospho-VASP (Ser ²³⁹) | Monoclonal | nanoTools Antikörpertechnik GmbH & Co. KG (Teningen, Germany) 0047-100FITC-VASP-16C2 |
| Blocking peptide for phospho-VASP (p-Ser ²³⁹) | | nanoTools Antikörpertechnik GmbH & Co. KG (Teningen, Germany) 2002-100/VASP-pSer ²³⁹ |
| Goat Anti-Mouse FITC | Polynoclonal | Sigma-Aldrich by Merck KgaA (Darmstadt, Germany) F2012 |
| Mouse monoclonal FITC anti-P-selectin | Monoclonal | OriGene Technologies, Inc. (Rockville, MD, USA) SM1150F |
| Mouse FITC IgG1 isotype (for P-selectin) | Monoclonal | OrOriGene Technologies, Inc. (Rockville, MD, USA) SM10F |

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|--|
| Quantikine® ELISA _Human CXCL4/PF4 Immunoassay | R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA) DPF40 |
| Quantikine® ELISA _ Human PDGF-AB Immunoassay | R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA) DHD00C |
| Quantikine® ELISA _ Human CD40 Ligand/TNFSF5 Immunoassay | R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA) DCDL40 |
| Quantikine® ELISA _ Human CCL5/RANTES Immunoassay | R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA) DRN00B |

2.6 Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|---|
| Blood collection tube | S-Monovette 10 mL 9NC (SARSTEDT AG & Co. KG, Nuembrecht, Germany) 02.1067.001 |
| Cuvettes, plastic, for aggregometry | Haemochrom Diagnostica GmbH (Essen, Germany) 40.000.0098 |
| Combitips advanced 5 ml | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) 00300 898 12 |
| Eppendorf Cups Safe-Lock- Tubes 1,5 ml und 2 ml | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) 00301 200 86 und 00301 200 94 |
| Pipette mit Spitze (5 ml, 10 ml) | Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland) 66180 und 607180 |
| Pipettenspitzen Biosphere Filer Tipps | Sarstedt AG & Co.KG (Nümbrecht, Deutschland) 70.3060.255 |
| Reagenzröhrchen für FACS 5,0 ml | Sarstedt AG & Co.KG (Nümbrecht, Deutschland) 55.1579 |
| Safety- Multifly®- Kanüle | Sarstedt AG & Co.KG (Nümbrecht, |

| | |
|---|--|
| | Deutschland) 85.1638.235 |
| Blood collection tube | S-Monovette 10 mL 9NC (SARSTEDT AG & Co. KG, Nuembrecht, Germany) 02.1067.001 |
| Cuvettes, plastic, for aggregometry | Haemochrom Diagnostica GmbH (Essen, Germany) 40.000.0098 |
| Combitips advanced 5 ml | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) 00300 898 12 |
| Eppendorf Cups Safe-Lock- Tubes 1,5 ml und 2 ml | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) 00301 200 86 und 00301 200 94 |
| Pipette mit Spitze (5 ml, 10 ml) | Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland) 66180 und 607180 |
| Pipettenspitzen Biosphere Filer Tipps | Sarstedt AG & Co.KG (Nümbrecht, Deutschland) 70.3060.255 |
| Reagenzröhrchen für FACS 5,0 ml | Sarstedt AG & Co.KG (Nümbrecht, Deutschland) 55.1579 |
| Safety- Multifly®- Kanüle | Sarstedt AG & Co.KG (Nümbrecht, Deutschland) 85.1638.235 |

2.7 Geräte

| | |
|-----------------------------|--|
| APACT 4004 Aggregometer | LabiTec (Ahrensburg, Deutschland) |
| Gefrierschrank -20 °C | Kirsch (Offenburg, Deutschland) |
| FACS Calibur flow cytometer | Becton Dickinson (Franklin Lakes NJ, USA) |
| Mikro 200R Zentrifuge | Hettich (Tuttlingen, Deutschland) |
| Fluoroskan Ascent | Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) |
| Mikropipeten | Gilson Inc. (Middleton, USA) |

| | |
|---------------------------|--|
| Multiskan FC | Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) |
| Sysmex | Sysmex Deutschland GmbH (Norderstedt, Deutschland) |
| Tischzentrifuge | Neo-Lab (Heidelberg, Deutschland) |
| Varioskan | Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) |
| Vortexer, Vortex- Genie 2 | Neo-Lab (Heidelberg, Deutschland) |
| Wasserbad | Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland) |
| Wellwash Versa | Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) |
| Zentrifuge Universal 320R | Hettich (Tuttlingen, Deutschland) |

2.8 Software

| | |
|---------------------------------|--|
| APACT LPC- Software AS-IS 1.21c | LabiTec (Ahrensburg, Deutschland) |
| CellQuest-Software 6.0 | Becton Dickinson (Franklin Lakes NJ, USA) |
| Fluoroskan Ascent- Software 2.6 | Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) |
| SkanIt for Multiskan-Software | Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) |

2.9 Vorbereitung der Proben

Die Stocklösungen der einzelnen bakteriellen Substanzen wurden nach Herstellerangaben vorbereitet, aliquotiert und bei -20° C gelagert.

Zu jedem Versuch wurden die einzelnen Aliquote aufgetaut, zentrifugiert und individuell abhängig vom Versuchsaufbau mit Aqua dest. verdünnt.

2.10 Ethik- und Tierversuchsvotum

Die Blutproben zur Gewinnung der Thrombozyten wurden von gesunden Personen entnommen, die sich zur regulären Blutspende am Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburg vorstellten. Die Spenderinnen und Spender wurden über die Verwendung der Blutproben zu Forschungszwecken ausführlich aufgeklärt und es wurde das schriftliche Einverständnis eingeholt. Für das Forschungsvorhaben lag ein Votum der Ethikkommission der Universität Würzburg (Nr. 101/15) vor, die keine rechtlich-ethischen Bedenken festgestellt hatte. Tierexperimentelle Versuche wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

2.11 Gewinnung von Blutproben

Jeder Spenderin und jedem Spender wurden mithilfe einer Safety-Multifly®-Kanüle zwei 10 ml S-Monovetten® Citrat (3,2 % Citratpuffer, 106 mM Trinatriumcitrat) entnommen. Die Blutproben wurden direkt im Anschluss entsprechend der unten genannten Methoden weiterverarbeitet.

2.12 Aggregationstestung

Für die Aggregation in thrombozytenreichem Plasma (platelet rich plasma, PRP) wurden die 10 ml S-Monovetten für 5 Minuten bei 280 g zentrifugiert (1400 rpm, (280 g), Hettich Zentrifuge), um ein Absetzen der Erythrozyten zu bewirken.

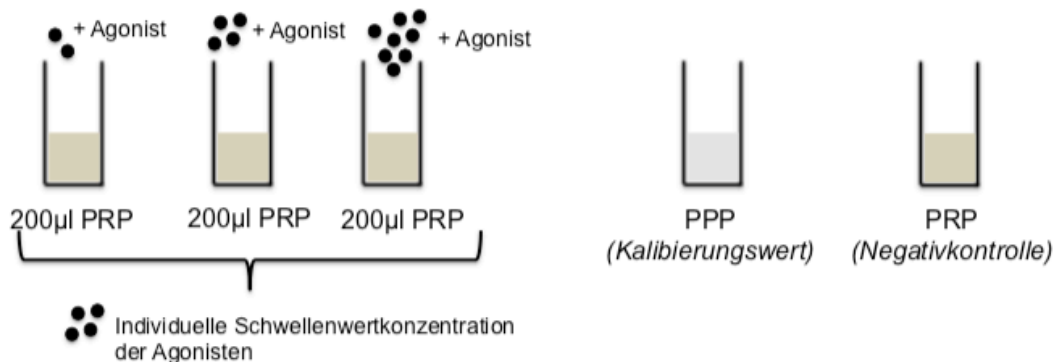
Anschließend wurden 350 µl des so gewonnenen PRPs für 1 Minute bei 21380 g in einer Mikro-200-R-Zentrifuge Hettich zentrifugiert. Der Überschuss wurde als thrombozytenarmes Plasma (platelet poor plasma, PPP) abgenommen und als Kalibrierungswert für die Aggregationsmessungen herangezogen.

Diese erfolgten im APACT-4004 bei einer Temperatur von 37 °C. Das Prinzip beruht auf der photometrischen Messung der unterschiedlichen Lichtdurchlässigkeit (Transmission) des PRP, die durch Aggregatbildung der Thrombozyten ansteigt [116].

Zuerst erfolgte die Bestimmung der individuell niedrigsten ADP und Kollagen-Konzentration für jeden einzelnen Probanden, die zur Auslösung einer etwa submaximalen oder reversiblen Aggregationsantwort führte (Schwellenwert-Aggregation). Hierfür wurden 200 µl PRP in eine Einwegküvette pipettiert und die steigenden Konzentrationen von 1 - 5 µM ADP- und 1 µg/ml - 5 µg/ml Kollagen getestet. Zusätzlich wurde eine Küvette mit 200 µl von dem nicht-stimulierten PRP als Negativkontrolle gemessen (keine Thrombozytenaggregation) [117].

Es erfolgte anschließend die Aufteilung des PRPs in vier Küvetten zu je 200 µl, und die PRP-Proben wurden ohne oder mit 2 µl der drei analysierten bakteriellen Substanzen aus den verschiedenen Stocklösungen sowie mit der individuellen ADP-/ Kollagen-Schwellenwertkonzentration gleichzeitig in 4 Kanälen stimuliert. Um die alleinigen Effekte der bakteriellen Substanzen zu ermitteln, wurden 2 µl der bakteriellen Substanzen ohne Agonistenzugabe zu 200 µl PRP hinzugefügt. Die Endkonzentrationen von LTX, C14 und LPS befanden sich in den Bereichen von 0,1 µg/ml - 10 µg/ml (**Abb.4**).

1. Bestimmung einer individuellen ADP-/ Kollagenkonzentration (= Schwellenwertkonzentration)



2. Aggregationsversuch mit der individuellen Agonistenkonzentration und den Toxinen

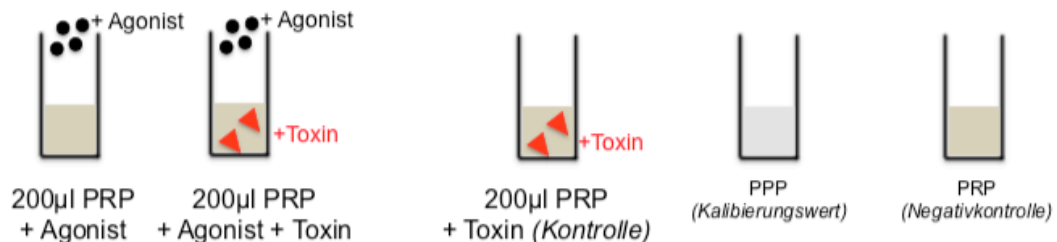


Abb. 4: Pipettierschema für APACT.

Bestimmung einer individuellen ADP- und Kollagenkonzentration für jeden Probanden, bei der gerade noch eine reversible Aggregation der Thrombozyten stattfindet.

Die Aggregationsmessung erfolgte über 5 Minuten, hierbei wurden die Proben mithilfe eines Magnetrührers durchgängig gemischt.

Die Aggregationswerte wurden in Excel-Tabellen erfasst. Für die statistische Auswertung wurden die Maximalwerte der Aggregation während der 5-minütigen Messung herangezogen.

2.13 Fluorescence-activated-cell sorting (FACS)

Die Phosphorylierung von VASP und die Expression von P-Selektin (CD62P) wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Bei dieser Methode werden zuerst die ausgewählten thrombozytären Proteine mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gefärbt. Im nächsten Schritt wird mit Hilfe eines Laserstrahls Fluoreszenz induziert, die danach mit einem Sensor registriert und gemessen wird.

Diese Versuche wurden mit gewaschenen Thrombozyten (GT) durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden zwei 10 ml S-Monovetten Vollblut benötigt. Hierzu wurden zu 10 ml Vollblut jeweils 60 µl von 0,5 M EGTA hinzugegeben, um eine frühzeitige Thrombozytenaktivierung zu verhindern. Anschließend wurden die Monovetten bei 280 g für 5 Minuten zentrifugiert.

Das so entstandene PRP wurde abgetrennt und erneut für 5 Minuten mit 430 g zentrifugiert, um ein Absetzen des Thrombozytenpellets zu bewirken. Nach vorsichtigem Entfernen des Plasmas wurden die pelletierten Thrombozyten in 5 ml von Raumtemperatur warmen CGS-Puffer resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren bei 430 g für 5 Minuten und Abtragen des Überstandes wurde das Pellet mit Tyrode's Puffer resuspendiert. Hierbei wurde die Thrombozytenzahl mit dem Sysmex-Gerät gemessen und auf 3×10^8 Thrombozyten/ml eingestellt.

Es erfolgte eine unterschiedliche Vorgehensweise für die Messung der VASP-Phosphorylierung und der CD62P-Expression:

Für die VASP Phosphorylierung wurden fünf Proben mit einem Volumen von jeweils 30 µl aus den GT vorbereitet. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 37°C wurde zu jeder Probe 0,3 µl von 0,1 M CaCl_2 hinzugegeben, sodass eine finale Calcium-Konzentration von 1 mM entstand.

Danach erfolgte die Stimulation nach folgendem Schema bei 37°C:

Tab. 1: Übersicht der Probenstimulation für die FACS-Analyse.

| Nr. | Stimulation | Endkonzentration |
|-----|---|-------------------------|
| 1. | 30 µl (GT) + 1 µl PBS → 5 min, 37°C | → Unspezifische Bindung |
| 2. | 30 µl (GT) + 1 µl PBS → 5 min, 37°C | → Kontrolle (Basalwert) |
| 3. | 30 µl (GT) + 1 µl LTX (30 µg/ml) → 5 min, 37°C | → 1 µg/ml LTX |
| 4. | 30 µl (GT) + 1 µl C14 (150 µg/ml) → 5 min, 37°C | → 5 µg/ml C14 |
| 5. | 30 µl (GT) + PGE1 (30 µM) → 5 min, 37°C | → 1 µM PGE1 |

Nach der Stimulation wurden die Proben mit 10 µl von 10 % Formaldehyd abgestoppt und 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die finale Konzentration des Formaldehyds betrug somit 2,5 %.

Im nächsten Schritt wurden alle Proben bei 21380 g in einer Mikro-200-R-Zentrifuge Hettich 1 Minute zentrifugiert.

Nach vorsichtigem Abtragen des Überstandes mittels einer Pipette aus allen Proben, wurde die Probe Nr.1 (Unspezifische Bindung) mit 50 µl PBS/BSA/Glc-Puffer resuspendiert, während das Thrombozytenpellet der restlichen Proben (2-5) mit 45 µl PBS/BSA/Glc-Puffer resuspendiert wurde.

Da das VASP-Protein ein intrazelluläres Protein ist, muss eine Membranpermeabilisierung erfolgen. Dafür wurden die Proben 2-5 mit 5 µl von 2 % Triton X-100 Lösung in PBS gemischt. Die Probe Nr. 1 bleibt dagegen nicht permeabilisiert, so dass sich ein Antikörper gegen VASP-Protein nur unspezifisch binden kann.

Anschließend wurden 2,5 µl des monoklonalen Antikörpers gegen phospho-VASP Ser²³⁹ (Klon 16C2, 100 µg/ml) zu allen Proben hinzugegeben, sodass eine Endkonzentration von 5 µg/ml in jeder Probe erreicht wurde.

Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden alle Proben bei 21380 g in einer Mikro-200-R-Zentrifuge Hettich 1 Minute zentrifugiert.

Nach erneutem Entfernen des Überstandes und Resuspendierung des Thrombozytenpellets in 100 µl PBS/BSA/Glc-Puffer wurde in alle fünf Proben 1 µl eines FITC-konjugierten Sekundärantikörpers (goat anti-mouse) gegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten in Dunkelheit wurden alle Proben mit 500 µl PBS/BSA/Glc-Puffer verdünnt und mit Hilfe des Durchflusszytometers FACS Calibur analysiert.

Zeitgleich wurden die Proben für die Analyse der CD62P-Expression vorbereitet. Nach dem Waschen der Thrombozyten wurde die verbleibende GT-Suspension in sechs Proben mit einem Volumen von jeweils 30 µl aufgeteilt. Anschließend wurden zu jeder Probe 3 µl des anti-CD62P-FITC-konjugierten Antikörpers gegeben, zu der Isotyp-Kontrolle 3 µl des FITC-konjugierten Isotyp-Kontroll-Antikörpers gegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten im Dunkeln bei 37°C wurden 0,3 µl von 0,1 M CaCl₂ zu jeder Probe hinzugefügt; die Endkonzentration betrug hierbei 1 mM CaCl₂.

Daraufhin erfolgte die Stimulation der Proben bei 37°C nach folgendem Schema:

Die ersten beiden Proben bildeten auch hier die Isotyp-Kontrolle und die nicht-stimulierte Probe, zu beiden wurde 1 µl PBS-Puffer hinzugefügt. Zu der dritten Probe wurde Thrombin (Endkonzentration 0,025 U/ml) gegeben. In die vierte Probe wurde 1 µl LPS (150 µg/ml) pipettiert, sodass eine finale Konzentration von 5 µg/ml LPS entstand. Zur fünften Probe wurden sowohl Thrombin als auch LPS mit einer

Endkonzentration von 0,025 U/ml Thrombin und 5 µg/ml LPS hinzugefügt. Die letzte Probe mit einer hohen Konzentration an Thrombin von 0,5 U/ml bildete die Positivkontrolle.

Nach einer 5-minütigen Stimulation wurden alle Proben mit 3 µl des 10%-igen Formaldehyds (Endkonzentration 1% Formaldehyd) abgestoppt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln fixiert. Danach wurden alle Proben mit 500 µl PBS/BSA/Glc-Puffer verdünnt.

Für die Analysen wurde ein FACS Calibur-Durchflusszytometer von Becton Dickinson mit der BD CellQuest Pro Software eingesetzt. Durch Gating wurde die Ziel-Thrombozytenpopulation ausgewählt (siehe **Abb. 5**). Es wurde die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI= mean fluorescence intensity) für die Auswertungen verwendet. Hierbei galt ein MFI-Wert von 50 (AU, arbitrary unit) als Ausgangswert für die VASP- Phosphorylierung und ein MFI-Wert von 25 (AU) für die CD62P-Expression, jeweils bezogen auf die basalen, nicht-stimulierten Proben. Pro Ansatz wurden mindestens 10 000 Ereignisse erfasst.

Alle Daten wurden in Excel Microsoft weiter ausgewertet und grafisch dargestellt.

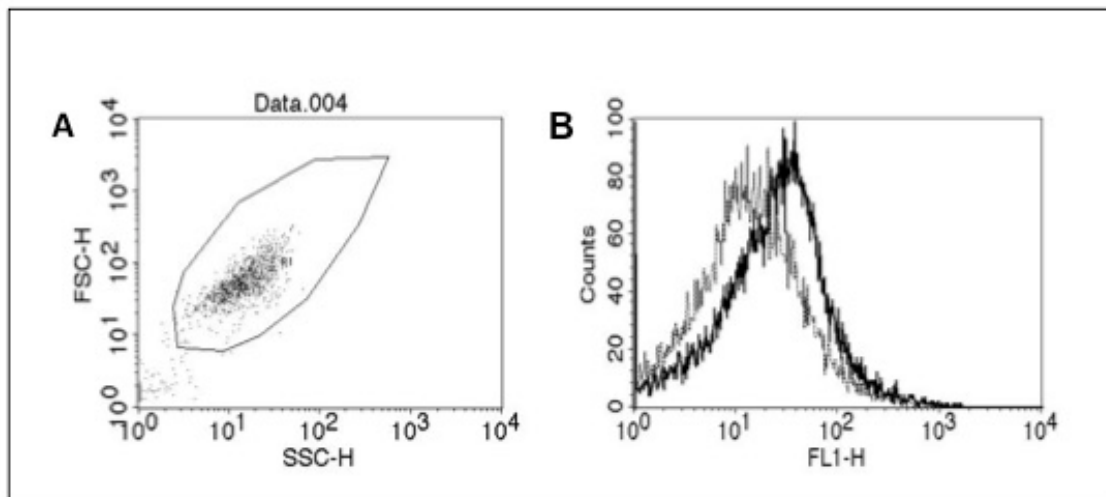


Abb. 5: Schematische Darstellung der FACS-Messung.

A. Im Dot-Plot ist die Seitwärtstreuung (SSC) für die Ermittlung der zellulären Granularität auf der x-Achse und die Vorwärtstreuung (FSC) zur Ermittlung der Zellgröße auf der y-Achse angegeben. Durch das Gating wird die gesuchte Zellpopulation für die Analyse ausgewählt.

B. Histogramm-Plot zur Darstellung der Fluoreszenz-Intensität auf der x-Achse (FL1) und der Anzahl der Ereignisse auf der y-Achse (Counts).

2.14 Chemokin-Messung mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für die ELISA-Tests wurden Thrombozyten als GT präpariert, wobei zum PRP und zum CGS-Puffer 75 nM PGE1 hinzugefügt wurde. Damit wurde sichergestellt, dass die Thrombozyten während des Waschvorgangs nicht präaktiviert werden.

Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei 37°C wurden die Ansätze mit 1 mM CaCl₂ versetzt und anschließend für 30 Minuten nach unten gezeigtem Schema (**Tab. 2**) stimuliert. Nach Zentrifugation bei 14000 g und Raumtemperatur, wurde der Überstand abgenommen und aliquotiert (100 µl Aliquot). Anschließend wurden die Aliquots bei -20°C eingefroren.

Tab. 2: Probenvorbereitung für ELISA-Tests.

| | | |
|----|--|-----------------------|
| 1. | 700 µl GT + 7 µl Puffer → 37°C, 30 Minuten | Kontrolle |
| 2. | 700 µl GT + 7 µl (0,5 mg/ml) LPS → 37°C, 30 Minuten | 5 µg/ml LPS |
| 3. | 700 µl GT + 7 µl (0,5 mg/ml C14 Peptid) → 37°C, 30 Minuten | 5 µg/ml C14 Peptid |
| 4. | 700 µl GT+ 7 µl (0,1 mg/ml LTX) → 37°C, 30 Minuten | 1 µg/ml LTX |
| 5. | 700 µl GT+ 7 µl (50 U/ml Thrombin) → 37°C, 30 Minuten | 0,5 U/ml Thrombin |

Es wurden vier unterschiedliche ELISA-Tests durchgeführt: PF4, CD40L, PDGF und RANTES. Für alle Tests wurde ein Waschpuffer (Verdünnung mit H₂O 1:25), eine Substratsolution, bestehend aus stabilisiertem hydrogenem Peroxid und Chromogen, sowie eine Stop-Lösung aus Schwefelsäure eingesetzt.

Jeder Test beinhaltet eine Platte mit 96 Wells, die mit einem Antikörper gegen das untersuchte Chemokin versehen sind. Um eine geeignete Verdünnungskonzentration ermitteln zu können, wurden im Voraus Vorversuche mit 0,5 U/ml Thrombin und mit nicht-stimulierten Proben durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Vorversuche wurden in der **Tab. 3** unten zusammengefasst.

Tab. 3: Verdünnungen der Proben für ELISA-Tests.

| | |
|--------|---|
| PF4 | alle Proben 1:200 |
| CD40L | alle Proben 1:2 |
| PDGF | Thrombin 1:75 alle übrigen Proben 1:50 |
| RANTES | Alle Proben 1:100 |

Zu Beginn des Versuchs wurden die aliquotierten Proben aufgetaut und nach oben genanntem Schema (**Tab. 3**) verdünnt. Ebenso wurden die Standardkonzentrationen der untersuchten Zytokine entsprechend der Herstellerangaben vorbereitet. Danach wurden die Proben und Standards auf die ELISA-Platte aufgetragen, inkubiert und gemäß **Tab. 4** gefärbt.

Die Speicherung und Auswertung der Ergebnisse erfolgte mithilfe von Excel.

Tab. 4: Pipettierschema für ELISA-Tests.

| Substanz/Schritt | PF4 | sCD40L | PDGF | RANTES |
|--|------------|------------|------------|------------|
| Assay Diluent | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| Probe (verdünnt) | 50 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| Inkubationszeit, Temperatur | 2 h, RT | 2 h, RT | 2 h, RT | 2 h, RT |
| Waschen | 3 x 400 µl | 4 x 400 µl | 3 x 400 µl | 3 x 400 µl |
| HRP-konjugierter Cytokin-Antikörper | 200 µl | 200 µl | 200 µl | 200 µl |
| Inkubationszeit, Temperatur | 2 h, RT | 2 h, RT | 2 h, RT | 2 h, RT |
| Waschen | 3 x 400 µl | 4 x 400 µl | 3 x 400 µl | 3 x 400 µl |
| Substrate solution | 200 µl | 200 µl | 200 µl | 200 µl |
| Inkubation (im Dunkeln) | 30 min, RT | 30 min, RT | 20 min, RT | 20 min, RT |
| Stop Solution | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl |
| Messung bei 450 nm mit Wellenlängen-Korrektur bei 570 nm | | | | |

2.15 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte zusammen mit Priv.-Doz. Dr. Anna Kobsar mit Hilfe des GraphPad Prism 9 Programms (Graph Pad Prism, San Diego, CA, USA). Der Shapiro-Wilk-Test wurde zur Normal-Verteilungsanalyse eingesetzt. Varianzunterschiede zwischen den Gruppen wurde mit ANOVA (one-way analysis of variance) getestet, gefolgt vom Tukey-Kramer-Test als post-hoc-Test. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant eingestuft, $p < 0,1$ als Tendenz.

3 Ergebnisse

3.1 Analytische Vorgehensweise

Die zu untersuchenden Bakterienbestandteile LTX, LPS und C14 können prinzipiell die Fähigkeit besitzen, die Thrombozyten in ihrer Funktion zu beeinflussen. Die potenzielle Wirkung des jeweiligen Toxins wurde dabei in einem mehrstufigen Versuchsschema geprüft.

Im ersten Schritt wurde dabei mit Hilfe der Lichttransmissionsaggregometrie festgestellt, ob die Substanzen einen Effekt auf die Agonisten-induzierte Aggregationsfähigkeit, als eine der wesentlichen physiologischen Eigenschaften von Thrombozyten, ausüben. Diese Analysen wurden im Milieu des PRP durchgeführt. Ziel war es, aufzuzeigen, ob die Toxine in der Lage sind, eine submaximale Aggregation (mit einer Schwellenwert-Konzentration der Agonisten ADP oder Kollagen) zu inhibieren oder zu verstärken.

Anschließend wurde in den weiteren Schritten geklärt, inwieweit sich die in der Aggregometrie ermittelte Wirkung auch in weiteren funktionellen Bereichen, wie der inhibitorischen Signalwege, der Aktivierungsmarker oder der Chemokinfreisetzung nachweisen lässt.

3.2 Keine Aggregationsinduktion durch die alleinige Toxinexposition

Initial wurde untersucht, ob die Substanzen die Fähigkeit besitzen, eine Aggregation ohne zusätzliche Stimulation mit anderen Agonisten zu induzieren. Es zeigte sich, dass alle drei Toxine in einer Konzentration bis 10 µg/ml LTX, LPS oder C14 keine Aggregation auslösen, selbst ein shape change ist nicht erkennbar.

3.3 Die Wirkung von LTX auf die Thrombozytenfunktion

3.3.1 LTX und Thrombozytenaggregation

Vorab wurde bei jeder Blutprobe die individuelle ADP- und Kollagen-Konzentration ermittelt, die eine submaximale Schwellenwertaggregation auslöste (**Abb. 6**). Diese Konzentrationen lagen bei 1-5 μM ADP und 0,5-1,0 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen. Wie in **Abb. 6A** ersichtlich ist, erreichte die alleinige Stimulation mit ADP eine maximale Aggregation von $71,7 \pm 8,4\%$. Die Zugabe der höchsten LTX-Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ zeigte eine tendenzielle, allerdings nicht signifikante Hemmung der ADP-induzierten Aggregation von $41,9 \pm 2,2\%$ ($p < 0,1$). Die Werte lagen für 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LTX bei $58,2 \pm 15,1\%$ und für 1 $\mu\text{g/ml}$ LTX bei $55,0 \pm 5,4\%$.

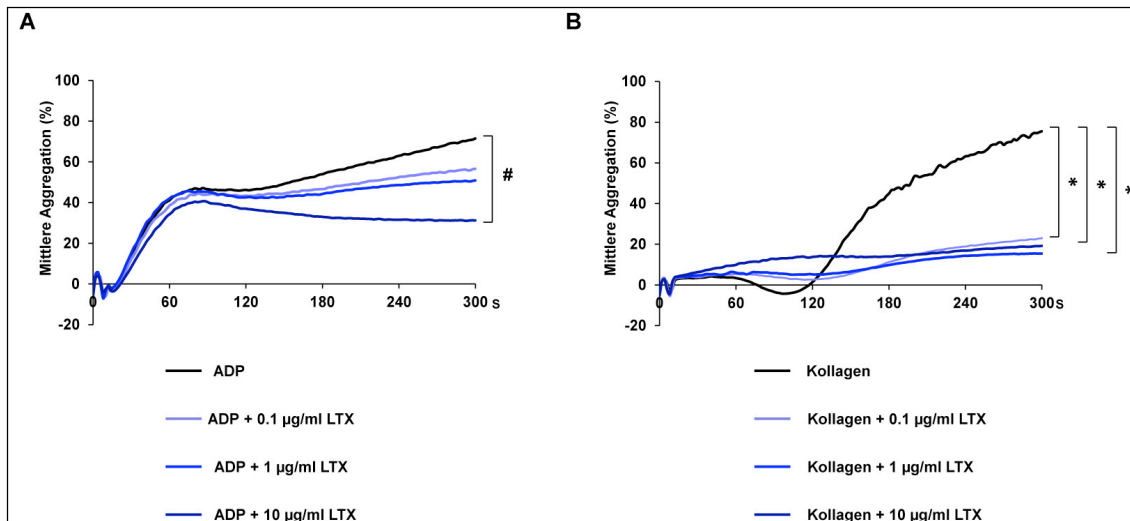


Abb. 6: Wirkung von LTX auf die Agonisten-induzierte Aggregation.

Zunächst wurde für jede Probe die individuelle Schwellenkonzentration für ADP- (1-5 μM) und Kollagen (0,5-1,0 $\mu\text{g/ml}$) bestimmt. Darunter erfolgte im Anschluss die Stimulation mit 0,1, 1 oder 10 $\mu\text{g/ml}$ LTX. Die Messung erfolgte über 300 s in PRP.

(A) Gezeigt sind die Mittelwertkurven für die Stimulation mit ADP und verschiedenen LTX-Konzentrationen, $n=3$; #: $p < 0,1$ (als Tendenz), verglichen mit der ADP-stimulierten Probe.

(B) Dargestellt sind die Mittelwertkurven für die Stimulation mit Kollagen und verschiedenen LTX-Konzentrationen, $n=3$; *: $p < 0,05$ verglichen mit der Kollagen-stimulierten Probe.

Eine deutliche Toxinwirkung war bei der induzierten Aggregation mit Kollagen zu verzeichnen (**Abb. 6B**). Eine reine Kollagenzugabe bewirkte eine Schwellenwert-Aggregation von $76,3 \pm 4,7\%$. 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LTX hemmte diese auf $23,1 \pm 7,2\%$, 1 $\mu\text{g/ml}$ LTX auf $15,6 \pm 0,5\%$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ LTX ähnlich stark auf Werte von $19,2 \pm 1,9\%$.

Für die weiteren Versuche wurde die LTX-Konzentration von 1 µg/ml verwendet, da sie bereits inhibitorische Auswirkungen auf die ADP-induzierte Aggregation und eine signifikante Hemmung bei Kollagen zeigte.

3.3.2 LTX und VASP-Phosphorylierung

Mittels Durchflusszytometrie wurde anschließend die Wirkung von LTX auf die VASP-Phosphorylierung, als Schlüsselmolekül der inhibitorischen Signalwege in Thrombozyten, untersucht (**Abb. 7**).

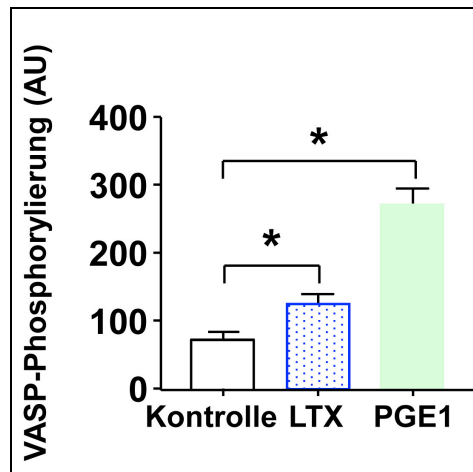


Abb. 7: Wirkung von LTX auf die VASP- Phosphorylierung.

Gewaschene Thrombozyten wurden mit anti-VASP Ser¹⁵⁷-Antikörper inkubiert. Nach Stimulation mit 1 µg/ml LTX, 1 µM PGE1 oder ohne Stimulation wurde anschließend die VASP-Phosphorylierung als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) gemessen.

Gezeigt werden die Mittelwerte der MFI ± SEM in arbiträren Einheiten (AU, arbitrary units); n= 5. *:p<0.05 verglichen mit der unstimulierten Probe.

Im Vergleich zur unstimulierten Probe mit einer basalen VASP-Phosphorylierung von 72,8 ± 9,0 AU wird durch Inkubation mit LTX eine Zunahme auf 123,2 ± 15,5 AU vermittelt. Die Positiv-Kontrolle wurde mit Prostaglandin E1 als einem Aktivator der Adenylylzyklase durchgeführt, wodurch die VASP-Phosphorylierung deutlich stärker auf 272,0 ± 21,3 AU anstieg.

3.3.3 LTX und Chemokin-Sekretion

Anschließend wurde mit der LTX-Konzentration von 1 µg/ml der Effekt auf die Sekretion der bedeutenden thrombozytären Chemokine CD40L, PF4, PDGF und RANTES mittels ELISA-Methoden untersucht (**Abb. 8**).

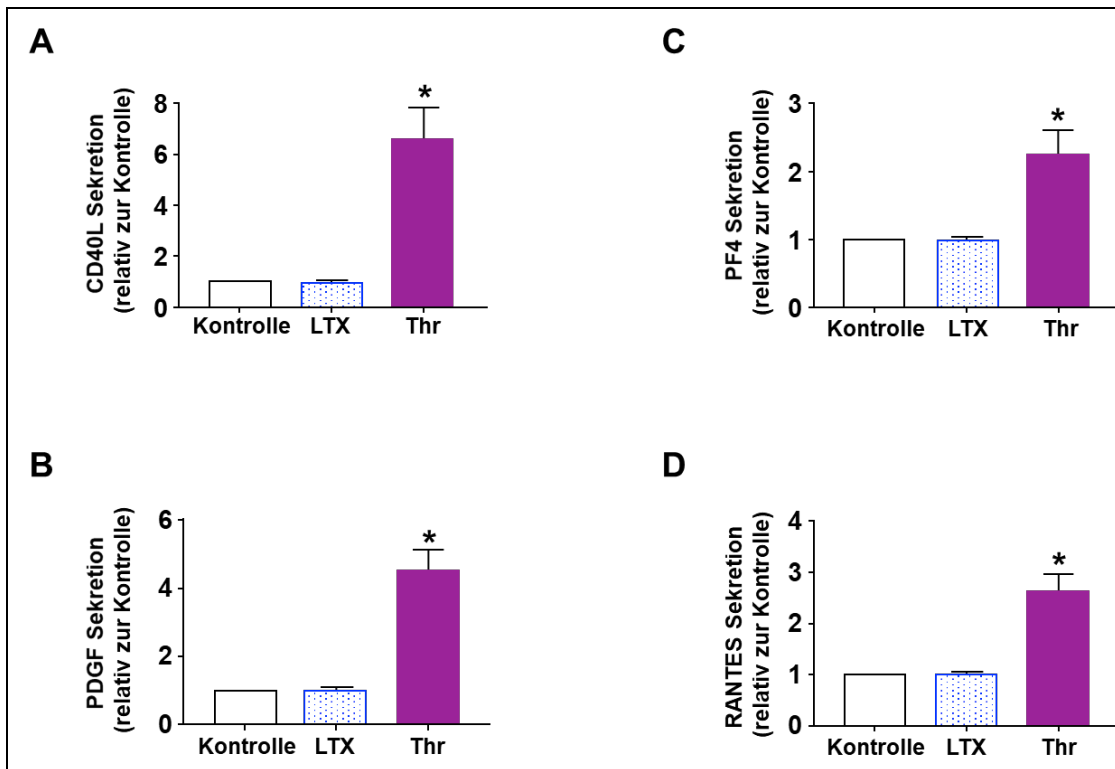


Abb. 8: Wirkung von LTX auf die thrombozytäre Sekretion.

Der Überstand von gewaschenen Thrombozyten (unstimuliert, stimuliert mit 1 µg/ml LTX oder mit 0,5 U/l Thrombin für 30 min) wurde auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Die sezernierten Chemokine wurden mit spezifischen Antikörpern markiert, nach Zugabe von Farbreagenzien erfolgte die fotometrische Messung.

Die Ergebnisse sind dargestellt als relative Mittelwerte ± SEM bezogen auf die Kontrolle ohne Stimulation.

(**A**): CD40-Ligand, n= 10; (**B**): PDGF, n=9; (**C**): PF4, n=9; (**D**): RANTES, n=5.

*: p<0.05, verglichen mit der unstimulierten Probe.

Es zeigte sich, dass durch eine Zugabe von LTX die mittlere Konzentration von CD40L im Überstand der gewaschenen Thrombozyten nicht wesentlich beeinflusst wird. Eine alleinige Thrombinzugabe (0,5 U/l) als Positivkontrolle erreichte eine $6,6 \pm 1,2$ fache Erhöhung (**Abb. 8A**).

LTX hatte ebenfalls keine signifikante Wirkung auf die Ausschüttung von PDGF (**Abb. 8B**). Bei Stimulation mit Thrombin wurde eine $4,5 \pm 0,6$ -fache Steigerung der Sekretion von PDGF erreicht. Auch die Freisetzung von PF4 wurde durch LTX nicht verändert (**Abb. 8C**). Die Positivkontrolle mit Thrombin löste eine $2,3 \pm 0,3$ -fache Steigerung aus. Genauso blieb die Konzentration von RANTES unter LTX-Einfluss unverändert (**Abb. 8D**). Im Vergleich dazu bewirkte Thrombin einen $2,6 \pm 0,3$ -fachen Anstieg.

3.4 Die Wirkung von C14 auf die Thrombozytenfunktion

3.4.1 C14 und Thrombozytenaggregation

Für die Aggregationsversuche mit C14 wurden wiederum individuelle Schwellenwertkonzentrationen für ADP und Kollagen verwendet, welche zwischen 1-5 μM ADP und 0,5-1,0 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen lagen (**Abb. 9**).

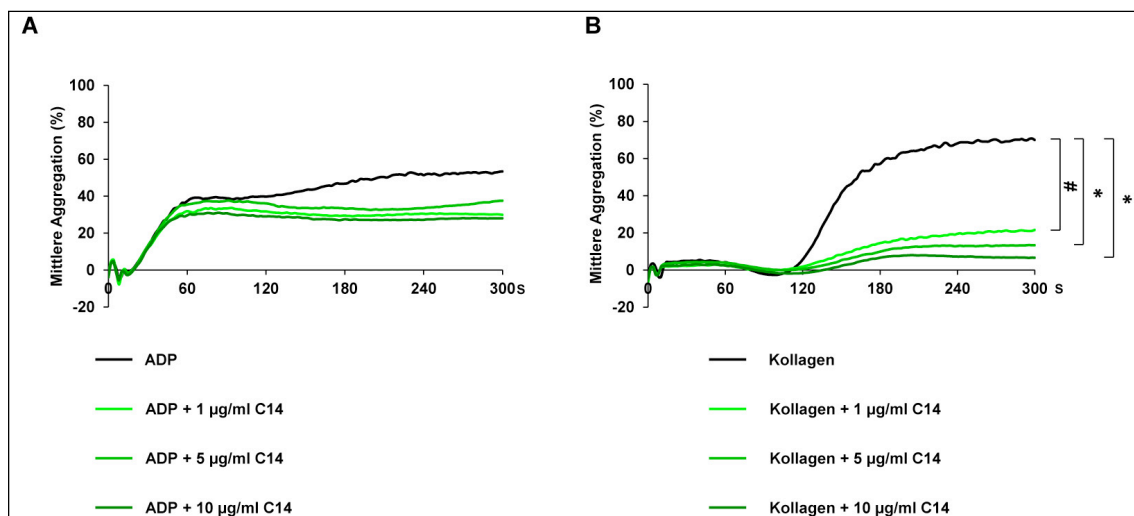


Abb. 9: Einfluss von C14 auf die Agonisten-induzierte Aggregation.

Zunächst wurde für jede Probe die individuelle Schwellenkonzentration für ADP- (1-5 μM) und Kollagen (0,5-1,0 $\mu\text{g/ml}$) bestimmt. Darunter erfolgte im Anschluss die Stimulation mit 1, 5 oder 10 $\mu\text{g/ml}$ C14. Die Messung erfolgte über 300 s in PRP.

(A) Gezeigt sind die Mittelwertkurven für die Stimulation mit ADP und verschiedenen C14-Konzentrationen, $n=3$;

(B) Dargestellt sind die Mittelwertkurven für die Stimulation mit Kollagen und verschiedenen C14-Konzentrationen, $n=3$; *: $p < 0,05$, #: $p < 0,1$ (als Tendenz), verglichen mit der Kollagen-stimulierten Probe.

Bei der ADP-induzierten Aggregation konnte kein wesentlicher Effekt durch C14 festgestellt werden. Die Stimulation mit ADP erreichte mittlere Werte von $65,1 \pm 10,3\%$ (**Abb. 9A**). Nach Zugabe von 1, 5 bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ C14 lagen die mittleren Aggregationswerte zwar niedriger bei $43,6 \pm 14,7\%$, $50,5 \pm 13,8\%$ und $42,4 \pm 15,4\%$. Aufgrund der individuellen Schwankungen waren diese Abweichungen aber nicht signifikant.

Bei der Kollagen-induzierten Aggregation gab sich dagegen ein stark hemmender Effekt durch C14 zu erkennen (**Abb. 9B**). Bei einer alleinigen Stimulation mit Kollagen wurde eine Aggregation von $71,4 \pm 10,3\%$ erreicht. 1 $\mu\text{g/ml}$ C14 reduzierte diese Werte auf $25,2 \pm 18,9\%$, 5 $\mu\text{g/ml}$ C14 auf $18,2 \pm 16,7\%$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ auf $11,5 \pm 9,1\%$. Für die weiteren Versuche wurde eine Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ C14 verwendet, da diese bereits eine deutlich hemmende Wirkung auf die Aggregation mit Kollagen zeigte.

3.4.2 C14 und VASP-Phosphorylierung

Aufgrund der aggregationshemmenden Effekte wurde im nächsten Schritt der Einfluss von C14 auf die VASP-Phosphorylierung - analog zu LTX – geprüft (**Abb. 10**).

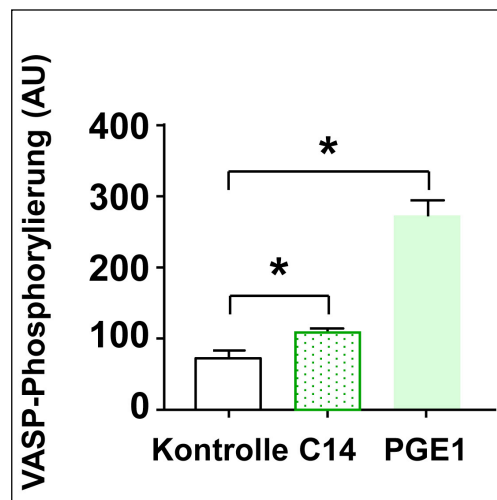


Abb. 10: Wirkung von C14 auf die VASP- Phosphorylierung.

Gewaschene Thrombozyten wurden mit anti-VASP Ser¹⁵⁷-Antikörper inkubiert. Nach Stimulation mit 5 $\mu\text{g/ml}$ C14, 1 μM PGE1 oder ohne Stimulation wurde anschließend die VASP-Phosphorylierung als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) gemessen. Gezeigt werden die Mittelwerte der MFI \pm SEM in arbiträren Einheiten (AU, arbitrary units); $n = 5$. *: $p < 0.05$ verglichen mit der unstimulierten Probe.

Verglichen mit der unstimulierten Probe mit einer basalen MFI von $72,8 \pm 9,0$ AU wurde durch die Toxinzugabe eine Steigerung der VASP- Phosphorylierung auf $106,4 \pm 7,3$ AU erreicht. Eine Stimulation mit PGE1 führte im Vergleich zu einer noch stärkeren Zunahme auf $272,0 \pm 21,3$ AU.

3.4.3 C14 und Chemokin-Sekretion

Im Anschluss wurde mittels ELISA die Wirkung von C14 auf die Chemokin-Sekretion aus Thrombozyten untersucht (**Abb. 11**).

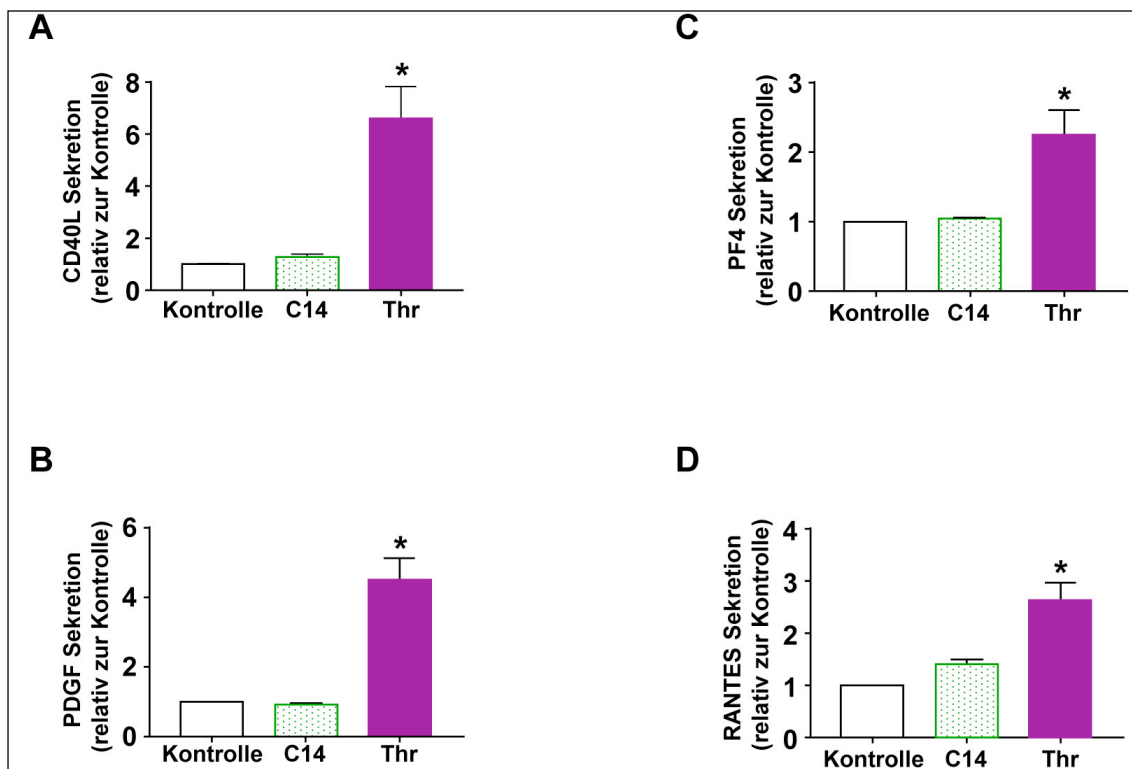


Abb. 11: Wirkung von C14 auf die thrombozytäre Sekretion.

Der Überstand von gewaschenen Thrombozyten (unstimuliert, stimuliert mit $5 \mu\text{g/ml}$ C14 oder mit $0,5 \text{ U/l}$ Thrombin für 30 min) wurde auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Die sezernierten Chemokine wurden mit spezifischen Antikörpern markiert, nach Zugabe von Farbreagenzien erfolgte die fotometrische Messung. Die Ergebnisse sind dargestellt als relative Mittelwerte \pm SEM bezogen auf die Kontrolle ohne Stimulation.

(A): CD40-Ligand, n= 10; (B): PDGF, n=9; (C): PF4, n=9; (D): RANTES, n=5.

*: $p < 0.05$, verglichen mit der unstimulierten Probe.

C14 bewirkte keinen wesentlichen Einfluss auf die Freisetzung von CD40L, PDGF, PF4 oder RANTES (**Abb. 11A-D**). Gegenübergestellt sind die Positiv-Kontrollen mit Thrombin, die im Vergleich zur unstimulierten Probe einen erhöhten Release für CD40L um das $6,6 \pm 1,2$ -fache (**Abb. 11A**), für PDGF um das $4,5 \pm 0,6$ -fache (**Abb. 11B**), für PF4 um das $2,3 \pm 0,3$ -fache (**Abb. 11C**) und für RANTES um das $2,6 \pm 0,3$ -fache (**Abb. 11D**) zeigten (analog zu Abb. 8).

3.5 Die Wirkung von LPS auf die Thrombozytenfunktion

3.5.1 LPS und Thrombozytenaggregation

Die Analyse der Aggregationstestung unter Einfluss von LPS wurde wiederum nach Ermittlung der Schwellenkonzentrationen von ADP (1-5 μ M ADP) und Kollagen (0,5-1,0 μ g/ml) durchgeführt (**Abb. 12**).

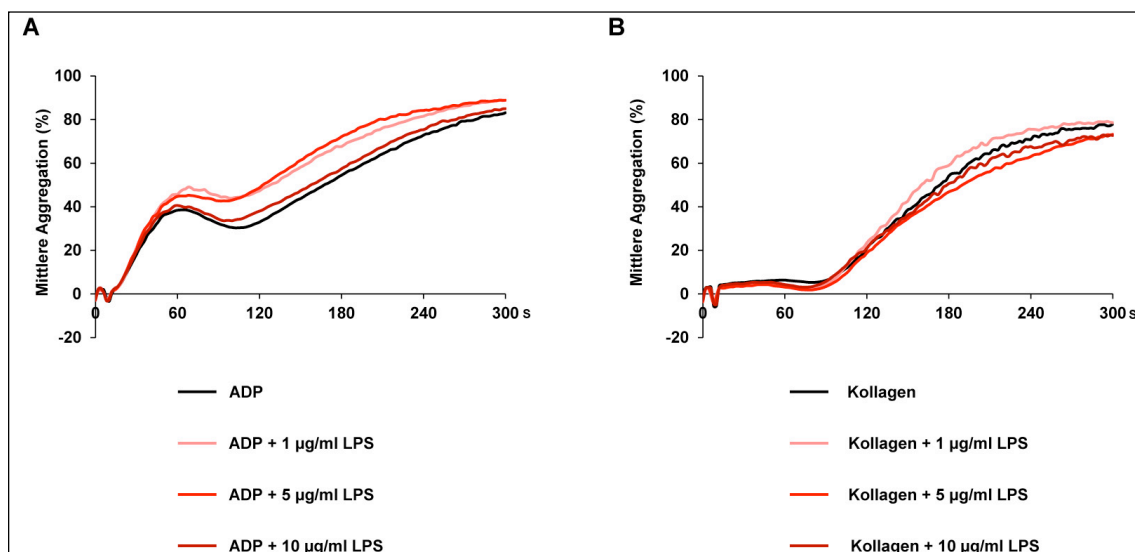


Abb. 12: Einfluss von LPS auf die Agonisten-induzierte Aggregation.

Zunächst wurde für jede Probe die individuelle Schwellenkonzentration für ADP- (1-5 μ M) und Kollagen (0,5-1,0 μ g/ml) bestimmt. Darunter erfolgte im Anschluss die Stimulation mit 1, 5 oder 10 μ g/ml LPS. Die Messung erfolgte über 300 s in PRP.

(A) Gezeigt sind die Mittelwertkurven für die Stimulation mit ADP und verschiedenen LPS-Konzentrationen, n=3;

(B) Dargestellt sind die Mittelwertkurven für die Stimulation mit Kollagen und verschiedenen LPS-Konzentrationen, n=3

Die mittlere Schwellenwert-Aggregation durch Stimulation mit ADP betrug $79,2 \pm 1,9\%$ (**Abb. 12A**). Die mittleren Aggregationswerte waren nach Zugabe von 1, 5 bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS mit $86,3 \pm 5,1\%$, $91,1 \pm 2,4\%$ und $89,9 \pm 4,1\%$ etwas höher, aber nicht signifikant verändert.

Bei der Kollagen-induzierten Aggregation ergab sich durch LPS-Inkubation kein Einfluss auf die Ergebnisse (**Abb. 12B**).

Aufgrund der tendenziell höchsten Aggregationswerte bereits bei 5 $\mu\text{g/ml}$ LPS wurde diese Konzentration für die nachfolgenden Versuche ausgewählt, um einen möglichen aktivierenden Effekt dieser Substanz auf Thrombozyten zu untersuchen.

3.5.2 LPS und CD62P Expression

Im Anschluss wurde deshalb die Expression von CD62P (P-Selektin) auf der Thrombozytenoberfläche unter LPS-Einfluss untersucht (**Abb. 13**). Dieses Protein ist einer der wichtigsten Aktivierungsmarker von Thrombozyten und für Interaktionen mit anderen Blutzellen von großer Bedeutung [118].

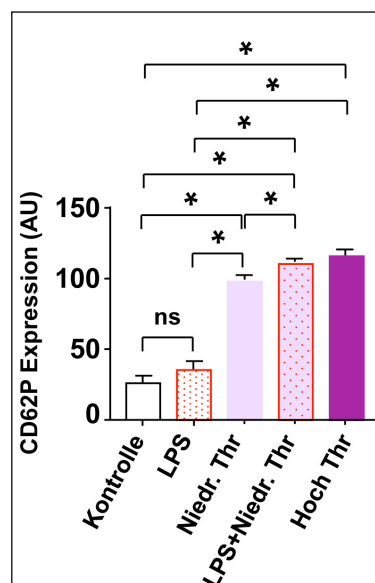


Abb. 13: Einfluss von LPS auf die CD62P-Expression.

Die Grafik zeigt die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) an gewachsenen Thrombozyten nach Inkubation mit anti-CD62P-Antikörpern und durchflusszytometrischer Detektion. Die Thrombozyten wurden stimuliert mit Thrombin in niedriger Konzentration (0,025 U/ml), mit LPS (5 $\mu\text{g/ml}$), mit Thrombin in niedriger Konzentration (0,025 U/ml) und LPS (5 $\mu\text{g/ml}$) gleichzeitig oder mit Thrombin in höherer Konzentration (0,5 U/ml). Zum Vergleich dienten unstimulierte Thrombozyten.

Die Ergebnisse sind als MFI \pm SEM in arbiträren Einheiten dargestellt (AU, arbitrary units); n=8. *: $p < 0,05$, wie angezeigt; ns: nicht signifikant.

Die basale CD62P-Expression mit $26,2 \pm 5,3$ AU wird nach alleiniger LPS-Zugabe mit $34,9 \pm 7,1$ AU nicht signifikant beeinflusst. Durch Ko-Stimulation mit einer niedrigen Thrombinkonzentration (0,025 U/ml) wird dagegen ein leicht verstärkender Effekt von LPS von $98,1 \pm 2,8$ AU auf $110,1 \pm 2,6$ AU deutlich. Bei der Positiv-Kontrolle mit hoher Thrombinkonzentration (0,5 U/ml) stieg die Expression noch etwas stärker auf $115,4 \pm 4,6$ AU an.

3.5.3 LPS und Chemokin-Sekretion

Nachfolgend wurde wiederum der Einfluss von LPS (5 $\mu\text{g/ml}$) auf die Freisetzung der physiologisch bedeutsamen Chemokine CD40L, PDGF, PF4 und RANTES mittels ELISA-Methoden analysiert (**Abb. 14**).

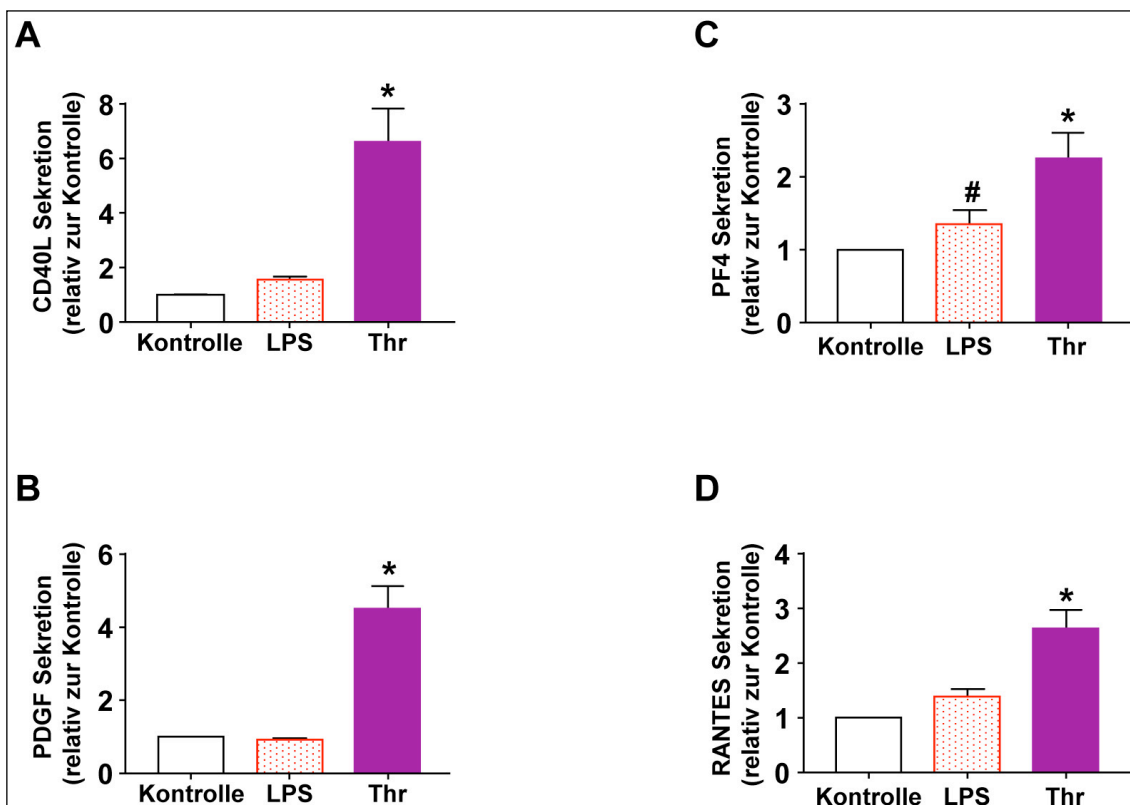


Abb. 14: Wirkung von LPS auf die thrombozytäre Sekretion.

Der Überstand von gewaschenen Thrombozyten (unstimuliert, stimuliert mit 5 $\mu\text{g/ml}$ LPS oder mit 0,5 U/l Thrombin für 30 min) wurde auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Die sezernierten Chemokine wurden mit spezifischen Antikörpern markiert, nach Zugabe von Farbreagenzien erfolgte die fotometrische Messung. Die Ergebnisse sind dargestellt als relative Mittelwerte \pm SEM bezogen auf die Kontrolle ohne Stimulation. (A): CD40-Ligand, n= 8; (B): PDGF, n=9; (C): PF4, n=6; (D): RANTES, n=6. *: p<0.05, #: p<0,1 (als Tendenz), verglichen mit der unstimulierten Probe.

Die Inkubation mit LPS hatte auf die Sekretion von CD40L, PDGF und RANTES keinen signifikanten Einfluss (**Abb. 14A, 14B und 14D**). Eine tendenzielle, $1,4 \pm 0,2$ -fache Steigerung der Sekretion war für PF4 zu erkennen (**Abb. 14C**).

Zum Vergleich sind auch hier die Positiv-Kontrollen mit Thrombin dargestellt, die eine deutlich erhöhte Freisetzung für CD40L um das $6,6 \pm 1,2$ -fache (**Abb. 14A**), für PDGF um das $4,5 \pm 0,6$ -fache (**Abb. 14B**), für PF4 um das $2,3 \pm 0,3$ -fache (**Abb. 14C**) und für RANTES um das $2,6 \pm 0,3$ -fache (**Abb. 14D**) ergaben (analog zu Abb. 8).

4 Diskussion

Bei einer Parodontitis wird entzündungsbedingt der gesamte Zahnhalteapparat geschädigt [56]. Die Pathogenese der Parodontitis ist nach der heute gängigen Theorie multifaktoriell verursacht: Als Hauptursache gilt eine Dysregulierung des oralen Immunsystems auf eine Ansammlung pathologischer Bakterien an der Zahnoberfläche. Ebenso ist die Virulenz der Keimstämme für den Verlauf der Parodontitis entscheidend [83].

Thrombozyten besitzen eine wichtige Rolle in der primären Hämostase, wobei ihre Fähigkeit zur Aggregation besonders bedeutsam ist [2]. Fehlregulierungen können dabei zu verstärkten Blutungen oder zu thrombotischen Gefäßverschlüssen führen [119, 120]. Zusätzlich haben Thrombozyten aber auch Einfluss auf immunologische Prozesse und sind potenziell an entzündlichen Vorgängen beteiligt [2].

Die Parodontitis wiederum gilt als ein Risikofaktor für die Entstehung einer koronaren Herzerkrankung [92]. Außerdem wurden *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* in thrombotischen Plaques gefunden [121]. Auf der anderen Seite ist bei Parodontitispatienten eine verstärkte Blutung beim Sondieren der Zahnfleischtaschen zu beobachten, welche als Indikator für das Vorhandensein einer Entzündung steht [122] und mit einer beeinträchtigten Funktion von Thrombozyten zusammenhängen könnte.

In einer bisherigen Studie wurde auch ein Einfluss parodontaler Bakterien auf die Integrität von Thrombozyten beschrieben. Jockel- Schneider et al. untersuchten, welche Effekte verschiedene Bakterienstämme von *P.gingivalis* auf die Thrombozytenfunktion ausüben. Hierbei stellte sich heraus, dass alle Bakterienstämme - mit unterschiedlicher Intensität - die Aggregation stimulieren können. Außerdem wurde festgestellt, dass sie eine gesteigerte P-Selektin-Expression sowie die Phosphorylierung von Kinasen aktivierender Signalwege (z.B. PKC) induzieren können [123].

In dieser Arbeit wurde analysiert, welche Wirkungen durch bakterienspezifische Toxine auf Thrombozyten vermittelt werden. Dazu wurden neben LPS von *P.gingivalis*, LTX von *A. actinomycetemcomitans* und C14 von *F.nucleatum* ausgewählt.

Das besondere Augenmerk liegt hierbei auf der Stimulation und Inhibition der Aggregationsfähigkeit sowie der Freisetzung immunologisch wirksamer Substanzen durch die Zugabe der bakterienspezifischen Toxine.

Experimentell wurde initial die Wirkung der einzelnen Toxine auf die Aggregation als eine der wesentlichen physiologischen Funktionen von Thrombozyten untersucht [117]. Als eine wichtige Standardmethode, die auch zur Routinediagnostik zur Abklärung von Thrombozytenfunktionsstörungen verwendet wird, gilt hierbei die Messung der Aggregation mittels Lichttransmission [116]. Um auch schwache Effekte der Toxine zu identifizieren, wurde bei der Dosierung der Induktoren ADP und Kollagen jeweils die individuelle Schwellenwert-Konzentration ermittelt.

Da keine Vorpublikationen vorlagen, wurden für die experimentellen Analysen verschiedene Toxindosierungen in einem breiten Konzentrationsbereich eingesetzt.

Bei meinen initialen Aggregationsstudien mit den Toxinen wurde ersichtlich, dass die untersuchten bakteriellen Substanzen allein keine Induktion der Aggregation *in vitro* im ausgewählten μM -Bereich ausüben. Die Untersuchungen mit threshold-Konzentrationen der beiden klassischen Agonisten ADP und Kollagen ließen schließlich Rückschlüsse auf hemmende oder aktivierende Wirkungen zu, die durch weiterführende Analysen mittels Bestimmung der VASP-Phosphorylierung, der Chemokin-Freisetzung und der P-Selektin-Expression ergänzt wurden. Durch diese Vorgehensweise waren ausschließlich hemmende (*F.nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*) und aktivierende (*P.gingivalis*) Effekte nachweisbar.

Bei den hemmenden Mechanismen spielt die VASP-Phosphorylierung eine grundlegende Rolle, die über die cAMP- und cGMP-abhängigen Signalwege und die Aktivität von PKA und PKG reguliert wird. Mit zunehmender Phosphorylierung, die an Ser¹⁵⁷ und Ser²³⁹ erfolgen kann, setzt eine Thrombozyteninhibition ein. Der GlykoproteinIIb/IIIa-Rezeptor (als Fibrinogenrezeptor), verbleibt auf diese Weise in der nicht-aktiven Form, die Mobilität der Aktinfilamente und die Aggregation werden gehemmt [124].

Bei der Aktivierung von Thrombozyten werden dagegen Granulainhaltsstoffe an die Membranoberfläche transferiert und können dort als Liganden für Thrombozyten-Zellinteraktionen dienen, wie zum Beispiel bei P-Selektin. Zahlreiche, in den Granula gespeicherten Substanzen, wie zum Beispiel CD40, RANTES, PF4, können zudem

aus den Thrombozyten parakrin sezerniert werden und als Chemokine auf umgebende Zielzellen einwirken [125].

LTX war in meinen Experimenten in der Lage, insbesondere die Kollagen-induzierte Aggregation abzuschwächen. Die thrombozytenhemmende Eigenschaft von LTX wurde durch die erhöhte basale VASP-Phosphorylierung in LTX-präinkubierten Thrombozyten bestätigt. Vom Ausmaß handelt es sich auch hierbei um eine submaximale Hemmung, da sich mit 1 μ M PGE1 als potenten AC-Aktivator zweifach höhere Werte der VASP-Phosphorylierung erzielen ließen. Eine Freisetzung von Chemokinen durch LTX war passend zum beobachteten Hemmeffekt nicht nachweisbar.

In früheren Toxizitätsstudien von Balashova et al wurde gezeigt, dass LTX-Konzentration in Bereich von 44 nM bis 176 nM (5 bis 20 μ g/ml) zu einer dosisabhängigen Erythrolyse führen können [126].

Hierbei wird zuerst die Zellgröße vermindert und anschließend das Zellvolumen erhöht, bis die Zelle schließlich aufgelöst wird. Außerdem ist die Interaktion mit dem P₂X-Purinozeptor 7 auf Erythrozyten sowie die Freisetzung von ATP für die Hämolyse mitverantwortlich [127]. Da Thrombozyten zwar in der Aggregation gehemmt werden, aber weiterhin viabel und funktionsfähig bleiben, scheinen Thrombozyten gegenüber LTX robuster als andere Zelltypen zu sein.

Zudem wurde eine verstärkte Freisetzung von P-Selektin bei Thrombozyten von gesunden Probanden nach der Zugabe von Aggregatibacter-Stämmen *in vitro* nachgewiesen [128]. Allerdings wurden hier bakterielle Kulturen direkt verwendet und daher dürfte es sich nicht um reine LTX-abhängige Effekte, sondern um komplexe Mechanismen handeln. Beispielsweise wird von gramnegativen Bakterien das cytolethal distending toxin (Cdt) produziert [129]. Hier ist unter anderem bekannt, dass das Cdt von *A. actinomycetemcomitans* die Zahnfleischepithelschicht beschädigen kann [130]. Welchen Effekt dieses Toxin speziell auf die Thrombozyten vermittelt, ist aber unklar. Gleiches gilt für die Studie von Laky et al [131], die nach Inkubation mit parodontalen Pathogenen eine Verminderung der VASP-Phosphorylierung gezeigt hatten. Eine Rolle bei der Toxin-abhängigen Reaktion könnten TLR spielen, die auch auf der Thrombozytenoberfläche vorhanden sind [132]. *A. actinomycetemcomitans* hat in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293) gleichermaßen Einfluss auf TLR2 und TLR4 [133]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Freisetzung von Chemokinen aus Makrophagen via TLR2 und TLR4 stattfindet und abhängig von den Dosierungen der

Bakterien(-bestandteile) und des Infektionszeitraums ist [134]. Weitere beeinflussende Faktoren sind die Kultivierungsbedingungen und die Art der Bakterienstämme [87].

Analog zu LTX verursachte auch C14 in meinen Versuchen eine Hemmung der Kollagen-induzierten Schwellenwert-Aggregation. Eine ebenso nachgewiesene Steigerung der VASP-Phosphorylierung unterstreicht zusätzlich den inhibitorischen Effekt des Toxins auf die Thrombozyten. Wie bei LTX handelt es sich hierbei um eine partielle, eher schwache Hemmung. Auch eine induzierte Freisetzung der Chemokine war nicht nachweisbar.

Es ist bekannt, dass das Vorhandensein von *F.nucleatum* als ein Auslöser für eine gingivale Entzündung gilt, welche eine Sekretion von Sulkusfluid und damit eine Nahrungsquelle für andere parodontale Bakterien bewirkt [135] und für die Ko-Aggregation anderer Bakterienstämme verantwortlich ist [136]. Eine entscheidende Rolle spielen bakterielle Oberflächenmoleküle (Fap2), durch die eine Zelladhäsion vermittelt wird [137].

Außerdem besitzt das Bakterium die Fähigkeit zur Adhäsion an andere Zellen wie Makrophagen, Lymphozyten und Fibroblasten. Bei allen Zelltypen ist das gleiche Galaktose-bindende Adhäsine als Schlüsselmolekül verantwortlich [138]. Zudem wurden Auswirkungen auf Erythrozyten beobachtet. 1980 untersuchten Dehazya und Coles die durch *F.nucleatum* verursachte Hämoagglutination unter verschiedenen Bedingungen [139]. Ebenso wie bei den obengenannten Zellarten spielten auch hierbei Hämagglutinine, die zu der Gruppe der Adhäsine zählen, eine entscheidende Rolle [139, 140].

Falkner et al. zeigten dagegen eine Hämolyse durch die Zugabe des Bakteriums [141]. Hier sind Bakterien-Erythrozytenbindungsstellen wahrscheinlich, die auf der Zelloberfläche sowie bei LPS-Extrakten gefunden wurden [140, 142]. Inwieweit sich LTX spezifisch an Thrombozyten binden kann, ist bisher ungeklärt.

Es wurden allerdings andere Pathomechanismen beschrieben, die eine Beeinflussung hämostatischer Prozesse erklären könnten. So ist die Entstehung eines Lemierre-Syndroms mit thrombophlebitischen Ereignissen zwar meistens auf eine Infektion mit dem *Fusobakterium necrophorum* (*F. necrophorum*) zurückzuführen, jedoch sind auch Fälle im Zusammenhang mit einer *F.nucleatum*-Infektion bekannt [143]. *F. necrophorum* bindet an das hochmolekulare Kininogen, welches ein Kofaktor für den Gerinnungsfaktor XI ist. Damit wird eine Aktivierung der intrinsischen Hämostase bewirkt [144].

Das LPS von *F.nucleatum* hat außerdem eine hohe Affinität zu TLR4 [145], dessen Stimulation eine Thrombozytenaktivierung auslösen kann [146]. Außerdem ist eine Stimulation von leukozytären TLR2 durch das Bakterium möglich [134].

LPS von *P.gingivalis* konnte in meinen Experimenten die ADP- oder Kollagen-induzierte Schwellenwert nicht wesentlich verändern. In früheren Studien wurde festgestellt, dass *P.gingivalis* sowohl auf Erythrozyten [147] als auch auf Thrombozyten einwirken kann [148, 149]. Das Bakterium hat die Fähigkeit eine Hämagglutination zu induzieren, wobei *P.gingivalis* mindestens fünf hämagglutinierende Moleküle produziert [150].

Bereits Assinger et al. beschrieben eine Korrelation der löslichen P-Selektin-Plasmaspiegel mit der Schwere der Parodontitis-Erkrankung [128]. *In vitro* lösten 1×10^8 /ml Keime von *P.gingivalis* eine gesteigerte CD62P-Freisetzung im PRP aus. Jedoch konnte keine gesteigerte P-Selektin-Expression auf der Thrombozytenoberfläche von Parodontitispatienten gefunden werden. Diese könnte *in vivo* z.B. durch Endothelzellen und Leukozyten auf komplexe Weise, und nicht nur durch LPS, reguliert werden.

Experimentell war in dieser Arbeit nachweisbar, dass durch eine Zugabe von LPS die CD62P-Expression bei Thrombin-kostimulierten Thrombozyten im Sinne einer leichten Thrombozytenaktivierung verstärkt wird, wodurch thrombotische Mechanismen oder Interaktionen der Thrombozyten mit anderen Blutzellen ausgelöst werden könnten. Passend zu diesem Befund wurde in früheren Studien eine verminderte VASP-Phosphorylierung bei PGE-stimulierten Thrombozyten durch die Zugabe von *P.gingivalis*-Stämmen festgestellt [131].

LPS bewirkte auch die submaximale Freisetzung von CD40L, PF4 und RANTES als physiologisch bedeutsame Chemokine. Wie *F.nucleatum* kann *P.gingivalis* in humanen parodontalen Ligamentzellen sowohl TLR2 als auch TLR4 aktivieren und eine Chemokinfreisetzung stimulieren [151].

Li et al. wiesen nach, dass die Entstehung einer Arteriosklerose über einen TLR-vermittelten Weg möglich ist [152]. Eine Thrombozytenaktivierung kann ebenfalls durch TLR2 und TLR4 stimuliert werden [146]. Weitere Studien müssten klären, ob LPS von *P.gingivalis* ebenfalls über thrombozytäre TLR Effekte induzieren kann.

Außerdem wurde nachgewiesen, dass LPS über die Aktivierung der Rho GTPase Cdc42 einen stimulierenden Effekt auf Thrombozyten hat [153].

4.1 Limitationen

Für die Analysen wurden ausgewählte Konzentrationen der bakteriellen Substanzen eingesetzt, um Effekte auf die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten zu überprüfen. Über die klinische Relevanz der erzielten Ergebnisse kann zwar keine generelle Aussage gemacht werden, da es sich nur um einen Aspekt in einem komplexen Pathomechanismus der Parodontitis handelt. Die Bedeutung der Toxine für die Thrombozytenfunktion lässt sich aber einordnen: Durch die Analysen konnten den bakteriellen Substanzen jeweils hemmende (LTX, C14) bzw. aktivierende (LPS) Wirkungen zugeschrieben werden. Im nächsten Schritt ist es erforderlich, umfassende Dosis-Wirkungs-Studien durchzuführen, um die mögliche pathophysiologische Bedeutung noch besser einordnen zu können. Von Interesse wäre es deshalb auch, welche Konzentrationen der Substanzen *in vivo* im Bereich des entzündlich veränderten Gewebes erreicht werden. Es stellt sich insbesondere die Frage, ob *in vivo* lokal auch Konzentrationen im μM -Bereich erreicht werden können. Dabei ist zudem zu berücksichtigen, dass *in vivo* sicherlich mehrere bakterielle Substanzen gleichzeitig vorhanden sind, die auf Thrombozyten parallel einwirken. Hier in der Arbeit wurden allerdings nur isolierte Toxinwirkungen geprüft. Die kombinatorische Wirkung muss in weiteren Studien näher untersucht werden.

Außerdem war der Fokus dieser Arbeit auf essenzielle thrombozytäre Systeme gerichtet. Eine Untersuchung weiterer Systeme ist deshalb erforderlich: Interessant sind hier zum Beispiel die TLR-Signalwege und die CD62P-abhängige Interaktion von Thrombozyten mit anderen Zellen wie zum Beispiel Leukozyten, über die sowohl hämostatische als auch immunologische Effekte von Thrombozyten vermittelt werden [17]. Des Weiteren wurde die Aggregation der Thrombozyten *in vitro* untersucht. In welchem Ausmaß die Adhäsionsfähigkeit an Gefäßoberflächen beeinflusst wird, muss zunächst in weiteren Versuchsreihen, z.B. durch Flusskammer-Experimente, geklärt werden.

Es wurde bereits gezeigt, dass thrombozytenhemmende Medikamente Einfluss auf die Entstehung einer Parodontitis bei Ratten haben [154]. Da in dieser Arbeit Thrombozyten von gesunden Personen verwendet wurden, kann keine Aussage über Thrombozyten getroffen werden, die bereits durch Medikamente in ihrer Funktion gehemmt sind. So stellt sich die Frage, inwieweit eine pharmakologische Aggregationshemmung (z.B. durch Acetylsalicylsäure) durch Bakterientoxine beeinflusst werden kann.

4.2 Ausblick

Um mögliche therapeutische Angriffspunkte zu ermitteln, wäre es von Bedeutung, die für die Signalweiterleitung verantwortlichen Rezeptoren (z.B. TLR) und beteiligte Signalweiterleitungskaskaden zu identifizieren.

Eine Rolle zur Verbesserung oder Verschlechterung des Krankheitsgeschehens bei Parodontitis könnten auch thrombozytenhemmende Medikamente (z.B. Acetylsalicylsäure) spielen. Bei Infektionen vermehrt mit *A. actinomycetemcomitans* oder *F. nucleatum* wäre darunter mit einer erhöhten oralen Blutungsneigung zu rechnen und daher nicht empfehlenswert. Bei einer ausschließlichen Infektion zum Beispiel mit *P.gingivalis* könnte es sich dagegen um einen therapeutischen Ansatz handeln, um mikrothrombotischen gingivalen Komplikationen entgegenzusteuern. Dieser denkbare Zusammenhang müsste aber zunächst in klinischen Studien geprüft werden.

Über die gezeigten Ergebnisse hinaus ist zu bedenken, dass orale Bakterien nicht nur zur Pathogenese der Parodontitis beitragen können, sondern auch zu kurzfristigen Bakteriämien, z.B. bei parodontalen Behandlungen, führen können. Welche Effekte dadurch systemisch oder in Gefäßen durch Interaktionen mit Thrombozyten initiiert werden, bleibt ebenfalls Gegenstand weiterer Untersuchungen. Bekanntermaßen können Bakteriämien z.B. bei Herzklappenerkrankungen zu schwerwiegenden Komplikationen führen. Dabei wäre auch zu klären, welche Rolle eine Antibiose bei der Therapie der Parodontitis spielen könnte.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit untersuchte die Wirkung von bakteriellen Substanzen auf essenzielle thrombozytäre Funktionen. Bei den Substanzen handelte es sich um Toxine von Bakterien, die mutmaßlich zur Pathogenese der Parodontitis beitragen.

Während LTX von Bakterium *A. actinomycetemcomitans* und C14 von *F. nucleatum* zur Hemmung der Aggregation und zur Stimulation inhibitorischer Systeme beiträgt, induziert LPS von *P. gingivalis* eine leichte Aktivierung der Thrombozyten, gekennzeichnet durch eine gering verstärkte P-Selektin-Expression (**Abb. 15**).

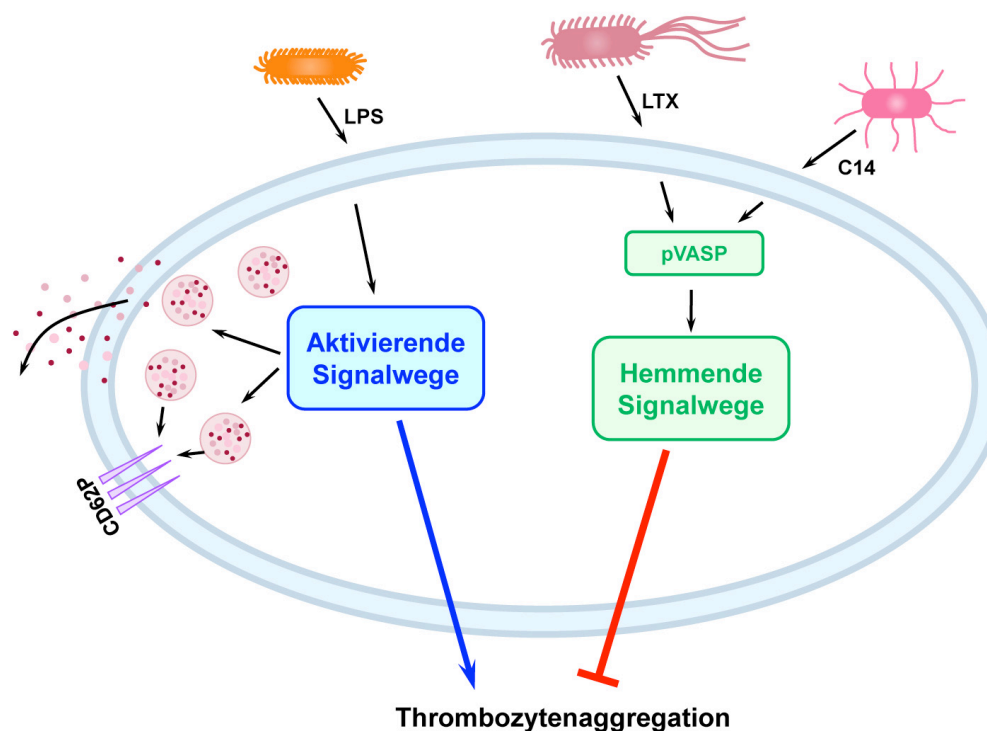


Abb. 15: Wirkung der untersuchten Substanzen auf die Thrombozytenfunktion.
mit freundlicher Genehmigung von Frau Priv.-Doz. Dr. Anna Kobsar

Die untersuchten bakteriellen Substanzen können außerdem Auswirkung auf weitere regulatorische Systeme in Thrombozyten (beispielsweise TLR-assoziierte Signalwege oder CD2P-abhängige Thrombozyten-Zell-Interaktionen) haben und auf diese Weise den klinischen Verlauf einer Parodontitis potenziell beeinflussen. Die Untersuchung dieser weiteren thrombozytären Systeme sind erforderlich, um die pathophysiologische Bedeutung der Ergebnisse weiter einordnen zu können.

6 Literaturverzeichnis

- [1] C. N. Jenne, R. Urrutia, and P. Kubes, "Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity," (in eng), *Int J Lab Hematol*, vol. 35, no. 3, pp. 254-61, Jun 2013, doi: 10.1111/ijlh.12084.
- [2] M. Holinstat, "Normal platelet function," (in eng), *Cancer Metastasis Rev*, vol. 36, no. 2, pp. 195-198, Jun 2017, doi: 10.1007/s10555-017-9677-x.
- [3] J. M. Herter, J. Rossaint, and A. Zarbock, "Platelets in inflammation and immunity," (in eng), *J Thromb Haemost*, vol. 12, no. 11, pp. 1764-75, Nov 2014, doi: 10.1111/jth.12730.
- [4] S. P. Kunapuli, R. T. Dorsam, S. Kim, and T. M. Quinton, "Platelet purinergic receptors," (in eng), *Curr Opin Pharmacol*, vol. 3, no. 2, pp. 175-80, Apr 2003, doi: 10.1016/s1471-4892(03)00007-9.
- [5] K. Jurk and B. E. Kehrel, "Platelets: physiology and biochemistry," (in eng), *Semin Thromb Hemost*, vol. 31, no. 4, pp. 381-92, 2005, doi: 10.1055/s-2005-916671.
- [6] F. W. Leebeek and J. C. Eikenboom, "Von Willebrand's Disease," (in eng), *N Engl J Med*, vol. 375, no. 21, pp. 2067-2080, Nov 24 2016, doi: 10.1056/NEJMra1601561.
- [7] B. Kehrel, "Platelet-collagen interactions," (in eng), *Semin Thromb Hemost*, vol. 21, no. 2, pp. 123-9, 1995, doi: 10.1055/s-2007-1000386.
- [8] C. Gachet, "Platelet activation by ADP: the role of ADP antagonists," (in eng), *Ann Med*, vol. 32 Suppl 1, pp. 15-20, Dec 2000.
- [9] C. Gachet, "ADP receptors of platelets and their inhibition," (in eng), *Thromb Haemost*, vol. 86, no. 1, pp. 222-32, Jul 2001.
- [10] J. E. Fabre *et al.*, "Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice," (in eng), *Nat Med*, vol. 5, no. 10, pp. 1199-202, Oct 1999, doi: 10.1038/13522.
- [11] W. S. Nesbitt, S. Giuliano, S. Kulkarni, S. M. Dopheide, I. S. Harper, and S. P. Jackson, "Intercellular calcium communication regulates platelet aggregation and thrombus growth," (in eng), *J Cell Biol*, vol. 160, no. 7, pp. 1151-61, Mar 31 2003, doi: 10.1083/jcb.200207119.
- [12] C. A. Brennan and W. S. Garrett, "Fusobacterium nucleatum - symbiont, opportunist and oncobacterium," (in eng), *Nat Rev Microbiol*, vol. 17, no. 3, pp. 156-166, Mar 2019, doi: 10.1038/s41579-018-0129-6.
- [13] B. L. Mealey and G. L. Ocampo, "Diabetes mellitus and periodontal disease," (in eng), *Periodontol 2000*, vol. 44, pp. 127-53, 2007, doi: 10.1111/j.1600-0757.2006.00193.x.
- [14] H. A. Johnston-Cox and K. Ravid, "Adenosine and blood platelets," (in eng), *Purinergic Signal*, vol. 7, no. 3, pp. 357-65, Sep 2011, doi: 10.1007/s11302-011-9220-4.
- [15] D. Rucker and A. S. Dhamoon, "Physiology, Thromboxane A2," in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC., 2022.
- [16] T. J. Stocker, H. Ishikawa-Ankerhold, S. Massberg, and C. Schulz, "Small but mighty: Platelets as central effectors of host defense," (in eng), *Thromb Haemost*, vol. 117, no. 4, pp. 651-661, Apr 3 2017, doi: 10.1160/th16-12-0921.
- [17] F. Cognasse *et al.*, "The Inflammatory Role of Platelets via Their TLRs and Siglec Receptors," (in eng), *Front Immunol*, vol. 6, p. 83, 2015, doi: 10.3389/fimmu.2015.00083.
- [18] A. L. Ståhl *et al.*, "Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic Escherichia coli binds to platelets through TLR4 and CD62 and is detected on circulating

- platelets in patients with hemolytic uremic syndrome," (in eng), *Blood*, vol. 108, no. 1, pp. 167-76, Jul 1 2006, doi: 10.1182/blood-2005-08-3219.
- [19] A. Assinger *et al.*, "Efficient phagocytosis of periodontopathogens by neutrophils requires plasma factors, platelets and TLR2," (in eng), *J Thromb Haemost*, vol. 9, no. 4, pp. 799-809, Apr 2011, doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04193.x.
- [20] T. Youssefian, A. Drouin, J. M. Massé, J. Guichard, and E. M. Cramer, "Host defense role of platelets: engulfment of HIV and Staphylococcus aureus occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation," (in eng), *Blood*, vol. 99, no. 11, pp. 4021-9, Jun 1 2002, doi: 10.1182/blood-2001-12-0191.
- [21] A. H. Riaz, B. E. Tasma, M. E. Woodman, R. M. Wooten, and R. G. Worth, "Human platelets efficiently kill IgG-opsonized E. coli," (in eng), *FEMS Immunol Med Microbiol*, vol. 65, no. 1, pp. 78-83, Jun 2012, doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00945.x.
- [22] A. Johnsson, C. H. Heldin, B. Westermark, and A. Wasteson, "Platelet-derived growth factor: identification of constituent polypeptide chains," (in eng), *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 104, no. 1, pp. 66-74, Jan 15 1982, doi: 10.1016/0006-291x(82)91941-6.
- [23] J. C. Bonner and A. R. Osornio-Vargas, "Differential binding and regulation of platelet-derived growth factor A and B chain isoforms by alpha 2-macroglobulin," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 270, no. 27, pp. 16236-42, Jul 7 1995, doi: 10.1074/jbc.270.27.16236.
- [24] D. R. Kaplan, F. C. Chao, C. D. Stiles, H. N. Antoniades, and C. D. Scher, "Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts," (in eng), *Blood*, vol. 53, no. 6, pp. 1043-52, Jun 1979. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120820114>.
- [25] N. Kohler and A. Lipton, "Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity," (in eng), *Exp Cell Res*, vol. 87, no. 2, pp. 297-301, Aug 1974, doi: 10.1016/0014-4827(74)90484-4.
- [26] R. Ross, J. Glomset, B. Kariya, and L. Harker, "A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 71, no. 4, pp. 1207-10, Apr 1974, doi: 10.1073/pnas.71.4.1207.
- [27] M. K. Bach, J. R. Brashler, B. K. Stout, H. G. Johnson, and M. E. Sanders, "Platelet-derived growth factor can activate purified primate, phorbol myristate acetate-primed eosinophils," (in eng), *Int Arch Allergy Appl Immunol*, vol. 94, no. 1-4, pp. 167-8, 1991, doi: 10.1159/000235352.
- [28] F. S. Vassbotn, O. K. Havnen, C. H. Heldin, and H. Holmsen, "Negative feedback regulation of human platelets via autocrine activation of the platelet-derived growth factor alpha-receptor," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 269, no. 19, pp. 13874-9, May 13 1994. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925817367285?via%3Dihub>.
- [29] J. W. Semple, J. E. Italiano, Jr., and J. Freedman, "Platelets and the immune continuum," (in eng), *Nat Rev Immunol*, vol. 11, no. 4, pp. 264-74, Apr 2011, doi: 10.1038/nri2956.
- [30] B. D. Elzey, T. L. Ratliff, J. M. Sowa, and S. A. Crist, "Platelet CD40L at the interface of adaptive immunity," (in eng), *Thrombosis research*, vol. 127, no. 3, pp. 180-3, Mar 2011, doi: 10.1016/j.thromres.2010.10.011.
- [31] I. S. Grewal and R. A. Flavell, "CD40 and CD154 in cell-mediated immunity," (in eng), *Annu Rev Immunol*, vol. 16, pp. 111-35, 1998, doi: 10.1146/annurev.immunol.16.1.111.

- [32] M. H. Klinger, "Platelets and inflammation," (in eng), *Anat Embryol (Berl)*, vol. 196, no. 1, pp. 1-11, Jul 1997, doi: 10.1007/s004290050075.
- [33] T. F. Deuel, P. S. Keim, M. Farmer, and R. L. Heinrikson, "Amino acid sequence of human platelet factor 4," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 74, no. 6, pp. 2256-8, Jun 1977, doi: 10.1073/pnas.74.6.2256.
- [34] A. Bikfalvi, "Platelet factor 4: an inhibitor of angiogenesis," (in eng), *Semin Thromb Hemost*, vol. 30, no. 3, pp. 379-85, Jun 2004, doi: 10.1055/s-2004-831051.
- [35] J. A. Marcum, J. B. McKenney, and R. D. Rosenberg, "Acceleration of thrombin-antithrombin complex formation in rat hindquarters via heparinlike molecules bound to the endothelium," (in eng), *J Clin Invest*, vol. 74, no. 2, pp. 341-50, Aug 1984, doi: 10.1172/jci111429.
- [36] M. A. Kowalska, L. Rauova, and M. Poncz, "Role of the platelet chemokine platelet factor 4 (PF4) in hemostasis and thrombosis," (in eng), *Thrombosis research*, vol. 125, no. 4, pp. 292-6, Apr 2010, doi: 10.1016/j.thromres.2009.11.023.
- [37] B. Scheuerer *et al.*, "The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages," (in eng), *Blood*, vol. 95, no. 4, pp. 1158-66, Feb 15 2000. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120670586?via%3DiHub>.
- [38] A. Zlotnik and O. Yoshie, "Chemokines: a new classification system and their role in immunity," (in eng), *Immunity*, vol. 12, no. 2, pp. 121-7, Feb 2000, doi: 10.1016/s1074-7613(00)80165-x.
- [39] P. von Hundelshausen *et al.*, "RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium," (in eng), *Circulation*, vol. 103, no. 13, pp. 1772-7, Apr 3 2001, doi: 10.1161/01.cir.103.13.1772.
- [40] D. Sibbing and C. Schulz, "Platelet CCL5 links acute coronary syndrome and vascular inflammation," (in eng), *Thromb Haemost*, vol. 112, no. 6, p. 1079, Dec 2014, doi: 10.1160/th14-11-0910.
- [41] V. Syrovatkina, K. O. Alegre, R. Dey, and X. Y. Huang, "Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins," (in eng), *J Mol Biol*, vol. 428, no. 19, pp. 3850-68, Sep 25 2016, doi: 10.1016/j.jmb.2016.08.002.
- [42] S. M. Khan *et al.*, "The expanding roles of G $\beta\gamma$ subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action," (in eng), *Pharmacol Rev*, vol. 65, no. 2, pp. 545-77, Apr 2013, doi: 10.1124/pr.111.005603.
- [43] A. P. Bye, A. J. Unsworth, and J. M. Gibbins, "Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks," (in eng), *J Thromb Haemost*, vol. 14, no. 5, pp. 918-30, May 2016, doi: 10.1111/jth.13302.
- [44] J. Huang *et al.*, "Molecular Proteomics and Signalling of Human Platelets in Health and Disease," (in eng), *International journal of molecular sciences*, vol. 22, no. 18, Sep 13 2021, doi: 10.3390/ijms22189860.
- [45] A. Smolenski, "Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets," (in eng), *J Thromb Haemost*, vol. 10, no. 2, pp. 167-76, Feb 2012, doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04576.x.
- [46] R. Waldmann, M. Nieberding, and U. Walter, "Vasodilator-stimulated protein phosphorylation in platelets is mediated by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases," (in eng), *Eur J Biochem*, vol. 167, no. 3, pp. 441-8, Sep 15 1987, doi: 10.1111/j.1432-1033.1987.tb13357.x.
- [47] C. Haffner, T. Jarchau, M. Reinhard, J. Hoppe, S. M. Lohmann, and U. Walter, "Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP," (in eng),

- Embo j*, vol. 14, no. 1, pp. 19-27, Jan 3 1995. [Online]. Available: <https://www.embopress.org/doi/abs/10.1002/j.1460-2075.1995.tb06971.x?sid.nlm%3Apubmed>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC398048/pdf/emboj00025-0029.pdf>.
- [48] M. Eigenthaler, C. Nolte, M. Halbrügge, and U. Walter, "Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets. Estimating the rate of cAMP-regulated and cGMP-regulated protein phosphorylation in intact cells," (in eng), *Eur J Biochem*, vol. 205, no. 2, pp. 471-81, Apr 15 1992, doi: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb16803.x.
- [49] J. K. Wentworth, G. Pula, and A. W. Poole, "Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is phosphorylated on Ser157 by protein kinase C-dependent and -independent mechanisms in thrombin-stimulated human platelets," (in eng), *Biochem J*, vol. 393, no. Pt 2, pp. 555-64, Jan 15 2006, doi: 10.1042/bj20050796.
- [50] K. Horstrup, B. Jablonka, P. Hönl-Liedl, M. Just, K. Kochsiek, and U. Walter, "Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition," (in eng), *Eur J Biochem*, vol. 225, no. 1, pp. 21-7, Oct 1 1994, doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.00021.x.
- [51] B. Harbeck, S. Hüttelmaier, K. Schluter, B. M. Jockusch, and S. Illenberger, "Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 275, no. 40, pp. 30817-25, Oct 6 2000, doi: 10.1074/jbc.M005066200.
- [52] T. Sudo, H. Ito, and Y. Kimura, "Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) by the anti-platelet drug, cilostazol, in platelets," (in eng), *Platelets*, vol. 14, no. 6, pp. 381-90, Sep 2003, doi: 10.1080/09537100310001598819.
- [53] A. J. Marcus *et al.*, "The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39," (in eng), *J Clin Invest*, vol. 99, no. 6, pp. 1351-60, Mar 15 1997, doi: 10.1172/jci119294.
- [54] V. Baelum and R. López, "Periodontal disease epidemiology - learned and unlearned?," (in eng), *Periodontol 2000*, vol. 62, no. 1, pp. 37-58, Jun 2013, doi: 10.1111/j.1600-0757.2012.00449.x.
- [55] R. C. Page, S. Offenbacher, H. E. Schroeder, G. J. Seymour, and K. S. Kornman, "Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions," (in eng), *Periodontol 2000*, vol. 14, pp. 216-48, Jun 1997, doi: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00199.x.
- [56] B. Dannewitz, B. Holtfreter, and P. Eickholz, "[Periodontitis-therapy of a widespread disease]," (in ger), *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, vol. 64, no. 8, pp. 931-940, Aug 2021, doi: 10.1007/s00103-021-03373-2. Parodontitis – Therapie einer Volkskrankheit.
- [57] D. Locker, G. D. Slade, and H. Murray, "Epidemiology of periodontal disease among older adults: a review," (in eng), *Periodontol 2000*, vol. 16, pp. 16-33, Feb 1998, doi: 10.1111/j.1600-0757.1998.tb00113.x.
- [58] J. E. Botero, C. K. Rösing, A. Duque, A. Jaramillo, and A. Contreras, "Periodontal disease in children and adolescents of Latin America," (in eng), *Periodontol 2000*, vol. 67, no. 1, pp. 34-57, Feb 2015, doi: 10.1111/prd.12072.
- [59] K. B.-K. d. ö. Rechts; and B.-A. d. D. Z. e. V. (BZÄK), "5. Mundgesundheitsstudie (DMS V)- Kurzfassung," Institut der Deutschen

- Zahnärzte im Auftrag von Bundeszahnärztekammer und Kassenärztlicher Bundesvereinigung 2016.
- [60] H. Loe, E. Theilade, and S. B. Jensen, "EXPERIMENTAL GINGIVITIS IN MAN," (in eng), *Journal of periodontology*, vol. 36, pp. 177-87, May-Jun 1965, doi: 10.1902/jop.1965.36.3.177.
- [61] M. C. Brex, I. Fröhlicher, P. Gehr, and N. P. Lang, "Stereological observations on long-term experimental gingivitis in man," (in eng), *Journal of clinical periodontology*, vol. 15, no. 10, pp. 621-7, Nov 1988, doi: 10.1111/j.1600-051x.1988.tb02262.x.
- [62] H. Loe, A. Anerud, H. Boysen, and E. Morrison, "Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age," (in eng), *Journal of clinical periodontology*, vol. 13, no. 5, pp. 431-45, May 1986, doi: 10.1111/j.1600-051x.1986.tb01487.x.
- [63] J. Slots, "Subgingival microflora and periodontal disease," (in eng), *Journal of clinical periodontology*, vol. 6, no. 5, pp. 351-82, Oct 1979, doi: 10.1111/j.1600-051x.1979.tb01935.x.
- [64] S. S. Socransky, A. D. Haffajee, M. A. Cugini, C. Smith, and R. L. Kent, Jr., "Microbial complexes in subgingival plaque," (in eng), *Journal of clinical periodontology*, vol. 25, no. 2, pp. 134-44, Feb 1998, doi: 10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x.
- [65] P. E. Kolenbrander, "Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems," (in eng), *Annu Rev Microbiol*, vol. 54, pp. 413-37, 2000, doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.413.
- [66] B. Signat, C. Roques, P. Poulet, and D. Duffaut, "Fusobacterium nucleatum in periodontal health and disease," (in eng), *Curr Issues Mol Biol*, vol. 13, no. 2, pp. 25-36, 2011.
- [67] J. Mysak *et al.*, "Porphyromonas gingivalis: major periodontopathic pathogen overview," (in eng), *J Immunol Res*, vol. 2014, p. 476068, 2014, doi: 10.1155/2014/476068.
- [68] J. R. Gonzales, S. Groeger, A. Johansson, and J. Meyle, "T helper cells from aggressive periodontitis patients produce higher levels of interleukin-1 beta and interleukin-6 in interaction with Porphyromonas gingivalis," (in eng), *Clinical oral investigations*, vol. 18, no. 7, pp. 1835-43, Sep 2014, doi: 10.1007/s00784-013-1162-5.
- [69] G. Hajishengallis, "Immune evasion strategies of Porphyromonas gingivalis," (in eng), *J Oral Biosci*, vol. 53, no. 3, pp. 233-240, 2011, doi: 10.2330/joralbiosci.53.233.
- [70] L. G. Henry, R. M. McKenzie, A. Robles, and H. M. Fletcher, "Oxidative stress resistance in Porphyromonas gingivalis," (in eng), *Future Microbiol*, vol. 7, no. 4, pp. 497-512, Apr 2012, doi: 10.2217/fmb.12.17.
- [71] B. Henderson, J. M. Ward, and D. Ready, "Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans: a triple A* periodontopathogen?," (in eng), *Periodontol 2000*, vol. 54, no. 1, pp. 78-105, Oct 2010, doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00331.x.
- [72] D. F. Mangan, N. S. Taichman, E. T. Lally, and S. M. Wahl, "Lethal effects of Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin on human T lymphocytes," (in eng), *Infection and immunity*, vol. 59, no. 9, pp. 3267-72, Sep 1991, doi: 10.1128/iai.59.9.3267-3272.1991.
- [73] V. Venketaraman, A. K. Lin, A. Le, S. C. Kachlany, N. D. Connell, and J. B. Kaplan, "Both leukotoxin and poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide protect Aggregatibacter actinomycetemcomitans cells from macrophage killing," (in eng), *Microbial pathogenesis*, vol. 45, no. 3, pp. 173-80, Sep 2008, doi: 10.1016/j.micpath.2008.05.007.

- [74] A. Johansson, G. Sandström, R. Claesson, L. Hänström, and S. Kalfas, "Anaerobic neutrophil-dependent killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in relation to the bacterial leukotoxicity," (in eng), *Eur J Oral Sci*, vol. 108, no. 2, pp. 136-46, Apr 2000, doi: 10.1034/j.1600-0722.2000.00790.x.
- [75] P. Kelk, A. Johansson, R. Claesson, L. Hänström, and S. Kalfas, "Caspase 1 involvement in human monocyte lysis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin," (in eng), *Infection and immunity*, vol. 71, no. 8, pp. 4448-55, Aug 2003, doi: 10.1128/iai.71.8.4448-4455.2003.
- [76] T. Beikler, K. Prior, B. Ehmke, and T. F. Flemmig, "Specific antibiotics in the treatment of periodontitis--a proposed strategy," (in eng), *Journal of periodontology*, vol. 75, no. 1, pp. 169-75, Jan 2004, doi: 10.1902/jop.2004.75.1.169.
- [77] J. Slots, L. J. Emrich, R. J. Genco, and B. G. Rosling, "Relationship between some subgingival bacteria and periodontal pocket depth and gain or loss of periodontal attachment after treatment of adult periodontitis," (in eng), *Journal of clinical periodontology*, vol. 12, no. 7, pp. 540-52, Aug 1985, doi: 10.1111/j.1600-051x.1985.tb01388.x.
- [78] D. C. Peruzzo *et al.*, "Chronic stress may modulate periodontal disease: a study in rats," (in eng), *Journal of periodontology*, vol. 79, no. 4, pp. 697-704, Apr 2008, doi: 10.1902/jop.2008.070369.
- [79] S. Grossi, "Smoking and stress: common denominators for periodontal disease, heart disease, and diabetes mellitus," (in eng), *Compend Contin Educ Dent Suppl*, no. 30, pp. 31-9; quiz 66, 2000.
- [80] K. M. Dommisch H, Jepsen S. . "Allgemeine Gesundheit und Parodontitis." (accessed).
- [81] R. M. Palmer, R. F. Wilson, A. S. Hasan, and D. A. Scott, "Mechanisms of action of environmental factors--tobacco smoking," (in eng), *Journal of clinical periodontology*, vol. 32 Suppl 6, pp. 180-95, 2005, doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00786.x.
- [82] P. D. Marsh, "Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease," (in eng), *Adv Dent Res*, vol. 8, no. 2, pp. 263-71, Jul 1994, doi: 10.1177/08959374940080022001.
- [83] J. L. Ebersole *et al.*, "The periodontal war: microbes and immunity," (in eng), *Periodontol 2000*, vol. 75, no. 1, pp. 52-115, Oct 2017, doi: 10.1111/prd.12222.
- [84] R. P. Darveau, "Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis," (in eng), *Nat Rev Microbiol*, vol. 8, no. 7, pp. 481-90, Jul 2010, doi: 10.1038/nrmicro2337.
- [85] Schlagenhauf, "Eine neue Sicht der Dinge- Die Rolle der Bakterien in der Ätiologie parodontaler Erkrankungen " *Zahnärzteblatt*, 03/ 2014.
- [86] J. Meyle and I. Chapple, "Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis," (in eng), *Periodontol 2000*, vol. 69, no. 1, pp. 7-17, Oct 2015, doi: 10.1111/prd.12104.
- [87] A. Fujita, Y. Oogai, M. Kawada-Matsuo, M. Nakata, K. Noguchi, and H. Komatsuzawa, "Expression of virulence factors under different environmental conditions in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*," (in eng), *Microbiol Immunol*, vol. 65, no. 3, pp. 101-114, Mar 2021, doi: 10.1111/1348-0421.12864.
- [88] D. W. Bengel, "Deutsche Gesellschaft für Parodontologie stellt vor: PSI - Der Parodontale Screening Index," in *zm online* vol. 2002- 20, ed: <https://www.zm-online.de/archiv/2002/20/zahnmedizin/psi-der-parodontale-screening-index/>, 2002.
- [89] J. G. Caton *et al.*, "A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999

- classification," (in eng), *Journal of clinical periodontology*, vol. 45 Suppl 20, pp. S1-s8, Jun 2018, doi: 10.1111/jcpe.12935.
- [90] M. S. Tonetti, H. Greenwell, and K. S. Kornman, "Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition," (in eng), *Journal of periodontology*, vol. 89 Suppl 1, pp. S159-s172, Jun 2018, doi: 10.1002/jper.18-0006.
- [91] P. D. M. K. D. PARO) *et al.* S3-Leitlinie (Langversion), Die Behandlung von Parodontitis Stadium I bis III, Die deutsche Implementierung der S3-Leitlinie, „Treatment of Stage I–III Periodontitis“ der European Federation of Periodontology (EFP) [Online] Available: https://www.apw.de/documents/10165/1373255/LL_083-043_S3_Parodontitistherapie_I-III_lang.2_2020.pdf/95c143e6-792c-452d-a956-54eebf2b15eb
- [92] T. Dietrich, P. Sharma, C. Walter, P. Weston, and J. Beck, "The epidemiological evidence behind the association between periodontitis and incident atherosclerotic cardiovascular disease," (in eng), *Journal of clinical periodontology*, vol. 40 Suppl 14, pp. S70-84, Apr 2013, doi: 10.1111/jcpe.12062.
- [93] A. M. Monteiro *et al.*, "Cardiovascular disease parameters in periodontitis," (in eng), *Journal of periodontology*, vol. 80, no. 3, pp. 378-88, Mar 2009, doi: 10.1902/jop.2009.080431.
- [94] M. Martinez-Herrera *et al.*, "Chronic periodontitis impairs polymorphonuclear leucocyte-endothelium cell interactions and oxidative stress in humans," (in eng), *Journal of clinical periodontology*, vol. 45, no. 12, pp. 1429-1439, Dec 2018, doi: 10.1111/jcpe.13027.
- [95] G. Ustaoglu, E. Erdal, and M. İnanır, "Does periodontitis affect mean platelet volume(MPV) and plateletcrit (PCT) levels in healthy adults?," (in eng), *Rev Assoc Med Bras (1992)*, vol. 66, no. 2, pp. 133-138, May 15 2020, doi: 10.1590/1806-9282.66.2.133.
- [96] M. Romandini, A. Laforí, P. Romandini, G. Baima, and M. Cordaro, "Periodontitis and platelet count: A new potential link with cardiovascular and other systemic inflammatory diseases," (in eng), *Journal of clinical periodontology*, vol. 45, no. 11, pp. 1299-1310, Nov 2018, doi: 10.1111/jcpe.13004.
- [97] B. P. Kumar, T. Khaitan, P. Ramaswamy, P. Sreenivasulu, G. Uday, and R. G. Velugubantla, "Association of chronic periodontitis with white blood cell and platelet count - A Case Control Study," (in eng), *J Clin Exp Dent*, vol. 6, no. 3, pp. e214-7, Jul 2014, doi: 10.4317/jced.51292.
- [98] Inohara, Chamaillard, C. McDonald, and G. Nuñez, "NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease," (in eng), *Annu Rev Biochem*, vol. 74, pp. 355-83, 2005, doi: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133347.
- [99] Y. Sugawara *et al.*, "Toll-like receptors, NOD1, and NOD2 in oral epithelial cells," (in eng), *Journal of dental research*, vol. 85, no. 6, pp. 524-9, Jun 2006, doi: 10.1177/154405910608500609.
- [100] M. Chamaillard *et al.*, "An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid," (in eng), *Nat Immunol*, vol. 4, no. 7, pp. 702-7, Jul 2003, doi: 10.1038/ni945.
- [101] S. E. Girardin *et al.*, "Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 278, no. 11, pp. 8869-72, Mar 14 2003, doi: 10.1074/jbc.C200651200.

- [102] N. Inohara *et al.*, "An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 275, no. 36, pp. 27823-31, Sep 8 2000, doi: 10.1074/jbc.M003415200.
- [103] T. Okugawa, T. Kaneko, A. Yoshimura, N. Silverman, and Y. Hara, "NOD1 and NOD2 mediate sensing of periodontal pathogens," (in eng), *Journal of dental research*, vol. 89, no. 2, pp. 186-191, 2010, doi: 10.1177/0022034509354843.
- [104] P. K. Kingston Mills, Jean- and T. L. Gerard Tiraby, Eric Perouzel. "C14-Tri-LAN-Gly NOD1 ligand Catalog code: tlr1-ctlg Patent online 2016, Novel compounds,WO 2016008946 A1, <https://encrypted.google.com/patents/WO2016008946A1?cl=und>.
https://www.invivogen.com/sites/default/files/invivogen/products/files/c14_tri_lan_gly_tds.pdf (accessed)
- [105] K. Newton and V. M. Dixit, "Signaling in innate immunity and inflammation," (in eng), *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 4, no. 3, Mar 1 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a006049.
- [106] C. Alexander and E. T. Rietschel, "Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity," (in eng), *J Endotoxin Res*, vol. 7, no. 3, pp. 167-202, 2001.
- [107] A. Steimle, I. B. Autenrieth, and J. S. Frick, "Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens," (in eng), *Int J Med Microbiol*, vol. 306, no. 5, pp. 290-301, Aug 2016, doi: 10.1016/j.ijmm.2016.03.001.
- [108] D. Grenier and D. Mayrand, "Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*," (in eng), *Infection and immunity*, vol. 55, no. 1, pp. 111-7, Jan 1987, doi: 10.1128/iai.55.1.111-117.1987.
- [109] D. Grenier, J. Bertrand, and D. Mayrand, "Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles promote bacterial resistance to chlorhexidine," (in eng), *Oral Microbiol Immunol*, vol. 10, no. 5, pp. 319-20, Oct 1995, doi: 10.1111/j.1399-302x.1995.tb00161.x.
- [110] R. P. Darveau *et al.*, "Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4," (in eng), *Infection and immunity*, vol. 72, no. 9, pp. 5041-51, Sep 2004, doi: 10.1128/iai.72.9.5041-5051.2004.
- [111] L. Shapira, S. Takashiba, S. Amar, and T. E. Van Dyke, "Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide stimulation of human monocytes: dependence on serum and CD14 receptor," (in eng), *Oral Microbiol Immunol*, vol. 9, no. 2, pp. 112-7, Apr 1994, doi: 10.1111/j.1399-302x.1994.tb00044.x.
- [112] E. Krueger and A. C. Brown, "Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin: From mechanism to targeted anti-toxin therapeutics," (in eng), *Molecular oral microbiology*, vol. 35, no. 3, pp. 85-105, Jun 2020, doi: 10.1111/omi.12284.
- [113] M. P. Isaza, M. S. Duncan, J. B. Kaplan, and S. C. Kachlany, "Screen for leukotoxin mutants in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: genes of the phosphotransferase system are required for leukotoxin biosynthesis," (in eng), *Infection and immunity*, vol. 76, no. 8, pp. 3561-8, Aug 2008, doi: 10.1128/iai.01687-07.
- [114] S. C. Kachlany, "Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin: from threat to therapy," (in eng), *Journal of dental research*, vol. 89, no. 6, pp. 561-70, Jun 2010, doi: 10.1177/0022034510363682.
- [115] E. T. Lally *et al.*, "RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 272, no. 48, pp. 30463-9, Nov 28 1997, doi: 10.1074/jbc.272.48.30463.
- [116] Z. A. Gabbasov, E. G. Popov, I. Gavrilov, and E. Pozin, "Platelet aggregation: the use of optical density fluctuations to study microaggregate formation in

- platelet suspension," (in eng), *Thrombosis research*, vol. 54, no. 3, pp. 215-23, May 1 1989, doi: 10.1016/0049-3848(89)90229-6.
- [117] G. V. Born and M. J. Cross, "THE AGGREGATION OF BLOOD PLATELETS," (in eng), *The Journal of physiology*, vol. 168, no. 1, pp. 178-95, Aug 1963, doi: 10.1113/jphysiol.1963.sp007185.
- [118] J. M. van Gils, J. J. Zwavinga, and P. L. Hordijk, "Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases," (in eng), *Journal of leukocyte biology*, vol. 85, no. 2, pp. 195-204, Feb 2009, doi: 10.1189/jlb.0708400.
- [119] M. Tomaiuolo, L. F. Brass, and T. J. Stalker, "Regulation of Platelet Activation and Coagulation and Its Role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis," (in eng), *Interv Cardiol Clin*, vol. 6, no. 1, pp. 1-12, Jan 2017, doi: 10.1016/j.iccl.2016.08.001.
- [120] S. P. Jackson, "Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly," (in eng), *Nat Med*, vol. 17, no. 11, pp. 1423-36, Nov 7 2011, doi: 10.1038/nm.2515.
- [121] E. V. Kozarov, B. R. Dorn, C. E. Shelburne, W. A. Dunn, Jr., and A. Progulske-Fox, "Human atherosclerotic plaque contains viable invasive *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*," (in eng), *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 25, no. 3, pp. e17-8, Mar 2005, doi: 10.1161/01.ATV.0000155018.67835.1a.
- [122] N. P. Lang, A. Joss, T. Orsanic, F. A. Gusberti, and B. E. Siegrist, "Bleeding on probing. A predictor for the progression of periodontal disease?," (in eng), *Journal of clinical periodontology*, vol. 13, no. 6, pp. 590-6, Jul 1986, doi: 10.1111/j.1600-051x.1986.tb00852.x.
- [123] Y. Jockel-Schneider *et al.*, "Wild-type isolates of *Porphyromonas gingivalis* derived from periodontitis patients display major variability in platelet activation," (in eng), *Journal of clinical periodontology*, vol. 45, no. 6, pp. 693-700, Jun 2018, doi: 10.1111/jcpe.12895.
- [124] A. Aszódi *et al.*, "The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function," (in eng), *Embo j*, vol. 18, no. 1, pp. 37-48, Jan 4 1999, doi: 10.1093/emboj/18.1.37.
- [125] D. Duerschmied, C. Bode, and I. Ahrens, "Immune functions of platelets," (in eng), *Thromb Haemost*, vol. 112, no. 4, pp. 678-91, Oct 2014, doi: 10.1160/th14-02-0146.
- [126] N. V. Balashova, J. A. Crosby, L. Al Ghofaily, and S. C. Kachlany, "Leukotoxin confers beta-hemolytic activity to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*," (in eng), *Infection and immunity*, vol. 74, no. 4, pp. 2015-21, Apr 2006, doi: 10.1128/iai.74.4.2015-2021.2006.
- [127] P. S. Munksgaard *et al.*, "Leukotoxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* causes shrinkage and P2X receptor-dependent lysis of human erythrocytes," (in eng), *Cellular microbiology*, vol. 14, no. 12, pp. 1904-20, Dec 2012, doi: 10.1111/cmi.12021.
- [128] A. Assinger, E. Buchberger, M. Laky, A. Esfandeyari, C. Brostjan, and I. Volf, "Periodontopathogens induce soluble P-selectin release by endothelial cells and platelets," (in eng), *Thrombosis research*, vol. 127, no. 1, pp. e20-6, Jan 2011, doi: 10.1016/j.thromres.2010.10.023.
- [129] A. Gargi, M. Reno, and S. R. Blanke, "Bacterial toxin modulation of the eukaryotic cell cycle: are all cytolethal distending toxins created equally?," (in eng), *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 2, p. 124, 2012, doi: 10.3389/fcimb.2012.00124.
- [130] J. M. DiRienzo, "Breaking the Gingival Epithelial Barrier: Role of the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Cytolethal Distending Toxin in Oral

- Infectious Disease," (in eng), *Cells*, vol. 3, no. 2, pp. 476-99, May 23 2014, doi: 10.3390/cells3020476.
- [131] M. Laky, A. Assinger, A. Esfandeyari, K. Bertl, H. Haririan, and I. Volf, "Decreased phosphorylation of platelet vasodilator-stimulated phosphoprotein in periodontitis--a role of periodontal pathogens," (in eng), *Thrombosis research*, vol. 128, no. 2, pp. 155-60, Aug 2011, doi: 10.1016/j.thromres.2011.02.016.
- [132] R. Aslam *et al.*, "Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo," (in eng), *Blood*, vol. 107, no. 2, pp. 637-41, Jan 15 2006, doi: 10.1182/blood-2005-06-2202.
- [133] R. Kikkert, M. L. Laine, L. A. Aarden, and A. J. van Winkelhoff, "Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria," (in eng), *Oral Microbiol Immunol*, vol. 22, no. 3, pp. 145-51, Jun 2007, doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00335.x.
- [134] S. R. Park *et al.*, "Diverse Toll-like receptors mediate cytokine production by *Fusobacterium nucleatum* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in macrophages," (in eng), *Infection and immunity*, vol. 82, no. 5, pp. 1914-20, May 2014, doi: 10.1128/iai.01226-13.
- [135] W. E. Moore and L. V. Moore, "The bacteria of periodontal diseases," (in eng), *Periodontol 2000*, vol. 5, pp. 66-77, Jun 1994, doi: 10.1111/j.1600-0757.1994.tb00019.x.
- [136] P. E. Kolenbrander, R. J. Palmer, Jr., A. H. Rickard, N. S. Jakubovics, N. I. Chalmers, and P. I. Diaz, "Bacterial interactions and successions during plaque development," (in eng), *Periodontol 2000*, vol. 42, pp. 47-79, 2006, doi: 10.1111/j.1600-0757.2006.00187.x.
- [137] S. Copenhagen-Glazer *et al.*, "Fap2 of *Fusobacterium nucleatum* is a galactose-inhibitable adhesin involved in coaggregation, cell adhesion, and preterm birth," (in eng), *Infection and immunity*, vol. 83, no. 3, pp. 1104-13, Mar 2015, doi: 10.1128/iai.02838-14.
- [138] E. I. Weiss, B. Shanitzki, M. Dotan, N. Ganeshkumar, P. E. Kolenbrander, and Z. Metzger, "Attachment of *Fusobacterium nucleatum* PK1594 to mammalian cells and its coaggregation with periodontopathogenic bacteria are mediated by the same galactose-binding adhesin," (in eng), *Oral Microbiol Immunol*, vol. 15, no. 6, pp. 371-7, Dec 2000, doi: 10.1034/j.1399-302x.2000.150606.x.
- [139] P. Dehazya and R. S. Coles, Jr., "Agglutination of human erythrocytes by *Fusobacterium nucleatum*: factors influencing hemagglutination and some characteristics of the agglutinin," (in eng), *J Bacteriol*, vol. 143, no. 1, pp. 205-11, Jul 1980, doi: 10.1128/jb.143.1.205-211.1980.
- [140] A. I. Bolstad, H. B. Jensen, and V. Bakken, "Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*," (in eng), *Clin Microbiol Rev*, vol. 9, no. 1, pp. 55-71, Jan 1996, doi: 10.1128/cmr.9.1.55.
- [141] W. A. Falkler, Jr., E. B. Clayman, and D. F. Shaefer, "Haemolysis of human erythrocytes by the *Fusobacterium nucleatum* associated with periodontal disease," (in eng), *Archives of oral biology*, vol. 28, no. 8, pp. 735-9, 1983, doi: 10.1016/0003-9969(83)90109-7.
- [142] W. A. Falkler, Jr. and B. W. Burger, "Microbial surface interactions: reduction of the haemagglutination activity of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* by absorption with *Streptococcus* and *Bacteroides*," (in eng), *Archives of oral biology*, vol. 26, no. 12, pp. 1015-25, 1981, doi: 10.1016/0003-9969(81)90112-6.
- [143] M. D. Williams, C. A. Kerber, and H. F. Tergin, "Unusual presentation of Lemierre's syndrome due to *Fusobacterium nucleatum*," (in eng), *J Clin*

- Microbiol*, vol. 41, no. 7, pp. 3445-8, Jul 2003, doi: 10.1128/jcm.41.7.3445-3448.2003.
- [144] K. Holm, I. M. Frick, L. Björck, and M. Rasmussen, "Activation of the contact system at the surface of *Fusobacterium necrophorum* represents a possible virulence mechanism in Lemièrre's syndrome," (in eng), *Infection and immunity*, vol. 79, no. 8, pp. 3284-90, Aug 2011, doi: 10.1128/iai.05264-11.
- [145] Y. Asai, Y. Makimura, A. Kawabata, and T. Ogawa, "Soluble CD14 discriminates slight structural differences between lipid as that lead to distinct host cell activation," (in eng), *J Immunol*, vol. 179, no. 11, pp. 7674-83, Dec 1 2007, doi: 10.4049/jimmunol.179.11.7674.
- [146] M. Niklaus *et al.*, "The involvement of toll-like receptors 2 and 4 in human platelet signalling pathways," (in eng), *Cell Signal*, vol. 76, p. 109817, Dec 2020, doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109817.
- [147] C. Mouton, D. Ni Eidhin, M. Deslauriers, and L. Lamy, "The hemagglutinating adhesin HA-Ag2 of *Bacteroides gingivalis* is distinct from fimbrilin," (in eng), *Oral Microbiol Immunol*, vol. 6, no. 1, pp. 6-11, Feb 1991, doi: 10.1111/j.1399-302x.1991.tb00444.x.
- [148] M. A. Curtis, M. Macey, J. M. Slaney, and G. L. Howells, "Platelet activation by Protease I of *Porphyromonas gingivalis* W83," (in eng), *FEMS Microbiol Lett*, vol. 110, no. 2, pp. 167-73, Jun 15 1993, doi: 10.1111/j.1574-6968.1993.tb06315.x.
- [149] A. Lourbakos *et al.*, "Activation of protease-activated receptors by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity," (in eng), *Blood*, vol. 97, no. 12, pp. 3790-7, Jun 15 2001, doi: 10.1182/blood.v97.12.3790.
- [150] R. J. Lamont and H. F. Jenkinson, "Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*," (in eng), *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 62, no. 4, pp. 1244-63, Dec 1998, doi: 10.1128/mmbr.62.4.1244-1263.1998.
- [151] Y. Sun, R. Shu, C. L. Li, and M. Z. Zhang, "Gram-negative periodontal bacteria induce the activation of Toll-like receptors 2 and 4, and cytokine production in human periodontal ligament cells," (in eng), *Journal of periodontology*, vol. 81, no. 10, pp. 1488-96, Oct 2010, doi: 10.1902/jop.2010.100004.
- [152] B. Li, Y. Xia, and B. Hu, "Infection and atherosclerosis: TLR-dependent pathways," (in eng), *Cell Mol Life Sci*, vol. 77, no. 14, pp. 2751-2769, Jul 2020, doi: 10.1007/s00018-020-03453-7.
- [153] V. Senini, U. Amara, M. Paul, and H. Kim, "Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide activates platelet Cdc42 and promotes platelet spreading and thrombosis," (in eng), *Journal of periodontology*, vol. 90, no. 11, pp. 1336-1345, Nov 2019, doi: 10.1002/jper.18-0596.
- [154] L. S. Coimbra *et al.*, "Influence of antiplatelet drugs in the pathogenesis of experimental periodontitis and periodontal repair in rats," (in eng), *Journal of periodontology*, vol. 82, no. 5, pp. 767-77, May 2011, doi: 10.1902/jop.2010.100555.

Appendix

I. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------|---------------------------------------|
| A.actinomycetemcomitans | Aggregatibacter actinomycetemcomitans |
| AAP | American Academy of Periodontology |
| AC | Adenylatzyklase |
| ADA | American Dental Association |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AMP | antimikrobielle Peptide |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BOP | Bleeding on Probing |
| C14 | C14-Tri-LAN-Gly |
| Ca ²⁺ | Calcium |
| CAL | Clinical Attachment Level |
| cAMP | cyclischen Adenosinmonophosphat |
| CD40L | CD40 Ligand |
| CdtC | cytolethale distending toxin |
| cGMP | zyklischen Guanosinmonophosphat |
| COX | Cyclooxygenase |
| DAG | Diacylglycerin |
| DAMP | Damage-associated Molecular Pattern |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| F. necrophorum | Fusobacterium necrophorum |
| FACS | Fluorescence-activated-cell sorting |
| FcR | Fc- Rezeptoren |
| fMLP | f-Met-Leu-Phe |
| F.nucleatum | Fusobacterium nucleatum |
| GCF | gingivale Sulkusflüssigkeit |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GPCRs | G- Protein- gekoppelte Rezeptoren |
| GT | gewaschenen Thrombozyten |
| GTP | Guanosintriphosphat |

| | |
|--------------------------------------|---|
| HEK 293 | humane embryonale Nierenzellen |
| iE-DAP | γ -D-Glutamyl-Meso- Diaminopimelinsäure |
| IL | Interleukine |
| IP | Prostacyclin- Rezeptor |
| IP3 | Inositol 1,4,5- Triphosphat |
| LAF-1 | Lymphozytenfunktions-assoziertes Antigen 1 |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| ltx | Leukotoxine |
| LTX | LtxA von <i>A.actinomycetemcomitans</i> |
| MDP | Muramyldipetimid |
| MFI | mean fluorescence intensity |
| MMP | Matrix-Metalloproteinasen |
| MPV | mittlere Plättchenvolumen |
| NF- κ B | Nuclear factor- κ -light-chain-enhancer of activated B cells |
| NLRs | NOD-like-Rezeptoren |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| <i>P. gingivalis</i> | <i>Porphyromonas gingivalis</i> |
| P2Y ₁ , P2Y ₁₂ | ADP Rezeptoren |
| PAF | platelet activating factor |
| PAMPs | Pathogen-assozierte molekulare Muster |
| PAR1 und PAR4 | Protease-aktivierten Rezeptoren |
| PCT | Thrombozytenhämatokrit |
| PDGF | platelet- derived- growth factor |
| PF4 | Plättchenfaktor 4 |
| PGI ₂ | Prostacyclin |
| PGNs | Peptidoglycanen |
| PI3K | Phosphatidylinosid-3-Kinase |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat |
| PIP ₃ | Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKC | Proteinkinase C |
| PKG | Proteinkinase G |
| PLC | Phospholipase C |
| PMN | polymorphkernige neutrophile Granulozyten |
| PPP | plättchenarmes Plasma |

| | |
|------------------|--|
| PRP | plättchenreiches Plasma |
| PRR | Pattern-Recognition-Rezeptoren |
| PSI | Parodontalen-Sondierungs-Index |
| RANTES | Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted |
| SKF | Familie der SRC-Kinasen |
| Syk | Milztyrosinkinase |
| T. denticola | Treponema denticola |
| T.forsynthia | Tannerella forsythia |
| TLRs | Toll-like-Rezeptoren |
| TP | Thromboxan-A2-Rezeptoren |
| TT | Taschensondierungstiefe |
| TXA ₂ | Thromboxan A2 |
| UPT | unterstützende Parodontaltherapie |
| VASP | Vasodilator- stimulierte Phosphoprotein |
| vWF | von Willebrand Faktor |

II. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Stimulierende und inhibierende Signalwege in Thrombozyten. | 5 |
| Abb. 2: Parodontale Bakterien eingeteilt in Komplexen. | 9 |
| Abb. 3: Pathogenese der Parodontitis. | 11 |
| Abb. 4: Pipettierschema für APACT. | 25 |
| Abb. 5: Schematische Darstellung der FACS-Messung. | 28 |
| Abb. 6: Wirkung von LTX auf die Agonisten-induzierte Aggregation. | 34 |
| Abb. 7: Wirkung von LTX auf die VASP- Phosphorylierung. | 34 |
| Abb. 8: Wirkung von LTX auf die thrombozytäre Sekretion. | 35 |
| Abb. 9: Einfluss von C14 auf die Agonisten-induzierte Aggregation. | 36 |
| Abb. 10: Wirkung von C14 auf die VASP- Phosphorylierung. | 38 |
| Abb. 11: Wirkung von C14 auf die thrombozytäre Sekretion. | 39 |
| Abb. 12: Einfluss von LPS auf die Agonisten-induzierte Aggregation. | 40 |
| Abb. 13: Einfluss von LPS auf die CD62P-Expression. | 41 |
| Abb. 14: Wirkung von LPS auf die thrombozytäre Sekretion. | 42 |
| Abb. 15: Wirkung der untersuchten Substanzen auf die Thrombozytenfunktion. | 50 |

III. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tab. 1: Übersicht der Probenstimulation für die FACS-Analyse..... | 26 |
| Tab. 2: Probenvorbereitung für ELISA-Tests. | 29 |
| Tab. 3: Verdünnungen der Proben für ELISA-Tests..... | 30 |
| Tab. 4: Pipettierschema für ELISA-Tests. | 30 |

IV. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Böck für die Überlassung dieses Promotionsthemas.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Kößler danke ich für die hervorragende fachliche Betreuung. Seine stets hilfreichen Ratschläge waren für mich eine maßgebliche Unterstützung bei der Verfassung dieser Arbeit.

Frau Priv.-Doz. Dr. Kobsar danke ich für die Einarbeitung in die Laborarbeit sowie für die kompetente Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse.

Katja Weber danke ich für das stets offene Ohr für all meine Fragen während der Experimente sowie für die tatkräftige Unterstützung.

Mein weiterer Dank gilt den Doktoranden Marius Niklaus und Philipp Klingler für die angenehme Zusammenarbeit im Labor sowie für all ihre guten Tipps und Tricks.

Außerdem danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Blutspendebereichs am Institut für die herzliche Aufnahme und die hervorragende Zusammenarbeit.

Außerdem gilt mein Dank allen Blutspenderinnen und Blutspendern, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt natürlich auch meiner Familie. Insbesondere meinen Eltern, die mich immer unterstützen und mir Rückenwind geben. Meinen Schwestern Charlotte und Clara dafür, dass sie immer für mich da sind und sie so sind wie sie sind.