

**Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL**

**Prävalenz der 3020insC Mutation des NOD2/CARD15-Gens
bei Patienten mit chronischer Parodontitis**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**Vorgelegt von
Daniel Mauermann**

**aus
Augsburg**

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Dr. med. dent. Matthias
Folwaczny
Mitberichterstatter: Prof. Dr. J.-U. Walther
Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung: 30.3.2004

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
2. Die Pathogenese der marginalen Parodontitis	8
2.1 Zur Klassifikation der Parodontalerkrankungen	8
2.2 Parodontalpathogene Mikroorganismen	8
2.2.1 Die Entstehung eines Biofilms	9
2.2.2 Virulenzfaktoren	10
3. Immunabwehrmechanismen	11
3.1 Gingivitis - eine Vorstufe der Parodontitis?	11
3.2 Critical Pathway: ein pathogenetisches Modell	12
3.2.1 Die initiale Phase der Immunabwehr - Etablierung der Gingivitis....	12
3.2.2 Die zweite Phase der Immunabwehr - Etablierung der Parodontitis	15
3.3 Erkennung von bakteriellen Toxinen	17
3.3.1 Toll-like-receptors (TLR) : transmembranale Toxin - Rezeptoren ...	18
3.3.2 Die NOD-Familie (NOD1/NOD2): zytosolische Toxin-Rezeptoren..	19
3.4 Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB und seine Auswirkungen	22
4. Risikofaktoren der Parodontitis	26
4.1 Klassifikation.....	26
4.2 Polymorphismen im Zusammenhang mit marginalen Parodontitiden..	27
4.3 Polymorphismus des NOD2/CARD15-Gens	29
5. Ziele der Untersuchung	31
6. Material und Methoden	32
6.1 Studienpopulation	32
6.1.1 Auswahl der Untersuchungsgruppe.....	32
6.1.2 Auswahl der Kontrollgruppe.....	34
6.1.3 Goldstandards.....	34
6.2 Allgemeine Beschreibung der Methoden	35
6.2.1 Blutentnahme.....	35
6.2.2 Aufarbeitung des Blutes.....	35
6.2.3 DNA-Isolierung.....	36
6.2.3.1 DNA-Isolierung mit Hilfe des QIAamp® Blood Midi Kit	36
6.2.3.2 DNA-Isolierung nach der Aussalzmethode	37

6.2.4	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren.....	38
6.2.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
6.2.6	Agarosegelelektrophorese	40
6.2.7	Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus (RFLP) – Analyse.	41
6.2.8	Genotypisierung des NOD2/CARD15-Gens in Bezug auf die 3020insC-Mutation.....	42
6.3	Statistische Auswertung	46
7.	Ergebnisse	47
7.1	Sequenzierung nach Restriktionsverdau in Bezug auf die 3020insC Mutation des NOD2/CARD15 Gens	47
7.2	Häufigkeit des 3020insC Allels des NOD2/CARD15 Gens.....	48
7.3	Verteilung der Genotypen des 3020insC Polymorphismus des NOD2- Gens	49
7.4	Statistische Auswertung	50
8.	Diskussion.....	59
8.1	Häufigkeit der 3020insC Mutation des NOD2 Gens	59
8.2	Methodik	59
8.2.1	Auswahl der Stichprobe	59
8.2.1.1	Parodontaler Befund und Klassifizierung	60
8.2.1.2	Ethnische Unterschiede bei genetischen Studien.....	61
8.2.2 Genotypisierung in Bezug auf die 3020insC Mutation des NOD2/CARD15 Gens	62
8.3	Modelle zum Einfluss des NOD2-Polymorphismus auf die Pathogenese der Parodontitis.....	62
8.3.1	Wildtypform des NOD2 als Schutzbarriere	63
8.3.2	NOD2 als Rezeptor für Muramyl Dipeptid (MDP).....	64
8.3.3 Störung des erworbenen Immunsystems als Folge der 3020insC Mutation	65
8.3.4	Spezifische Rezeptoren und deren Einfluss auf die Pathogenese..	65
8.3.5	NFκB: Knotenpunkt der Entzündungsreaktion.....	66
8.4	Ausblick	67

9. Zusammenfassung	69
Literaturverzeichnis	71
Anhang	81
Danksagung	83
Lebenslauf	84

1. Einleitung

Die marginale Parodontitis ist eine durch gramnegative Bakterien verursachte Infektionskrankheit des Zahnhalteapparats. Folge ist ein unterschiedlich ausgeprägter Verlust von Alveolarknochen, Desmodont und umliegendem Weichgewebe. In schweren Fällen kann dies zum Zahnverlust führen. In der Ergründung der genauen pathophysiologischen Vorgänge ging man Jahrzehnte davon aus, dass die bakterielle Infektion die alleinige Ursache hierfür sei. Widerlegt wurde dies bereits 1986 durch LOE et al., die feststellten, dass sich bei Patienten trotz Anwesenheit der parodontopathogenen Erreger keine marginale Parodontitis entwickelte. Allem Anschein nach spielt eine inadäquate oder gesteigerte Immunreaktion des Wirts dabei eine entscheidende Rolle (PAGE et al., 1997). Es wurde bereits über eine genetisch bedingte Prädisposition für diese Erkrankung diskutiert (HART & KORNMAN, 1997).

Bei der Pathogenese der marginalen Parodontitis spielen Monozyten/Makrophagen mit ihren Entzündungsmediatoren TNF- α bzw. IL-1 β eine entscheidende Rolle (SHAPIRA et al., 2001). In Anwesenheit von Lipopolysacchariden (LPS) werden diese über den Weg des Transkriptionsfaktors NF κ B synthetisiert und freigesetzt (ROGLER et al., 1998; NICHOLS et al., 2001). Zur Erkennung der LPS und der damit verbundenen Mediatorfreisetzung sind spezifische Rezeptoren notwendig: der transmembranal gelegene *toll-like-receptor* 4 (TLR4) vor allem bildet mit den Proteinen CD 14 und MD 2 einen wichtigen Rezeptorenkomplex zur Erkennung von Lipopolysacchariden (ADEREM & ULEVITCH, 2000; ALIPRANTIS et al., 1999). Daneben gibt es Hinweise darauf, dass auch im Zytosol gelegene Rezeptoren existieren, die auf bakterielle Toxine reagieren können (PHILPOTT et al., 2000). So wurden die beiden Proteine NOD 1 und NOD 2 als solche erkannt (VAN HEEL et al., 2001; INOHARA et al., 2001). NOD 1 wird nahezu in allen Geweben synthetisiert (INOHARA et al., 1999), NOD 2 ist hauptsächlich in Monozyten/Makrophagen nachzuweisen (OGURA et al., 2001).

In diesem Zusammenhang wird eine Punktmutation (3020insC) im NOD2/CARD15 Gen beschrieben (HUGOT et al., 2001; OGURA et al., 2001; HAMPE et

al., 2001), die *in vitro* zu einer verminderten Leistung des NF κ B bei Stimulation mit Lipopolysacchariden führt.

Diese Störung zieht eine mindere Synthese von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1 β) nach sich. Bekanntermaßen sind diese u.a. für die Gewebestruktion bei marginalen Parodontitiden verantwortlich.

Die vorliegende Studie soll nun Aufschluss über den Zusammenhang zwischen der NOD2/CARD15 3020insC-Mutation und chronisch marginalen Parodontitiden geben. Zunächst wird der aktuelle Forschungsstand dargestellt. Daran schließt sich die Beschreibung der Studienpopulation und des methodischen Vorgehens an. In der abschließenden Diskussion der Ergebnisse werden Konsequenzen und Perspektiven für zukünftige Studien aufgezeigt.

2. Die Pathogenese der marginalen Parodontitis

2.1 Zur Klassifikation der Parodontalerkrankungen

Eine marginale Parodontitis kann in verschiedenen Verlaufsformen auftreten. Die ältere, 1989 durch den *World Workshop in Clinical Periodontics* festgelegte Nomenklatur basierte auf einer Klassifizierung der Parodontopathien nach dem Lebensalter des Auftretens und der Progressionsrate („früh beginnende“, „adulte“ Parodontitis). Diese Einteilung wurde 1999 beim *International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions* verworfen. Die Bezeichnung „adulte“ Parodontitis wurde ersetzt durch den Begriff „chronische“ Parodontitis (lokalisiert bzw. generalisiert). Sie ist durch einen langsamen und schubweisen Verlauf gekennzeichnet. Aktive Zahnfleischtaschen finden sich neben ruhenden, inaktiven Taschen (HELLWIG et al., 1999, S. 341). Die Bezeichnung „früh beginnende“ Parodontitis wurde ebenfalls aufgegeben. In dieser Gruppe fanden sich die „präpubertäre“ (PP), die „juvenile“ (JP), „rasch fortschreitende“ (RPP) und die „refraktäre“ (RP) Parodontitis. Diese Formen sind gekennzeichnet durch einen besonders foudroyanten Verlauf und wurden daher zum Formenkreis der „aggressiven“ Parodontitiden zusammengefasst.

2.2 Parodontalpathogene Mikroorganismen

Parodontitis, im Volksmund immer noch fälschlicherweise bezeichnet als „Parodontose“, ist eine bakteriell verursachte Entzündung des Zahnhalteapparats (HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994). Im Gegensatz zur Gingivitis sind bei der marginalen Parodontitis alle Anteile des Parodontiums (Gingiva, Desmodont, Wurzelzement, Alveolarknochen) betroffen.

Primäre Ursache für die Entstehung marginaler Parodontitiden ist die insuffiziente Mundhygiene und die daraus resultierende Bildung von supra- als auch subgingival gelegenen harten (Konkrement) bzw. weichen Belägen (Plaque). Bleibt die regelmäßige Entfernung der Beläge aus, so führt dies zu einem

Wechsel von der physiologischen, residenten bakteriellen Flora (aerobe, grampositive Kokken und Stäbchen) in eine pathogene Mikroflora.

Obwohl bereits mehr als 300 Bakterienspezies in der Mundhöhle nachgewiesen wurden (DARVEAU et al., 1997), konnte bisher kein spezifischer parodontopathogener Keim identifiziert werden. Aus diesem Grund kann man hier nicht, entsprechend den Henle-Koch'schen Postulaten, von einer spezifischen Infektion sprechen (LOESCHE, 1999; MÜLLER, 2001, S. 19). SOCRANSKY (1979) modifizierte diese Postulate für die Pathogenese der marginalen Parodontitis. Die Pathogene sollten zum einen nur in erkrankten Bereichen nachzuweisen sein und Virulenzfaktoren aufweisen. Auf der anderen Seite sollte deren Elimination zu einer Ausheilung der Krankheit führen. Eine zelluläre oder humorale Immunantwort auf das Pathogen sollte nur für diesen einen Mikroorganismus zutreffen und nicht für andere.

Als Keime mit starker Assoziation zu Parodontitiden wurden, trotz uneinheitlicher Ergebnisse diverser Studien, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Bacteroides forsythus* in einem Konsensuspapier der American Academy of Periodontology festgelegt (AAP, 1996). Daneben finden sich auch *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia* sowie *Fusobacterium nucleatum* bei fortschreitenden parodontalen Erkrankungen (LOWENGUTH et al., 1995).

Anscheinend etablieren sich an parodontal erkrankten Zähnen anaerobe, teilweise mikroaerophile, gramnegative Keimspezies, während im gesunden subgingivalen Kompartiment bevorzugt grampositive Bakterien zu finden sind (MÜLLER, 2001, S. 16).

2.2.1 Die Entstehung eines Biofilms

Die Anheftung an der Pellicleschicht, die sich innerhalb weniger Stunden nach gründlicher Reinigung auf allen Glattflächen der Zähne ablagert, erfolgt initial durch die residenten Mikroorganismen (DUAN et al., 1994; HSU et al., 1994). Den gramnegativen Bakterien ist es nun möglich, sich über Fimbrien, Pili und die so genannte Glykokalyx an die Pionierkeime zu heften (WHITTAKER et al.,

1996). Sie organisieren sich mit den residenten Komensalen zu einem komplexen, äußerst widerstandsfähigen Biofilm. Der Biofilm bietet den Bakterien einen entscheidenden evolutionären Vorteil. Es ist ihnen möglich, metabolisch untereinander zu kooperieren (WHITTAKER et al., 1996). Die Versorgung der einzelnen Kompartimente des Biofilms mit Nährstoffen wird möglich durch die Bildung eines primitiven Transportsystems (COSTERTON et al., 1995).

Der Biofilm ist keinesfalls als ein homogener Komplex zu verstehen, sondern ist durch charakteristische Mikromilieus mit unterschiedlichem pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck und Redoxpotential gekennzeichnet (DARVEAU et al., 1997; MÜLLER, 2001, S. 14). Außerdem bietet diese Komplexbildung den Bakterien Schutz vor immunologischen Abwehrmechanismen des Wirts, als auch vor antibiotischen Wirkstoffen (KHOURY et al., 1992). So schützt dieser Komplex vor Phagozytose und Abbau durch polymorphkernige Granulozyten. Seine subgingivale Lage erschwert die Zugänglichkeit für Mundhygienemaßnahmen und fördert letztlich die Bildung des Biofilms. Die Pathogenität der Bakterien kann dadurch drastisch gesteigert sein (MÜLLER, 2001, S. 14).

2.2.2 Virulenzfaktoren

Um pathogen zu werden, müssen die Bakterien Virulenzfaktoren aufweisen. Zur bereits beschriebenen Adhäsionsfähigkeit und der Vermehrung innerhalb einer ökologischen Nische (gingivaler Sulcus) gehört auch die Synthese von toxischen Substanzen. So führen das Leukotoxin und immunglobulinspaltende Substanzen zur Umgehung der Wirtsabwehr (MÜLLER, 2001, S. 22). Daneben finden sich auch Enzyme, die direkt gewebsdestruierend wirken können (neutrale Phosphatasen, Kollagenasen). Indirekt gewebschädigend wirken osteoklastenaktivierende alkalische und saure Phosphatasen, die zum Abbau des Knochengewebes des Zahnhalteapparats führen.

Neben diesen von den Bakterien ausgeschiedenen Exotoxinen spielen Lipopolysaccharide (LPS) aus der Zellwand gramnegativer Bakterien bei der Aktivierung des Immunsystems und der damit verbundenen Ausschüttung von Zytokinen eine wichtige Rolle. Lipopolysaccharide, auch Endotoxine genannt,

sind hochmolekulare, thermostabile Substanzen, die sowohl pyrogen, als auch immunogen wirken (OETHRINGER, 1997, S. 4). Zur Gruppe der Endotoxine zählen auch Proteoglykane, die ebenfalls aus der Zellwand gramnegativer Bakterien stammen und immunologische Reaktionen auslösen können (PHILPOTT et al., 2000).

3. Immunabwehrmechanismen

3.1 Gingivitis - eine Vorstufe der Parodontitis?

Die Auseinandersetzung des Organismus mit den pathogenen Belägen führt zu einer Entzündungsreaktion mit einem mehr oder weniger ausgeprägten Verlust des Zahnhalteapparates (Weichgewebe und Knochengewebe), der letztlich zur irreversiblen Lockerung bis zum Verlust des Zahnes führen kann. Man ging viele Jahre davon aus, dass nahezu jeder Erwachsene zumindest einmal in seinem Leben an einer infektiösen Entzündung des marginalen Parodontiums (Zahnhalteapparat), also einer Entzündung der Gingiva (Gingivitis) oder tieferliegender Anteile des Zahnhalteapparates (Parodontitis) erkrankt. Nach dieser Theorie wurden die Gingivitis und Parodontitis als zwei Stadien ein und derselben Erkrankung angesehen. Heute ist man aber davon abgerückt. So ist die Gingivitis nur in seltenen Fällen eine Vorstufe der Parodontitis (MÜLLER, 2001, S. 36; SALVI et al., 1997). Bei manchen Patienten treten, trotz qualitativ vergleichbarer Mundhygiene zu parodontal Erkrankten, auch bei längerbestehender Gingivitis keine, beziehungsweise nur geringfügige Verluste des Zahnhalteapparats auf (LOE, 1986; PAGE et al., 1997). Die parodontopathogenen Keime alleine sind allem Anschein nach nicht in der Lage, eine destruktive Parodontitis auszulösen.

Es ist offensichtlich, dass individuelle Modulatoren entscheidend für die Etablierung einer Parodontitis sind. Neben der Infektion mit parodontopathogenen Keimen und insuffizienter Mundhygiene, spielt die körpereigene Immunabwehr eine außerordentlich wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression einer marginalen Parodontitis (HART et al., 1997; PAGE, 1991; SEYMOUR, 1991; DEN-

NISON et al., 1997; WILLIAMS & PAQUETTE, 2000). Deshalb kann man in diesem Zusammenhang auch von einer Immunopathogenese der marginalen Parodontitis sprechen (SALVI et al., 1997). Zum besseren Verständnis soll diese nun näher betrachtet werden.

3.2 Critical Pathway: ein pathogenetisches Modell

Obwohl erst einige pathogenetische Modulatoren wirklich bekannt und in ihrer Wirkung verstanden sind, hat man auf der Basis bislang gefundener Daten ein neues pathogenetisches Modell entworfen. Der so genannte „critical pathway“ rückt von dem einfachen Prinzip aus Ursache und nachfolgender Wirkung ab. Dieses Modell erlaubt, die pathogenetischen Vorgänge der marginalen Parodontitis aus einer anderen Perspektive differenzierter zu betrachten und zu verstehen (OFFENBACHER, 1996; SALVI et al., 1997). Die Vernachlässigung der Mundhygiene und die daraus resultierende Ablagerung von parodontopathogener Plaque und Konkrementen im subgingivalen Bereich des Zahnhalses stellen auch nach dem Modell des „critical pathway“ primär krankheitsinduzierende Ursachen der marginalen Parodontitis dar.

Die Bildung eines Biofilms mit stark virulenten Keimen setzt im subgingivalen Kompartiment des Zahnhalteapparats eine Immunreaktion in Gang, die zur Etablierung der Erkrankung führt (OFFENBACHER, 1996; SALVI et al., 1997).

Beim Modell des „critical pathway“ werden zwei verschiedene Phasen der Immunantwort unterschieden. Die aufgeführten Daten beruhen auf *in vitro* Beobachtungen, sodass eine Erklärung der Zusammenhänge Modellcharakter hat.

3.2.1 Die initiale Phase der Immunabwehr - Etablierung der Gingivitis

Bei genauerer Betrachtung der zeitlichen Abfolge immunologischer Prozesse fällt auf, dass die parodontopathogenen Keime zunächst nahezu vollständig durch das Saumepithel von den Zellen des Immunsystems getrennt sind. Dieses schließt die funktionelle Einheit Alveolarknochen-Wurzelzement-Desmodont von der Mundhöhle durch feste Anheftung an der Zahnoberfläche ab (MÜLLER, 2001, S. 4). Die Aktivierung des Immunsystems führt über die von

den Bakterien freigesetzten Stoffwechselprodukte und Toxine. Neben gesättigten, kurzkettigen Fettsäuren (z.B. Butyl - oder Propylsäure) und Proteinen (z.B. N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin [FMLP], Proteoglykane), stellt vor allem das Lipopolysaccharid den potentesten Aktivator des immunologischen Entzündungsprozesses dar (LOPPNOW et al., 1989; KORNMAN et al., 1997 b).

Diese Substanz führt direkt am Saumepithel sowohl zur Freisetzung von Zytokinen, also parakrinen Faktoren zur Proliferation bzw. Differenzierung von Entzündungszellen, als auch zur Expressierung spezifischer Oberflächenrezeptoren. So geben die Epithelzellen verstärkt Interleukine wie Interleukin-1 β (IL-1 β) oder Interleukin-6 (IL-6) zur Signalisierung der Infektion an Leukozyten ab (ECKMANN et al., 1994; TONETTI et al., 1993; ABBAS et al., 1996, S. 302). Chemokine, chemotaktisch wirkende Zytokine, wie zum Beispiel Interleukin-8 (IL-8), werden ebenfalls in großen Mengen vom Saumepithel freigesetzt (ABBAS et al., 1996, S. 304; KORNMAN et al., 1997b).

Die Zellen des gingivalen Epithels sind daneben in der Lage das so genannte „Inter Cellular Adhesion Molecule 1“ (ICAM1), ein Integrin, zu exprimieren. Dieses ermöglicht die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten über das Integrin CD 11/18 und erleichtert somit den Austritt dieser Zellen in den gingivalen Sulcus.

Auch Endothelzellen des subepithelialen Gewebes können ICAM1 exprimieren. Dies geschieht zum einen indirekt über proinflammatorische Zytokine (IL-1, Tumor-Nekrose-Faktor- α [TNF- α]) oder zum anderen direkt über bakterielle Toxine, die durch das Gewebe diffundieren.

Damit ist eine Leitschiene für die Leukodiapedese geschaffen (MÜLLER, 2001, S. 31; MOUGHAL et al., 1992; TONETTI, 1997). Nach dem Durchtritt der neutrophilen Granulozyten durch das Endothel wandern sie auf das Zentrum der Entzündung zu. Die Wanderungsrichtung wird vorgegeben durch einen Konzentrationsgradienten der beteiligten Chemokine (IL-8) beziehungsweise Oberflächenrezeptoren (ICAM1). Die Konzentration nimmt von der Oberfläche des Saumepithels zu den basalen Zellschichten hin ab. Neutrophile Granulozyten wandern also in Richtung zunehmender Konzentration zum gingivalen Sulcus (DANIEL & VAN DYKE, 1996; DENNISON et al., 1997; ISHIKAWA et al.,

1997). Unterstützt wird die gezielte Leukodiapedese auch von den chemotaktisch wirkenden Komplementfaktoren C3a und C5a. Die Komplementaktivierung erfolgt sowohl über den alternativen (durch LPS), als auch über den klassischen Pfad, also über Antigen-Antikörperkomplexe (MÜLLER, 2001, S. 28 f.). Nach der Einwanderung der neutrophilen Granulozyten in das Zentrum der Infektion werden die opsonierten pathogenen Keime phagozytiert und durch verschiedene oxidierende und nicht-oxidierende Enzymsysteme abgebaut (DENNISON et al., 1997). Die Opsonierung erfolgt durch die Komplementfaktoren C3b oder C4b sowie durch Immunglobuline der Klasse IgG₁ und IgG₂. Die Fc-Domänen der IgG-Antikörper werden über CD16 (FcγRIII) als auch CD32 (FcγRIIA) Rezeptoren von neutrophilen Granulozyten gebunden und die Bakterien in Phagolysosomen abgebaut (SANDERS et al., 1995; DENNISON et al., 1997).

PMN setzen daneben geringe Mengen proinflammatorischer Zytokine wie IL-1β und IL-8 frei, die modulierend auf T- und B-Lymphozyten wirken, die nun auch vermehrt das Gewebe durchsetzen (PAGE, 1991). Während dieser initialen Entzündungsphase ist auch die Sekretion der Sulcusflüssigkeit, in der Zusammensetzung dem Blutplasma ähnlich, erhöht. Diese führt zur Ausschwemmung der proinflammatorischen Substanzen, sodass aus dem Gewebe weitere Entzündungszellen rekrutiert werden müssen.

Die Zellpopulation verschiebt sich in Richtung der B-Lymphozyten, die verstärkt Antikörper bilden und somit die bakterielle Invasion ins Bindegewebe verhindern können (SALVI et al., 1997). Monozyten bzw. Makrophagen spielen in dieser initialen Immunabwehrphase nur eine untergeordnete Rolle (MÜLLER, 2001, S. 33).

Gelingt es in dieser ersten Phase den mikrobiellen Angriff suffizient einzudämmen und eine weitere Invasion der Bakterien zu verhindern, so bleibt nach dem Modell des „critical pathway“ die Entzündung auf die marginale Gingiva beschränkt (Gingivitis). Eine irreversible Zerstörung des Zahnhalteapparates findet nicht statt (KORNMAN et al., 1997B; SALVI et al., 1997). Die Gingivitis kann sehr lange stabil bleiben. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) bilden zusammen mit den Immunglobulinen einen effektiven Abwehrwall ge-

gen die pathogenen Mikroorganismen (KORNMAN et al., 1997b). Misslingt jedoch die Abwehr durch die PMN, so werden nachfolgend Immunabwehrmechanismen der zweiten Phase aktiv. Die Migration neutrophiler Granulozyten gerät ins Stocken, die Menge an Chemokinen sinkt. Monozyten bzw. Makrophagen werden vermehrt aus dem peripheren Blutzyklus rekrutiert und durchsetzen das parodontale Gewebe (SALVI et al., 1997).

3.2.2 Die zweite Phase der Immunabwehr - Etablierung der Parodontitis

Schlägt die Immunabwehr durch die PMN fehl, so können sich die Bakterien weiter vermehren, es findet eine definitive Etablierung einer subgingivalen Plaqueflora statt (MÜLLER, 2001, S. 37). Die Streptokokkenzahl nimmt ab, anaerobe Aktinomyzeten und gramnegative Kokken bzw. Stäbchen kolonisieren vermehrt die Plaque. Im Laufe der längerdauernden Entzündung kann dies zur Umwandlung des Saumepithels in das so genannte Taschenepithel führen. Dieses ist charakterisiert durch eine vermehrte Proliferationsrate im basalen Bereich und erhöhter Durchlässigkeit für größere Moleküle (MÜLLER, 2001, S. 34). Bakterien können somit vermehrt das Epithel durchsetzen, höhere Konzentrationen an bakteriellen Produkten, insbesondere der Lipopolysaccharide, und Entzündungsmediatoren sind im parodontalen Gewebe nachzuweisen.

Die erhöhte Konzentration an LPS führt an Endothelzellen der subepithelialen Blutgefäße zur Exprimierung zusätzlicher Integrine, unter anderem des „**Endothelial Cell Adhesion Molecule 1**“ (ECAM1). Analog zum ICAM1 bei den neutrophilen Granulozyten, führt das ECAM1 zur Diapedese von Monozyten, den Vertretern des retikuloendothelialen Systems (RES) (KORNMAN et al., 1997).

Die im Gewebe zu Makrophagen differenzierten Monozyten haben zwei Hauptfunktionen. Zum einen phagozytieren sie eingedrungene Bakterien und präsentieren CD4-Helferzellen bakterielle Antigene über MHC II-Komplexe. CD4-Helferzellen (Th1 und Th2) übernehmen die Regulation der zellvermittelten und humoralen Immunantwort über Zytokine. Nach erfolgter Antigenpräsentation synthetisieren CD4-Helferzellen neben makrophagenaktivierenden

(IL-2; Interferon- γ [IFN- γ]) und makrophagenhemmenden (IL-10, IL-4) Substanzen, auch proinflammatorische Zytokine (IL-1 β , TNF- α) (GEMMELL et al., 1997). IFN- γ gilt als der stärkste makrophagenaktivierende Faktor (ABBAS et al., 1996, S. 309). Desweiteren werden auch B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen zur Bereitstellung spezifischer Antikörper rekrutiert, die unter dem Einfluss von Th2-zellspezifischen Interleukinen (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12) zur Klonbildung angeregt werden (MÜLLER, 2001, S. 37; GEMMELL et al., 1997; LOEFFLER, 1999, S. 553). Die Synthese spezifischer Antikörper wird somit erleichtert. CD8 positive Zellen, also zytotoxische T-Zellen sind zwar im parodontalen Gewebe vorhanden, sind aber aufgrund ihrer geringen Zahl wohl unwesentlich an der Abwehr gegen die parodontopathogenen Mikroorganismen beteiligt (MÜLLER, 2001, S. 37).

Zum anderen werden die Makrophagen unter dem Einfluss bakterieller Toxine (LPS etc.) zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Enzyme angeregt. Hierzu zählen IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE₂ (Prostaglandin E₂). Daneben finden sich Matrixmetalloproteinasen (MMP 1 und 8) (TEMELES et al., 1993; VAN HEECKEREN et al., 1993; REYNOLDS, 1997), die erstmals zu einem massiven Abbau des kollagenen Anteils des parodontalen Gewebes (Knochen und Bindegewebe) führen. Unter dem Einfluss der proinflammatorischen Zytokine bilden jetzt auch neutrophile Granulozyten und parodontale Fibroblasten, die im Gesunden protektive Funktion haben, Matrixmetalloproteinasen (REYNOLDS & MEIKLE, 1997; PAGE et al., 1997).

Die so eingesetzte Gewebszerstörung findet ihr klinisches Äquivalent in der Vertiefung des gingivalen Sulcus und der Entstehung einer Zahnfleischtasche. Diese Veränderung zieht eine Verbesserung der Lebensbedingungen für die parodontopathogenen Mikroorganismen nach sich. Auf der einen Seite sind die überwiegend anaeroben Keime vor Sauerstoffzutritt geschützt, auf der anderen Seite sorgen die entzündlichen Prozesse wie bereits beschrieben, zur Steigerung der Sekretion der Sulcusflüssigkeit. Nährstoffe stehen den Bakterien nun vermehrt zur Verfügung (ISHIKAWA et al., 1997).

So wird der „critical pathway“ zum Teufelskreis: Die verbesserten Lebensbedingungen der Keime können für eine weitere Verstärkung des bakteriellen

Angriffs sorgen, die beschriebenen pathologischen Prozesse können erneut so lange ablaufen, bis der Zahnhalteapparat vollständig um die Zahnwurzel abgebaut ist. Zahnlockerung oder Zahnverlust sind die Spätfolge.

In diesem Modell des „critical pathway“ wird deutlich, dass an mehreren Stellen des Krankheitsprozesses Störungen Einfluss auf den weiteren Verlauf der Erkrankung nehmen können, nämlich immer dann, wenn das Gleichgewicht zwischen bakteriellem Angriff und Immunabwehr zugunsten der Bakterien verschoben wird. Ist das System der angeborenen Immunabwehr nicht in der Lage, bakterielle Produkte abzubauen, und bleiben diese somit in der parodontalen Tasche liegen, so kann das Entzündungsgeschehen chronisch weiter unterhalten werden. Bei akuten Exazerbationen führt dies zum weiteren Abbau von kollagenen Fasern und der tiefergelegenen Stützgewebe (PAGE et al., 1992).

Bakterielle Toxine leiten zwar die Immunabwehrreaktionen ein und ihre Anwesenheit ist Grundlage für das Fortbestehen der Entzündung, aber dennoch vermitteln endogene Substanzen die Entzündungsausbreitung und -aufrechterhaltung.

Makrophagen stellen die Hauptquelle für proinflammatorische Zytokine dar. Sie sind maßgeblich für die Regulation der Infektabwehr und der Gewebsdynamik verantwortlich (PAGE, 1991; ABBAS et al., 1996, S. 295; DANIEL & VAN DYKE, 1996; SALVI et al., 1997). Aus diesem Grund sollen diese Zellen nun näher betrachtet werden.

3.3 Erkennung von bakteriellen Toxinen

Makrophagen werden in erster Linie durch bakterielle Toxine (LPS, Proteoglykane etc.) aktiviert, zum Teil aber auch durch Immunkomplexe, CD4-positive T-Zellen, Zellverletzungen oder durch bereits freigesetzte Zytokine (ABBAS et al., 1996, S. 302). Makrophagenspezifische Zytokine werden unter Normalbedingungen nicht als präformierte Moleküle gelagert. Ihre Synthese benötigt eine vorübergehende Gentranskription (ABBAS et al., 1996, S. 290).

Diese Transkription wird unter anderem nach Bindung bakterieller Toxine eingeleitet. Diese setzt das Vorhandensein von spezifischen Rezeptoren voraus, die transmembranalen und die zytosolischen Toxin-Rezeptoren.

3.3.1 Toll-like-receptors (TLR) : transmembranale Toxin - Rezeptoren

Die *toll-like-receptors* gehören zur Familie transmembranal gelegener Rezeptoren, die bei *Drosophila* im Rahmen der Immunabwehr gegen Pilze eine Rolle spielen (INOHARA et al., 2001). Inzwischen sind bereits zehn verschiedene TLR-Subtypen beim Menschen identifiziert worden, wobei nur TLR2 und TLR4 in ihrer Funktion bei der Erkennung von bakteriellen Toxinen (LPS, Peptidoglykane, Lipoproteine und Lipoteichonsäuren) durch Monozyten/Makrophagen genau verstanden sind.

Die Synthese proinflammatorischer Zytokine wird unter anderem über den Weg des TLR4-MD2-CD14 Rezeptorenkomplexes vermittelt. Lipopolysaccharide werden nach der Bindung an das aus dem Blutplasma, also auch aus dem Sulcusfluid stammende LBP (LPS-bindendes Protein) von CD14 eingefangen (ADEREM & ULEVITCH, 2000; LORENZ et al., 2001; GUHA & MACKMAN, 2001). Durch die nachfolgende Anheftung an extrazelluläre, leucinreiche Domänen (leucin-rich-repeats: LRR) des TLR4 mit seinem akzessorischen Protein MD2 wird im Zytosol eine Enzymkaskade in Gang gesetzt, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B führt. Dadurch wird die Transkription der proinflammatorischen Zytokine unter anderem des IL-1, TNF- α , IL-6 und IL-8 eingeleitet (ADEREM & ULEVITCH, 2000; GUHA & MACKMAN, 2001). Andere bakterielle Pathogene, etwa Proteoglykane werden von TLR2 gebunden. Auch die dadurch in Gang gesetzte Enzymkaskade führt zur Aktivierung von NF κ B und stimmt mit der des TLR4 weitgehend überein (s.u. Abschnitt 4.4) (ALIPRANTIS et al., 1999; ALIPRANTIS et al., 2001; BOCH et al., 2001).

3.3.2 Die NOD-Familie (NOD1/NOD2): zytosolische Toxin-Rezeptoren

Neben den TLR existieren offensichtlich auch zytosolisch gelegene Toxin-Rezeptoren. Hierzu zählen NOD1 und NOD2. Beschrieben wurden diese spezifischen Rezeptoren erstmals in der Botanik (OGURA et al., 2001b). Hier spielen sie eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr gegen Bakterien, Viren und Pilze (INOHARA et al., 2001; OGURA et al., 2001b).

NOD1 wurde im Zusammenhang mit dem so genannten Apaf-1 entdeckt. Apaf-1 („**A**poptotic **p**rotease **a**ctivating **f**actor 1“) gleicht in seinem Aufbau dem so genannten CED-4 Protein, das für die Induktion der Apoptose, also den natürlichen Zelltod bei Würmern verantwortlich ist (INOHARA et al., 1999). Das Apaf-1 aktiviert durch Phosphorylierung die Procaspase 9. Dieses Enzym gehört zur Gruppe der Cystein-Proteasen, die zelluläre Proteine abbauen und somit wesentlich am Abbau von defekten Zellen beteiligt sind (YOSHIDA, 2003). Beim Menschen sind mehrere dieser Proteasen bekannt (INOHARA et al., 1999; YOSHIDA, 2003). Bei der Suche nach weiteren Aktivatoren der Cystein-Proteasen stieß man auf das NOD1 (INOHARA et al., 1999; INOHARA et al., 2000).

NOD1 und Apaf-1 ähneln sich stark in ihrem Aufbau und in ihrer Funktion. Beide werden in allen ausdifferenzierten Geweben gebildet. NOD1 ist aus 953 Aminosäuren zusammengesetzt. Dabei kann man verschiedene funktionelle Einheiten unterscheiden.

An ihrem N-terminalen Ende weisen sie eine so genannte „**C**aspase **R**ecruitment **D**omain“ (CARD) auf. Diese Region ist für die Bindung der inaktiven Vorstufen der apoptosespezifischen Enzyme verantwortlich und kann somit als Effektorregion bezeichnet werden. NOD1 bindet über diese Effektorregion nur Procaspasen, die über ähnlich aufgebaute CARD-Regionen verfügen. Es konnte eine Interaktion mit der Procaspase-9 nachgewiesen werden (INOHARA et al., 1999). Für die Bindung der Procaspasen ist neben der CARD-Region auch die daran angeschlossene „**N**ukleotide-**B**inding-**D**omain“ (NBD), die auch „NOD“- Domäne genannt wird, essentiell. Ein in der NOD-Region gelegener

„P-Loop“ ist für das Aktivierungspotential des NOD1 Proteins verantwortlich (s.u. Abb. 1).

Die CARD-Region des NOD1 stimmt auch mit der CARD-Region der so genannten RICK (**R**IP-like **I**nteracting **C**LARP **K**inase), auch Rip2 oder CARDIAK bezeichnet, überein. Dabei handelt es sich um eine Serin -Threonin Kinase, die sowohl die Apoptose, als auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB einleitet. NOD1 ist in der Lage, RICK über die CARD-Region zu binden und dadurch NFκB indirekt zu aktivieren. Der genaue biochemische Vorgang ist noch nicht geklärt (INOHARA et al., 1999; INOHARA et al., 2002).

An die zentrale NBD-Region des NOD1 folgen C-terminal 10, im Aufbau stark variierende, leucinreiche Domänen (**L**euclin-**R**ich-**R**epeats [LRR]). Im Gegensatz dazu findet sich bei Apaf-1 eine Sequenz mit 40 Aminosäuren, die typischerweise mit der Kombination Tryptophan-Aspartat (WD40) endet. Diese Region ist für die Hemmung der durch Apaf-1 initiierten Aktivierung der Procaspase-9 verantwortlich (INOHARA et al., 1999; INOHARA et al., 2000). Aus defekten Mitochondrien freigesetztes Cytochrom c, ein Triggersignal der Apoptose, bindet an die WD40 Region und erlaubt erst dann die Aktivierung der Protease. Die leucinreichen Domänen des NOD1 sind vermutlich, ähnlich wie bei den TLR, für die Bindung spezifischer bakterieller Toxine verantwortlich. So wurde nachgewiesen, dass NOD1 in Anwesenheit von Lipopolysacchariden verschiedener Bakterien *in vitro* zu einer verstärkten Aktivierung von NFκB und der Procaspase 9 führte (INOHARA et al., 2001). NOD1 scheint ein zytosolischer Rezeptor für Lipopolysaccharide zu sein.

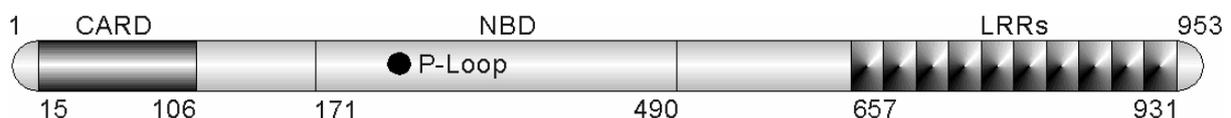


Abbildung 1: Struktur des NOD1 (in Anlehnung an INOHARA et al. , 1999)

OGURA et al. (2001b) stießen bei der Suche nach Genen, die für NOD1 homologe Proteine kodieren, auf ein Eiweiß, das zu 34 % der Aminosäuresequenz des NOD1 entsprach. In Chromosom 16 fand man eine Sequenz, die zur Ex-

pression eines Peptids führte, dessen NBD-Region signifikant mit der des NOD1 übereinstimmte. Aus diesem Grund wurde dieses Protein, zusammengesetzt aus 1040 Aminosäuren, als NOD2/CARD15 bezeichnet und der NOD1/Apaf-1-Familie zugeordnet. Im Gegensatz zu NOD1/Apaf-1, ist NOD2 nur bei Monozyten bzw. Makrophagen nachweisbar.

Der Hauptunterschied zwischen NOD1 und NOD2 liegt darin, dass NOD2 über zwei N-terminale CARD-Regionen verfügt, gefolgt von einer zentral gelegenen Nukleotidbindenden Region (NBD) mit integriertem P-Loop (siehe NOD1). C-terminal weist auch das NOD2 Protein eine Abfolge von 10 leucinreichen Domänen auf.

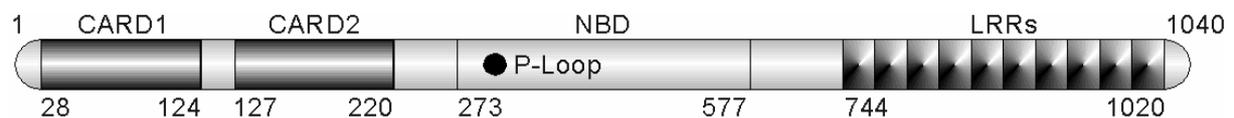


Abbildung 2: Struktur des NOD2 (in Anlehnung an OGURA et al., 2001b)

NOD2 ist wie NOD1 in der Lage den Transkriptionsfaktor NFκB nach Interaktion mit RICK zu aktivieren. Dafür sind im Fall des NOD2 beide CARD Regionen notwendig (OGURA et al., 2001 b). Die Procaspase 9 gilt, wie bei NOD1, auch bei NOD2 als Kopplungsagens der Apoptose (INOHARA et al., 2001).

Es wurde nachgewiesen, dass die von NOD2 abhängige NFκB Aktivierung durch Stimulation mit Lipopolysacchariden und Proteoglykanen ausgelöst werden konnte (INOHARA et al., 2001). Die Vermutung liegt nahe, dass hierfür die Domäne der LRR's verantwortlich ist, die bei den *toll-like-Rezeptoren* Protein-Protein Interaktionen ermöglicht. Welche molekularen Prozesse hinter der unterschiedlichen Erkennung von LPS und Proteoglykanen zwischen NOD1 und NOD2 stehen, ist noch unklar (OGURA et al., 2001b; INOHARA et al., 2001).

3.4 Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB und seine Auswirkungen

Der Transkriptionsfaktor NFκB, ein Protein-Dimer (p50/p60), liegt gebunden an ein Inhibitorprotein, das so genannte IκB, im Zytosol vor. Die Abspaltung dieses Enzyms erfolgt nach Phosphorylierung durch den Enzymkomplex IKK. Dabei handelt es sich um **IκB Kinasen (IKK)**, die sich aus den Untereinheiten IKKα, IKKβ und IKKγ zusammensetzt (ROGLER et al., 1998; OGURA et al., 2001b). IKKα und IKKβ sind für die Phosphorylierung zuständig, wobei IKKγ die regulatorische Untereinheit darstellt.

Nach Abspaltung des IκB gelangt das nun aktive NFκB in den Nukleus (s.u. Abb. 3). Hier interagiert NFκB mit Promotorregionen der DNA und führt zur Transkription mehrerer, für proinflammatorische Zytokine kodierender Gene: TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, **Makrophagen-CSF (Colony Stimulating Factor [MCSF])**, **Makrophagen-Granulozyten-CSF (MGCSF)**, **MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1)** und **ICAM1** (ROGLER et al., 1998). Das IL-1 lässt sich noch in zwei Untergruppen unterteilen: IL-1α und IL-1β, wobei IL-1 α nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft im Rahmen der Pathogenese marginaler Parodontitiden keine wichtige Rolle spielt (GEMMELL et al., 1997).

Die durch bakterielle Pathogene aktivierten TLR führen über das Kopplungsmolekül MyD88 (**Myeloid Differentiation factor 88**) nach Durchlauf mehrerer durch Kinasen getragener Reaktionen zur Aktivierung des NFκB. Dabei wird die IKKβ-Untereinheit des IKK-Komplexes durch Phosphorylierung aktiviert und führt folgend zur Abspaltung des IκB.

IL-1β bzw. TNF-α sind mit Hilfe eigener spezifischer Oberflächenrezeptoren gleichermaßen in der Lage, NFκB über den TLR-NFκB-Reaktionsweg zu aktivieren (autokrine oder parakrine Aktivierung)(GUHA et al., 2001). Sowohl bei IL-1β-Rezeptoren, als auch bei TNF-α-Rezeptoren dient MyD88 als Kopplungsmolekül. Die Reaktionswege überschneiden sich an der Stelle der IRAK (**IL-1 Receptor Associated Kinase**) mit dem Reaktionsweg der TLR (s.u. Abb. 3).

Daneben werden durch die TLR auch andere Transkriptionsfaktoren wie Elk-1, JNK und AP-1 aktiviert (GUHA et al., 2001; BOCH et al., 2001), auf die aber nicht näher eingegangen werden soll.

Unabhängig von dem über IRAK führenden Reaktionsweg kann NF κ B durch NOD2 aktiviert werden. Nach Interaktion mit RICK wird I κ B ebenfalls durch den IKK Komplex phosphoryliert und von NF κ B abgespalten (OGURA et al., 2001b; INOHARA et al., 1999). RICK scheint chemisch mit der IKK γ Untereinheit zu reagieren und dadurch die Abspaltung des I κ B zu erlauben (OGURA et al., 2001b). Man kann also von einem NOD2-RICK-NF κ B Reaktionsweg sprechen (INOHARA et al., 2001; s.u. Abb. 3).

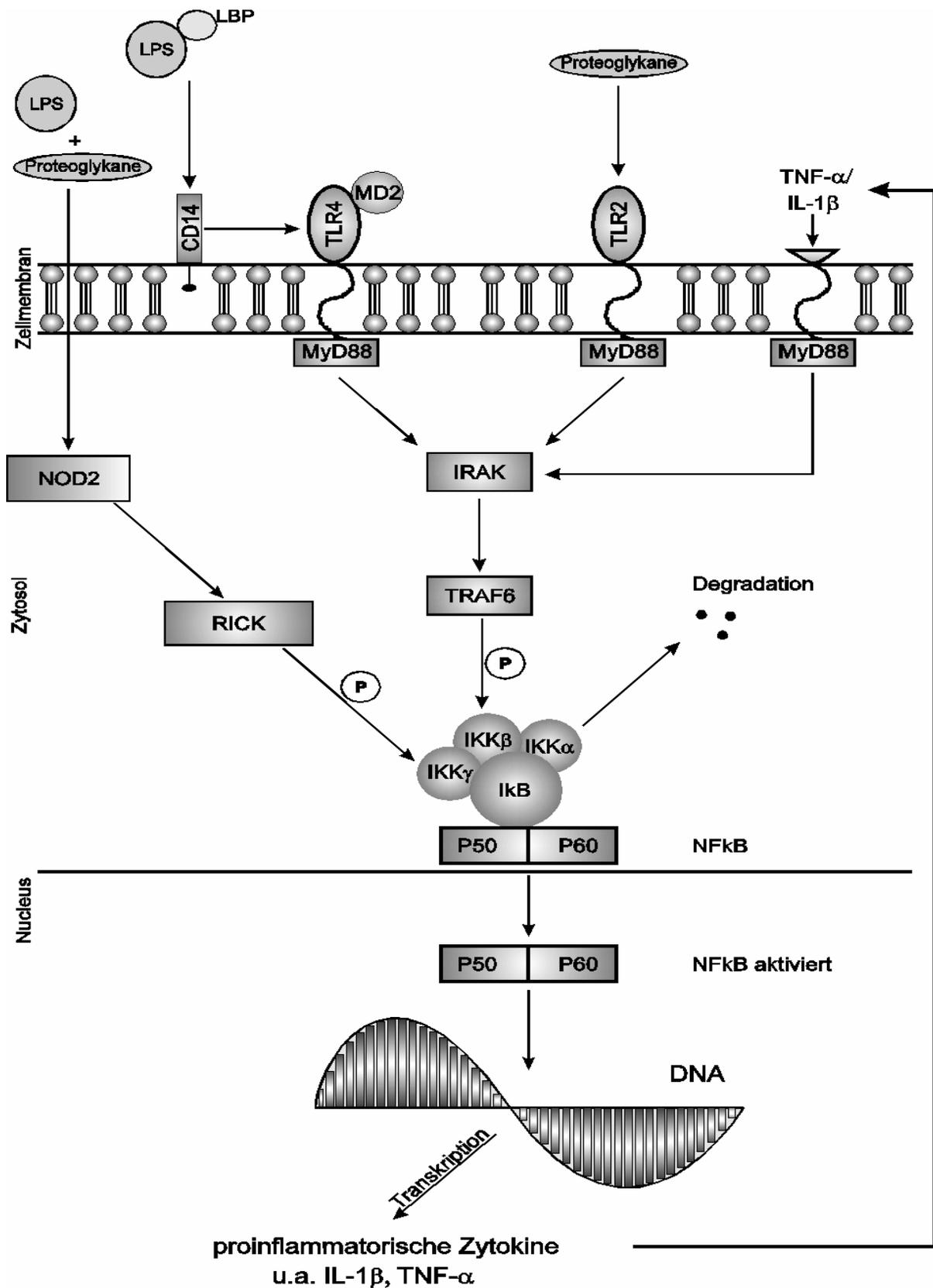


Abbildung 3: Schematische Darstellung der NF κ B Aktivierung durch bakterielle Toxine an Makrophagen (in Anlehnung an GUHA et al., 2000; VAN HEEL et al., 2001; BOCH et al., 2000).

[TRAF6: TNF-Receptor Associated Factor 6; P: Phosphorylierung]

Die freigesetzten proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β sind die Protagonisten des chronischen parodontalen Entzündungsgeschehens. Sie sind die Schlüsselregulatoren der Immunabwehr schlechthin, können aber auch, je nach Konzentration, gewebsschädigende Wirkung haben. Beide Zytokine wurden in erhöhter Konzentration im Sulcusfluid und im parodontalen Gewebe bei chronischen Parodontitiden nachgewiesen (SCHWARTZ et al., 1997; TERVAHARTIALA et al., 2001) und sind im Rahmen der Pathogenese wohl am besten erforscht (BOCH et al., 2000; SALVI et al., 1997; GEMMELL et al., 1997; WALKER et al., 2000). Die Wirkung der beiden Substanzen kann als synergistisch bezeichnet werden. Wie bei anderen Zytokinen auch, haben sie autokrine und parakrine Wirkung.

Unter physiologischen Bedingungen, das heißt, bei niedrigen Konzentrationen, liegt die Hauptfunktion der Zytokine in der Entzündungsförderung. Interleukin 1 β und TNF- α führen zur Expressierung von ICAM1 an Endothelzellen und Fibroblasten. Damit können weitere polymorphkernige Granulozyten in das Entzündungsgeschehen eingreifen. Außerdem fördern beide die Bildung von Prostaglandin E₂ durch Fibroblasten. PGE₂ führt an den subepithelialen Gefäßen zu Vasodilatation und erhöhter Permeabilität. Dies erleichtert somit auch die Leukodiapedese (GEMMELL et al., 1997; SALVI et al., 1997).

TNF- α und IL-1 β verursachen sowohl an Makrophagen selbst (autokrine Wirkung), als auch an Fibroblasten (parakrine Wirkung) die Freisetzung von IL-6. Plasmazellen werden unter dem Einfluss von IL-6 zu vermehrter Synthese von Immunglobulinen angeregt. TNF- α und IL-1 β können somit auch die humorale, adaptive Immunabwehr verstärken (GEMMELL et al., 1997).

Auf der anderen Seite sind IL-1 β und TNF- α für die Induktion destruktiver Prozesse am Zahnhalteapparat verantwortlich. Fibroblasten setzen nach deren Bindung Matrixmetalloproteinasen (MMP) und Prostaglandine E₂ frei. Die MMP leiten die Destruktion der extrazellulären Matrix der Gingiva und des Desmodonts ein (MÜLLER, 2001, S. 39; GEMMELL et al., 1997). Ferner wird unter Einwirkung der beiden Zytokine die regenerative Kollagenbildung durch Fibroblasten unterdrückt (BOCH et al., 2001).

PGE₂ aktiviert Osteoklasten und führt zur Resorption der Knochenmatrix des Alveolarfortsatzes. Darüber hinaus hemmt PGE₂ geweberegenerierende Prozesse und rückwirkend die Freisetzung von IL-1 β und TNF- α . Die Knochenresorption kann auch dadurch verstärkt werden, indem IL-1 β und TNF- α in hohen Konzentrationen die Formierung von Osteoblasten hemmen.

IL-1 β und TNF- α sind *in vitro* auch in der Lage die Differenzierung neuer Osteoklasten aus Vorläuferzellen zu fördern und Osteoklasten direkt zu aktivieren (PAGE 1991; SCHWARTZ et al., 1997). Im Gegensatz zu TNF- α führen große Mengen an IL-1 β zu keiner direkten Gewebsschädigung (ABBAS et al., 1996, S. 303). Das von Fibroblasten freigesetzte IL-6 wirkt wie PGE₂ auf Osteoklasten stimulierend und verstärkt somit auch die Knochenresorption (DENNISON & VAN DYKE, 1997).

Werden übermäßig große Mengen der über den NF κ B-Weg synthetisierten Zytokine freigesetzt, so können akute Exazerbationen, d.h. Gewebeverluste auftreten. Klinisch spricht man von aktiven Taschen (Blutung auf Sondierung s.u. Kapitel 9.1; BOCH et al., 2001). Erhöhte IL-1 β -, TNF- α - und PGE₂-Spiegel werden mit verstärktem Gewebeverlust und aktiven Entzündungsherden assoziiert (PAGE et al., 1997).

4. Risikofaktoren der Parodontitis

4.1 Klassifikation

Die Pathogenese marginaler Parodontitiden und Entstehung verschiedener Formen der Parodontitis sind abhängig sowohl von Umweltfaktoren, als auch von individuellen, respektive genetischen Veränderungen. So lässt sich auch die Etablierung unterschiedlicher Krankheitsformen (aggressiv-chronisch, s.o. Kapitel 2) erklären. Die parodontale Erkrankung wurde bereits mit mehreren Risikofaktoren in Verbindung gebracht. Von GENCO (1996) stammt der Vorschlag, Risikofaktoren in drei Gruppen zu unterteilen.

Die Einflussgrößen, deren pathogenetischer Einfluss durch kontrollierte Studien nachgewiesen ist, werden als echte Risikofaktoren bezeichnet. Zusätzlich sollte abgesichert sein, dass durch geeignete Therapieansätze die Wirkung

der Einflussgröße aufgehoben werden kann. Zu dieser Gruppe zählen chronischer Nikotinabusus und insuffizient eingestellter Diabetes mellitus (MÜLLER, 2001, S. 209). So erhöht zum Beispiel Rauchen das Risiko an einer Parodontitis zu erkranken um das 5- bis 7- fache (PAGE et al., 1997). Tabakkonsum reduziert unter anderem die Menge an IgG und begünstigt somit den bakteriellen Angriff (HART & KORNMAN, 1997).

Neben den echten Risikofaktoren gibt es Risikomarker. Die Wirkung dieser Einflussgrößen auf die Pathogenese wird aufgrund von Fallberichten vermutet. Sie muss aber letztlich noch durch Longitudinalstudien bestätigt werden. Zu den Risikomarkern zählen neben Osteoporose, HIV-Infektion und psychosozialen Stress vor allem genetische Defekte in Form von Polymorphismen (SALVI et al., 1997).

Zur dritten Gruppe zählen die so genannten Hintergrundfaktoren, deren Einfluss auf die Pathogenese bewiesen, aber nicht durch therapeutische Mittel zu beeinflussen ist. Als Hintergrundfaktoren gelten das Alter und Geschlecht (Männer höheres Risiko als Frauen).

4.2 Polymorphismen im Zusammenhang mit marginalen Parodontitiden

Die Immunabwehrreaktion des Wirtes gegenüber parodontopathogenen Mikroorganismen ist individuell sehr verschieden. Allgemeinerkrankungen, die mit Immundefekten einhergehen, führen zu erhöhter Anfälligkeit (HIV, Diabetes mellitus). Eine genetische Prädisposition für chronische Parodontitiden wird schon lange Zeit unabhängig davon diskutiert (HART & KORNMAN, 1997; MICHALOWICZ et al., 2000). In diesem Zusammenhang sind Polymorphismen mit der Pathogenese marginaler Parodontitiden assoziiert worden.

In vielen Genen des menschlichen Genoms sind im Lauf der Generationen sogenannte DNA-Polymorphismen entstanden. Sie basieren auf Punktmutationen in Genen (Substitution, Insertion, Deletion von Basenpaaren), die für sich alleine keine schwerwiegenden Folgen für das Genprodukt haben, aber unter anderem für die Individualität verantwortlich sind. Für sich alleine sind Polymorphismen nicht krankheitsinduzierend, jedoch geht man davon aus, dass

sie unterschiedliche individuelle Reaktionen auf Umwelteinflüsse erklären könnten (LOEFFLER, 1999, S. 22).

In Verbindung mit marginalen Parodontitiden wird vermutet, dass Polymorphismen sowohl unter qualitativen, als auch quantitativen Aspekten die Immunabwehr des Wirts bezogen auf parodontopathogene Keime beeinflussen können (HART & KORNMAN 1997). GENCO (1996) zählt die Polymorphismen zu den Risikomarkern.

Inadäquate oder übersteigerte Abwehrreaktionen, die unter anderem mit verstärktem Verlust parodontalen Gewebes in den akuten Phasen der chronischen Parodontitis einhergehen, werden mit Defekten der phagozytierenden Zellen in Verbindung gebracht. Es liegen zum momentanen Zeitpunkt erst wenige Untersuchungen über den Zusammenhang von Polymorphismen und chronischen Parodontitiden vor.

Die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch Makrophagen ist genetisch bedingt (SALVI et al., 1997). In diesem Zusammenhang stellten KORNMAN et al. (1997) und LAINE et al. (2002) einen Polymorphismus in dem für IL-1 β kodierenden Gen auf Chromosom 2 fest (+3952), der sowohl bei Rauchern, als auch bei Nichtrauchern mit schweren Formen der chronisch marginalen Parodontitis in Verbindung gebracht werden konnte. Dieser Polymorphismus wurde auch mit der aggressiven, juvenilen Parodontitis assoziiert (WALKER et al., 2000).

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten zählen wie Makrophagen zu den phagozytierenden Zellen. Die PMN binden mit ihren Fc Rezeptoren Immunglobuline. Es wurde gezeigt, dass der Fc γ RII (CD32) Rezeptor die Fc Region der Immunglobuline IgG₂ bindet (s.o. Kapitel 3.2.1). Somit können die PMN die durch IgG₂ opsonierten Bakterien erkennen und abbauen. Auf Chromosom 1 wurde das für diesen Rezeptor kodierende Gen lokalisiert und zwei verschiedene Allelformen identifiziert: Fc γ -RIIa-131-R und Fc γ -RIIa-131-H, wobei nur der letztgenannte effektiv IgG₂ erkennen kann. Dieser Polymorphismus wurde mit frühbeginnenden Parodontitis-Formen (aggressiv) in Verbindung gebracht (HART & KORNMAN, 1997).

SUGITA et al. (2001) assoziierten einen Polymorphismus des IgG Rezeptors FcγRIIIb (CD16) mit chronischen Parodontitiden. In diesem Gen existieren ebenfalls zwei verschiedene Allelformen (NA1 und NA2). Träger des FcγRIIIb-NA1 Allels scheinen nach SUGITA et al. (2001) gegenüber der Etablierung einer chronischen Parodontitis resistenter zu sein.

Das Interleukin-2 wird von T-Helferzellen freigesetzt und führt sowohl zur Aktivierung von Makrophagen, als auch zur Klonbildung der B-Lymphozyten. Auch hier wurde ein Polymorphismus (-330) in Zusammenhang mit schweren Formen der chronischen Parodontitis gebracht (SCAREL-CAMINAGA et al., 2002).

4.3 Polymorphismus des NOD2/CARD15-Gens

Das für NOD2/CARD15 kodierende Gen wurde auf Chromosom 16q12 lokalisiert. OGURA et al. (2001b) konnten in diesem Gen 12 Exons, die kodierenden Sequenzen, nachweisen.

Wie bereits beschrieben, sind die leucinreichen Domänen des NOD2 offensichtlich für die Erkennung der bakteriellen Toxine und die damit verbundene Aktivierung des NFκB verantwortlich. Im NOD2/CARD15-Gen wurde in mehreren Studien im Zusammenhang mit der chronisch entzündlichen Magen-Darm-Erkrankung Morbus Crohn eine Punktmutation beschrieben. An der Nukleotidstelle 3020 in Exon 11 wurde eine zusätzliche Insertion der Pyrimidinbase Cytosin nachgewiesen (HUGOT et al., 2001; OGURA et al., 2001a; HAMPE et al., 2001). Sie wurde als 3020insC Mutation bezeichnet. Die zusätzlich eingefügte Base führt zur Bildung eines Stop-Codons an der Aminosäurestelle 1007 (HAMPE et al., 2001). Dem so entstandenen NOD2 Protein fehlen folglich die letzten 33 C-terminalen Aminosäuren der leucinreichen Domäne. Damit besteht das verkürzte NOD2 nur aus 1007 Aminosäuren (CHO, 2001).

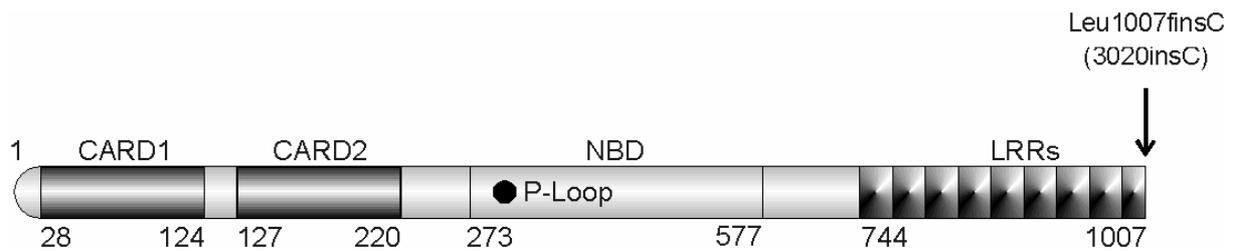


Abbildung 4: Struktur der mutierten Form des NOD2 (3020insC) (in Anlehnung an CHO, 2001).

In vitro führte dieses defekte Protein nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (INOHARA et al., 2001; OGURA et al., 2001a) zu einer signifikant verminderten Aktivierung des NFκB im Vergleich zu Zellen mit unverändertem Protein (Wildtyp). Folglich ist die Bildung der proinflammatorischen Zytokine u.a. TNF-α reduziert.

Neben der 3020insC Mutation existieren noch zwei weitere Polymorphismen (R702W; G908R), die zwar auch mit Morbus Crohn in Zusammenhang stehen, aber in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurden (CHO, 2001), da diese eine deutlich geringere pathogenetische Rolle spielen.

5. Ziele der Untersuchung

Die 3020insC Mutation des NOD2/CARD15 Gens führt *in vitro* zu einer verminderten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB. Nachdem die Destruktion parodontalen Stützgewebes vor allem über proinflammatorische Zytokine vermittelt wird, könnte die 3020insC Mutation des NOD2 Gens im Zusammenhang mit der Pathogenese chronischer Parodontitiden stehen.

In der vorliegenden Studie soll die Prävalenz der 3020insC Mutation des NOD2/CARD15 Gens bei Patienten mit chronischer Parodontitis bestimmt werden.

6. Material und Methoden

6.1 Studienpopulation

6.1.1 Auswahl der Untersuchungsgruppe

Als Probanden standen 80 Patienten aus der Abteilung für Zahnerhaltung und Parodontologie der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung (P1-P80). Patienten mit systemischen oder medikamentenpflichtigen Erkrankungen (Diabetes mellitus, immunsupprimierte Patienten, Endokarditis Risikopatienten) sowie Schwangere wurden in die Stichprobe nicht aufgenommen. Raucher wurden ebenfalls ausgeschlossen.

Die Diagnose „generalisierte chronische Parodontitis“ wurde anhand folgender klinischer Befunde gestellt (Formblatt s. Anhang, Abb. 19):

- a. Messung der Taschensondierungstiefen (TST) an sechs Stellen pro Zahn (mesio-bukkal, medio-bukkal, disto-bukkal, mesio-oral, medio-oral, disto-oral). Die Taschentiefe wurde vom Gingivarand bis zum Sulcusboden in Richtung der Zahnachse mit einer Parodontalsonde (PCP 10, Hu-Friedy Europe, Leimen) gemessen.
- b. Registrierung von Blutung auf Sondierung (BOP)
- c. Messung des Furkationsbefalls mit Hilfe einer Nabers-Sonde PQ2N (Hu-Friedy Europe, Leimen), vom Eingang der Furkation benachbarter Wurzeln bis zum Defektende in horizontaler Richtung. Der Grad des Furkationsbefalls wurde nach der Einteilung von NYMAN & LINDHE (1997) angegeben (Grad I – Grad III).
Grad I: horizontaler Attachmentverlust bis 3 mm
Grad II: horizontaler Attachmentverlust von mehr als 3 mm, nicht durchgängig
Grad III: durchgängige Furkation
- d. Bestimmung der Zahnbeweglichkeit mit Hilfe zweier Instrumentengriffe:
Grad I: Krone bis ca. 1 mm auslenkbar
Grad II: Krone mehr als 1 mm auslenkbar

Grad III: Zahn bewegt sich auf Lippen- und Wangendruck, auch in axialer Richtung

- e. Zusätzlich wurde der horizontale und vertikale Knochenabbau anhand eines aktuellen Orthopantomogramms beurteilt.

Zur Klassifizierung als generalisierte Form der Parodontitis mussten folgende Kriterien erfüllt sein:

1. Mindestens 15 Zähne in situ
2. ≥ 8 Zähne mit einer Taschensondierungstiefe (TST) von ≥ 5 mm an mindestens einem Messpunkt pro Zahn oder Furkationsbefall \geq Klasse II
3. Klare Zeichen für Knochenverlust durch die Distanz zwischen Limbus alveolaris und der Schmelz-Zement Grenze ≥ 3 mm zirkulär um den betroffenen Zahn

Die Patienten der Untersuchungsgruppe wurden auch noch nach der klinischen Ausprägung der Parodontitis in drei Gruppen (milde, moderate und schwere Parodontitis) unterteilt. Die Auswahlkriterien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

	Parodontitis (mild)	Parodontitis (moderat)	Parodontitis (schwer)
maximale TST	6 mm	8 mm	> 8 mm
Attachmentverlust > 30 %	≤ 5 Zähne	≤ 8 Zähne	≥ 5 Zähne
Attachmentverlust > 50 %	-	≤ 5 Zähne	≥ 8 Zähne
weibliche Probanden	13	14	9
männliche Probanden	11	18	15
Gesamtzahl der Probanden	24	33	24

Tabelle 1: Klassifikation nach dem Schweregrad der Parodontitis

6.1.2 Auswahl der Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe standen 127 gesunde, ethnisch zur Untersuchungsgruppe passende Probanden zur Verfügung (1N-127N).

Die Diagnose wurde ausschließlich durch klinische Befunde gestellt (s. o. Parodontalstatus). Aus gesundheitlichen bzw. ethischen Gründen war eine Röntgenaufnahme nicht zumutbar.

Um in die Kontrollgruppe aufgenommen zu werden, mussten folgende Kriterien erfüllt sein:

1. Minimum 22 Zähne in situ
2. Nicht mehr als ein Messpunkt mit einer TST von ≥ 3 mm
3. Kein Zahn mit Furkationsbefall

6.1.3 Goldstandards

Als Goldstandards für den Nachweis des Polymorphismus wurden drei bereits früher durch Sequenzierung genotypisierte DNA-Proben verwendet (siehe Radlmayr et al., 2002). Im einzelnen waren dies ein homozygoter Wildtyp (wt/wt) [DM], ein heterozygoter Genotyp (wt/3020insC) [MC11] sowie ein homozygot mutierter Genotyp (3020insC/3020insC) [MC84]. Diese drei Proben wurden bei jedem Restriktionsverdau als Kontrollen mitanalysiert (s.u. Abschnitt 6.2.8).

6.2 Allgemeine Beschreibung der Methoden

6.2.1 Blutentnahme

Von jedem Patienten wurden 9 ml venöses Blut aus der Armbeuge abgenommen. Dazu wurden sterile Röhrchen (Monovette[®], Sarstedt, Nümbrecht) mit 1,6 mg Kalium-EDTA-Lösung pro ml Blut verwendet.

6.2.2 Aufarbeitung des Blutes

Die Blutproben wurden auf zwei verschiedene Arten weiterverarbeitet.

1. Das entnommene Vollblut wurde 10 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert und das überstehende Plasma abgenommen. Der sich auf dem Erythrozytensediment befindende Buffycoat (Leukozyten und Thrombozyten) wurde abpipettiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß umgefüllt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20° C.
2. Nach Abnahme des Plasmas, wie unter 1. beschrieben, wurde das Erythrozytensediment samt Buffycoat (Volumen etwa 5 ml) in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit Erylysepuffer auf 12 ml aufgefüllt. Es erfolgte eine Inkubation von etwa 10 Minuten, bis die Erythrozyten vollständig lysiert waren. Die Lyse wurde dadurch erkennbar, dass die Lösung klar und durchsichtig wurde. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 2000 rpm waren die Leukozyten sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 3 ml Erylysepuffer resuspendiert und für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment in 1 ml Erylysepuffer resuspendiert, in ein 1,5 ml Gefäß überführt und in einer Tischzentrifuge für 5 Minuten bei 5000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst komplett abgenommen und verworfen. Das Leukozytensediment wurde entweder bei -20° C aufbewahrt oder gleich zur DNA-Isolierung nach der Aussalzmethode weiterverarbeitet (s.u. Abschnitt 6.2.3.2).

Zusammensetzung:

Erylysepuffer (Apotheke Innenstadt Universität München):

155 mM NH₄Cl

400 mM NaCl

1 mM Na₂EDTA

6.2.3 DNA-Isolierung

6.2.3.1 DNA-Isolierung mit Hilfe des QIAamp[®] Blood Midi Kit

Es wurden 200 µl Proteinase K (20 mg/ml, Qiagen) in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt, 2 ml des zuvor bei Raumtemperatur aufgetauten Blutes/ Buffycoats zugegeben und kurz gemischt. Nach Zugabe von 2,4 ml Puffer AL wurde mindestens dreimal für je 5 Sekunden auf dem Vortex-Schüttler gemischt und die Lösung im Wasserbad für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 2 ml absolutem Ethanol und die Durchmischung mittels Vortex-Schüttler. 3 ml der Lösung wurden auf eine sich in einem 15 ml Sammelröhrchen befindende Säule geladen und die Säule danach für 3 Minuten bei 1850 rpm (1850 g) zentrifugiert. Nach Verwerfen des Filtrats wurde der Rest der Lösung auf die Säule geladen und in gleicher Weise zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Im weiteren Verlauf erfolgten zwei Waschschrte. Im ersten Waschschrte wurden 2 ml Puffer AW1 auf die Säule geladen, für 1 Minute bei 5000 rpm (4500 g) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im zweiten Waschschrte wurden 2 ml Puffer AW2 auf die Säule geladen, für 15 Minute bei 5000 rpm (4500 g) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Elution der DNA wurde die Säule in ein neues sauberes 15 ml Zentrifugenröhrchen plziert und 300 µl Puffer AE direkt auf die Membran der Säule aufgetragen. Nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 5000 rpm (4500 g). Um die Ausbeute bei möglichst hoher Konzentration zu erhöhen, wurde das Filtrat erneut auf die Säule aufgetragen und die Zentrifugation wiederholt. Die so gewonnene DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

6.2.3.2 DNA-Isolierung nach der Aussalzmethode

Ausgangsmaterial waren die aus 9 ml Blut isolierten Leukozyten (s.o. Abschnitt 6.2.2). Die Zellen wurden in 5 ml Kernlysepuffer durch Auf- und Abpipettieren sowie Mixen auf dem Vortex-Schüttler lysiert. Zur Degradation von Membran- und Proteinanteilen wurden SDS (Endkonzentration 1 %) und Proteinase K (Endkonzentration 0,2 mg/ml) zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C für mindestens drei Stunden, meist aber über Nacht. Während dieser Inkubation wurde öfter kräftig auf dem Vortex-Schüttler gemixt, um die DNA zu scheren und besser in Lösung zu bringen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die DNA sich vollständig gelöst hatte und nicht als geleeartiges Aggregat vorlag, da sie sonst bei den weiteren Schritten verloren gegangen wäre. Um sie vollständig in Lösung zu bringen, wurde das Volumen an Kernlysepuffer gegebenenfalls erhöht und die Inkubation bei 37°C verlängert. Zur Fällung der anderen Zellbestandteile (Proteine, Membranen) wurde $\frac{1}{3}$ Volumen 5 M NaCl-Lösung zugeben, kräftig gemixt und für mindestens 30 Minuten bis maximal 12 Stunden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 3000 rpm wurde der Überstand abpipettiert und nochmals 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand dieses Zentrifugationsschrittes wurde in ein neues Röhrchen überführt, mit 0,6 ml Isopropanol versetzt und langsam gemischt. Die fadenförmig ausgefallene DNA wurde mit einer automatischen 200- μ l-Pipette außen auf deren Spitze aufgenommen und zweimal in 70%igem Ethanol gewaschen. Zur Trocknung wurde die DNA von der Spitzen in einem 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß an dessen Wand abgestreift. Die getrocknete DNA wurde je nach Menge in 50-300 μ l bidestilliertem und autoklaviertem Wasser gelöst. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20 °C.

Zusammensetzung:

Kernlysepuffer (Apotheke Innenstadt Universität München):

10 mM Tris/HCl pH 8 NaCl: 5 M
400 mM NaCl
10 mM EDTA

SDS (Qiagen, Hilden, Deutschland): 20 %

Proteinase K (Qiagen, Hilden, Deutschland): 20 mg/ml

6.2.4 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, bei der diese ein Absorptionsmaximum aufweisen. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz lässt sich aus dem gemessenen Extinktionswert die Konzentration berechnen.

$$c = E_{260 \text{ nm}} \times f / (\epsilon \times d)$$

c = Konzentration (ng / μ l)

$E_{260 \text{ nm}}$ = gemessener Extinktionswert bei 260 nm

f = Verdünnungsfaktor

d = Schichtdicke (1 cm)

ϵ = Extinktionskoeffizient:

ds DNA: $50^{-1} \mu\text{l} / \text{ng}$

(RNA: $40^{-1} \mu\text{l} / \text{ng}$)

(Oligonukleotide: $30^{-1} \mu\text{l} / \text{ng}$)

Es wurden Verdünnungen von 1:5 bis 1:20 für die Messung verwendet, so dass die Messwerte für die Extinktion zwischen 0,1 und 1 lagen, da nur in diesem Bereich ein linearer Zusammenhang zwischen Extinktion und Konzentration besteht. Die Messung erfolgte in einem Photometer Modell Gene Quant Pro RNA/DNA Calculator[®] (Amersham Pharmacia).

6.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR kann eine bestimmte Zielsequenz einer komplexen genomischen DNA oder bei der RT-PCR eine bestimmte cDNA selektiv exponentiell amplifiziert werden. Die Methode besitzt eine hohe Sensitivität, es reichen wenige Kopien der Zielsequenz als Vorlage aus. Zusätzlich weist sie eine hohe Spezifität auf, eine selektive Amplifizierung einer einzelnen Sequenz unter Millionen verschiedener Sequenzen ist möglich. Dazu müssen sich zwei zu je einem der beiden Stränge des DNA-Doppelstrangs komplementäre und mit ihren 3'-Enden aufeinander zu orientierte, etwa 15–25 Basen lange Oligonukleotide als Primer an die zuvor denaturierte DNA binden. Dadurch kann eine hitzestabile DNA-Polymerase den zwischen den Primern gelegenen Abschnitt amplifizieren. Zur Minimierung des Auftretens unspezifischer Amplifikate kann eine Heißstart Taq-DNA-Polymerase verwendet werden, welche hitzelabile Schutzgruppen trägt und erst durch eine Erhitzung auf 95 °C aktiviert wird. Dieser zyklische Prozess aus Denaturierung, Primeranlagerung („Primer-Annealing“) und Extension wurde so oft wiederholt, bis die Zielsequenz zum Nachweis ausreichend vervielfältigt war. Anfangs erfolgte eine einmalige Anfangsdenaturierung von 5-15 Minuten je nach verwendeter Taq-DNA-Polymerase. Danach folgt die beschriebene Amplifikation 30-40 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 94 °C für 30 Sekunden, Primeranlagerung bei der für das betreffende Primerpaar optimalen Temperatur für ebenfalls 30 Sekunden sowie die Extension bei 72 °C für eine von der Länge des Amplifikats abhängigen Dauer, mindestens jedoch 30 Sekunden. Der letzte Schritt ist die Endextension bei 72 °C für 10 Minuten, bei der alle noch nicht komplett amplifizierten PCR-Produkten vervollständigt werden sollen. Der PCR-Ansatz setzt sich zusammen aus einem PCR-Puffer, einem Mix aus den vier Deoxinukleotidtriphosphaten (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), den beiden für die Zielsequenz spezifischen Oligonukleotid-Primern, Magnesiumchloridlösung zur Einstellung der durch Austestung ermittelten optimalen Mg^{2+} -Konzentration, der Taq-DNA-Polymerase, destilliertem Wasser zur Einstellung des Gesamtvolumens sowie

der als Matrize dienenden Ausgangs-DNA. Bei jedem PCR-Ansatz wurde eine Negativkontrolle mit Wasser anstatt der Ausgangs-DNA mitgeführt.

6.2.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient zur horizontalen Auftrennung von Doppelstrang-DNA nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld, während bei einzelsträngigen Nukleinsäuren die Sekundärstruktur zusätzlich eine Rolle spielt. Durch Vergleich mit einem Molekulargewichts-Standard (Leiter) kann die Größe ermittelt und die Konzentration grob abgeschätzt werden. Zusätzlich ist eine präparative Gewinnung eines bestimmten DNA-Fragments durch Ausschneiden der entsprechenden Bande aus dem Gel nach erfolgter Auftrennung und anschließende Aufreinigung möglich. Sichtbar werden die Banden durch Interkalation des orange fluoreszierenden Farbstoffs Ethidiumbromid, der zur Gellösung und/oder zum Laufpuffer zugegeben wird. Verwendet werden eine Agarosekonzentrationen von 1 – 2,5 % (w/v) je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente. Im einzelnen werden folgende Konzentrationen verwendet:

Länge der DNA-Fragmente	Agarosekonzentration
> 500 bp	1 %
200 - 500 bp	1,5 %
< 200 bp	2,5 %

Tabelle 2: Übersicht über die Agarosekonzentration

Die entsprechende Menge Agarose (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in 200 ml 1 × Laufpuffer wurde durch Kochen in einem Mikrowellenofen vollständig gelöst, 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Sigma) zugegeben und gemischt. Zwei Gelkämme mit 20 Zähnen wurden eingesetzt. Nach Erstarren wurden die Kämme vorsichtig gezogen und das Geltablett in die mit 1 × Laufpuffer gefüllte Gelkammer gestellt. Die DNA-Probe wurde mit Auftragspuffer

gemischt und aufgetragen. Zusätzlich wurden in einer am Rand gelegenen Spur 20 µl einer 100 bp-Leiter (Biozym, Hessisch Oldendorf) als Größenstandard aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei 100 Volt für zwei Stunden. Das Gel wurde schließlich auf dem Transilluminator betrachtet und photographiert.

Zusammensetzung:

Laufpuffer (Apotheke Innenstadt Universität München):

1 × TBE mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid

10 × TBE (Apotheke Innenstadt Universität München):

890 mM Tris

890 mM Borsäure

20 mM EDTA pH 8

6 × Auftragspuffer (Apotheke Innenstadt Universität München):

10 mM Tris/HCl pH 8

2 mM EDTA

20 % Ficoll 400

0,25 % Orange G

6.2.7 Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus (RFLP) – Analyse

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die von Bakterien synthetisiert werden und spezifisch DNA-Sequenzen erkennen und schneiden. Dabei wird zwischen Typ-I-, Typ-II- und Typ-III-Restriktionsendonukleasen unterschieden. Breite Anwendung finden vor allem die Typ-II-Restriktionsendonukleasen. Diese erkennen Palindrome und schneiden an genau definierten Positionen innerhalb der Erkennungssequenz. Palindrome sind in diesem Zusammenhang Sequenzen, welche mit ihrer Komplementärsequenz identisch sind. Liegt ein bestimmter Polymorphismus innerhalb einer Erkennungsstelle für ein bestimmtes Restriktionsenzym, so lässt er sich durch Restriktion (Verdau) eines PCR-Amplifikats nachweisen, welches die polymorphe Nukleotidposition beinhaltet. Ist keine komplette Erkennungsstelle vorhanden, kann durch einen in einzelnen Nukleotiden von der originalen Sequenz abweichende Primersequenz eine solche Erkennungsstelle in der PCR eingeführt werden. Voraus-

setzung dafür ist, dass in unmittelbarer Nachbarschaft der zu untersuchenden polymorphen Nukleotidposition eine zur Generierung einer Erkennungsstelle passende Sequenz vorliegt, die der Erkennungsstelle für ein bestimmtes Restriktionsenzym ausreichend ähnlich ist. Dabei muss die Nukleotidposition Teil der entsprechenden Erkennungsstelle sein (Erläuterung am Beispiel der 3020insC-Mutation des NOD2-Gens s.u.). Der Ansatz für einen Restriktionsverdau beinhaltet einen bestimmten Puffer, das Restriktionsenzym sowie das zu verdauende PCR-Produkt. Es erfolgt eine Inkubation bei einer für jedes Enzym spezifischen Temperatur für mindestens zwei Stunden, meist jedoch über Nacht. Zur Visualisierung der entstandenen Restriktionsfragmente wird eine Agarosegelelektrophorese vorgenommen.

6.2.8 Genotypisierung des NOD2/CARD15-Gens in Bezug auf die 3020insC-Mutation

Ziel der Untersuchung war der Nachweis der 3020insC-Mutation im NOD2/CARD15-Gen. Diese Mutation besteht aus der Insertion eines C/G-Basenpaares an der Nukleotidposition 3020. Verwendet wurde eine PCR mit RFLP-Analyse. Entsprechend der umliegenden Sequenz wurde als Restriktionsenzym MwoI (New England Biolabs, Beverly, MD, USA) ausgewählt, dessen Erkennungssequenz ein unterbrochenes Palindrom der Sequenz GCNNNNN/NNGC ist, dabei bedeutet N jede beliebige Base, der Schnitt erfolgt zwischen den Nukleotiden sieben und acht der Erkennungssequenz. Das erste GC ist in der Originalsequenz vorhanden, während das zweite GC über den 3'-Primer in der PCR eingeführt wird. Dabei ist die Einführungsstelle so gewählt, dass die Erkennungssequenz nur dann entsteht, wenn die beschriebene Insertion vorliegt. Liegt im Falle des Wildtyps die Insertion hingegen nicht vor, entsteht statt der Erkennungssequenz GCN₇GC die Sequenz GCN₆GC, die keine Erkennungsstelle für das Enzym MwoI darstellt.

Folgende Primer wurden verwendet (Hersteller: TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland):

5'-Primer	GGCTAACTCCTGCAGTCTCTTTAACTGG
3'-Primer	ACTTCCAGGATGGTGTTCATTCC <u>GC</u> CTCAAGG

Die zwei unterstrichenen Basen im 3'-Primer entsprechen nicht der Originalsequenz, sie dienen der Einführung der Erkennungsstelle für MwoI.

Verwendet wurden die HotStar™ Taq-DNA-Polymerase von Qiagen (Hilden, Deutschland) und der dNTP-Mix von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland). Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Reagens	Konzentration (Stammlösung)	Endkonzentration	Volumen
PCR-Puffer	10 x	1 x (=1,5 mM MgCl ₂)	2,5 µl
dNTP-Mix	10 mM	0,2 mM	0,5 µl
5'-Primer	10 µM	0,25 µM	0,625 µl
3'-Primer	10 µM	0,25 µM	0,625 µl
DNA-Polymerase	5 U/ µl	0,025 U/ µl	0,125 µl
MgCl ₂	25 mM		1,5 µl
H ₂ O			17,875 µl
Summe			23,75 µl
DNA	100 ng/µl		1,25 µl
Endvolumen			25 µl

Tabelle 3: PCR- Ansatz

Die PCR wurde in dem Thermocycler UNO Thermoblock, BIOMETRA[®], (Göttingen, Deutschland) unter folgenden Bedingungen:

	Zyklenzahl	Zyklendauer	Temperatur
Anfangsdenaturierung	1	15 Minuten	95 °C
Denaturierung		30 Sekunden	94 °C
Primeranlagerung	35	30 Sekunden	55 °C
Extension		30 Sekunden	72 °C
Endextension	1	10 Minuten	72 °C

Tabelle 4: PCR - Zyklen

Um den Erfolg der PCR zu kontrollieren, wurden Stichproben der Amplifikate vor dem Restriktionsverdau mittels Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht. Die Gelkonzentration war 2,5 %. Es wurden jeweils 8 µl des PCR-Ansatzes gemischt mit 8 µl 1:1 verdünntem Auftragspuffer auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurden 20 µl der 100 bp-Leiter verwendet. Das Gel wurde nach einer Stunde Lauf bei 100 V auf dem Transilluminator unter UV-Licht betrachtet und fotografiert (s. Anhang Abb.18).

Die Restriktion erfolgte unter Verwendung des Enzyms MwoI (New England Biolabs, Beverly, MD, USA). Für diese Reaktion wird ein spezifischer Restriktionspuffer verwendet, die Inkubation erfolgte für zwei Stunden bis über Nacht bei 60 °C in einem Hybridisierungsofen (Hybridizer HB-1D, Techne, Cambridge, UK). Der Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Reagens	Konzentration (Stammlösung)	Endkonzentration	Volumen
NEBuffer MwoI	10 x	1 x	2,5 µl
MwoI (Enzym)	5 U/µl	0,8 U/µl	4 µl
Summe			6,5 µl
PCR-Produkt			18,5 µl
Endvolumen			25 µl

Tabelle 5: Zusammensetzung Restriktionsverdau

Nach Verdau des PCR-Produkts mit MwoI entstehen Produkte folgender Längen (wt: Wildtyp):

Genotyp	Längen der Spaltprodukte
wt/wt	168 bp (unverdaut)
3020insC/wt	168 bp (unverdaut) 143 bp 26 bp (verdaut)
3020insC/3020insC	143 bp 26 bp (verdaut)

Tabelle 6: Produkte nach Restriktionsverdau

Die Visualisierung der Restriktionsfragmente erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Die Gelkonzentration war hierbei ebenfalls 2,5 %. Es wurden jeweils 10 µl des Restriktionsansatzes gemischt mit 8 µl 1:1 verdünntem Auftragspuffer auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde nach zwei Stunden Lauf bei 100 V auf dem Transilluminator unter UV-Licht betrachtet und fotografiert. Als Größenstandard wurde die 100 bp-Leiter verwendet.

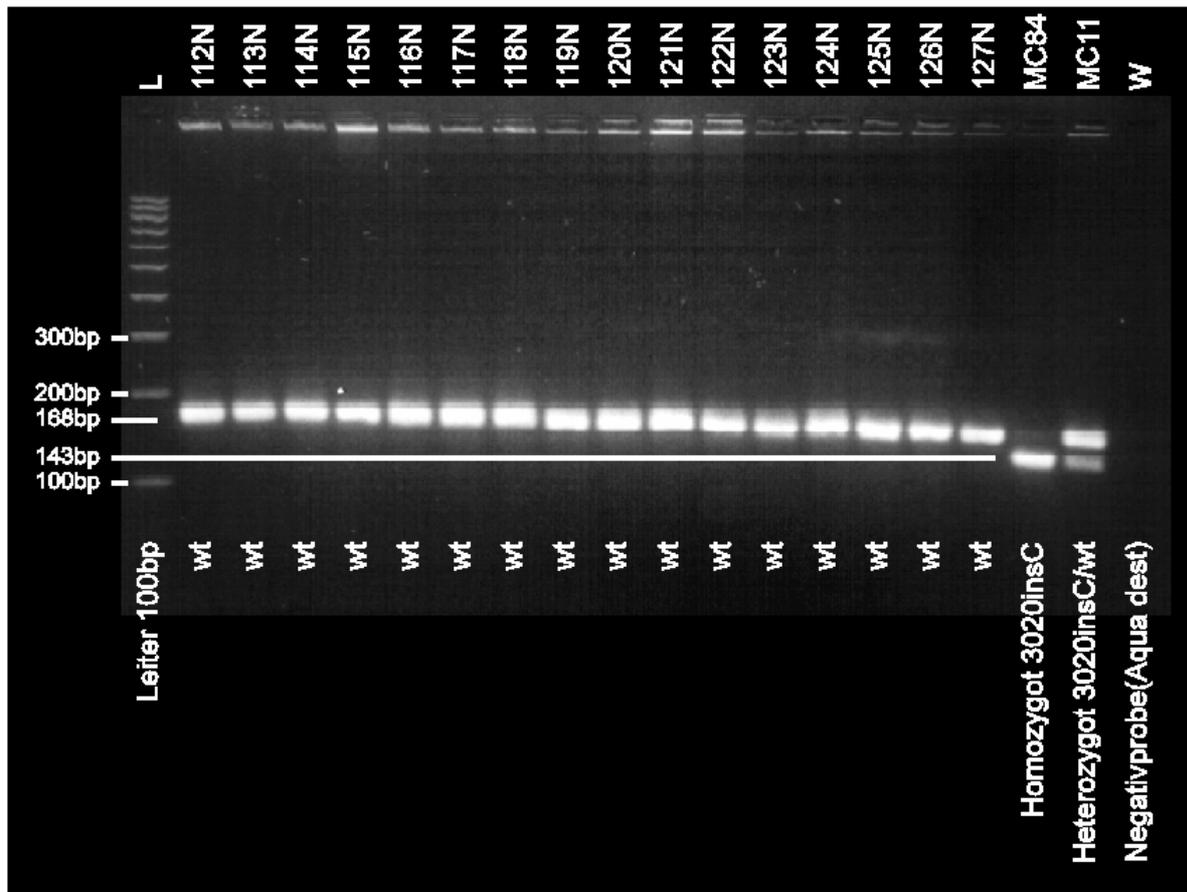


Abbildung 5: Beispiel für Agarosegelelektrophorese nach Restriktion der 3020insC Mutation. Oben: Patientennummern; MC84/MC11 Goldstandards (weitere Abbildungen siehe Anhang).

6.3 Statistische Auswertung

Zum Vergleich der Allelhäufigkeiten zwischen der Untersuchungs- und der Kontrollgruppe wurde der Fisher's Exact Test verwendet. Die Auswertung der Genotypenverteilung zwischen Untersuchungs- und Kontrollgruppe wurde mit Hilfe des Pearson-Chi-Quadrat-Tests durchgeführt.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde für beide Tests auf $p < 0,05$ festgelegt.

7. Ergebnisse

Die Untersuchungsgruppe bestand zu 55 % aus männlichen und zu 45 % aus weiblichen Patienten im Alter zwischen 24 und 74 Jahren. Der Altersmedian betrug 54 Jahre (SD +/- 12,4).

Innerhalb der Kontrollgruppe mussten die Proben 31N-35N wegen defekter Zellkulturen verworfen werden, so dass diese letztlich aus 122 Probanden im Alter von 19 bis 73 Jahren bestand, 67% davon männlich, 33% weiblich. Der Altersmedian lag bei 40 Jahren (SD +/- 13,3).

7.1 Sequenzierung nach Restriktionsverdau in Bezug auf die 3020insC Mutation des NOD2/CARD15 Gens

Nach Restriktionsverdau des PCR Produkts wiesen die Träger des homozygoten wt-Genotyps ein unverdautes Spaltprodukt von 168 bp auf. Patienten mit dem homozygoten 3020insC Genotyp waren nicht vorhanden. Die Spaltprodukte bei Patienten mit heterozygotem 3020insC/wt Genotyp hatten eine Länge von 168bp, 143bp und 26 bp. Die Abbildungen der Gelelektrophorese sind am Ende des Ergebnisteils aufgeführt.

7.2 Häufigkeit des 3020insC Allels des NOD2/CARD15 Gens

In der Untersuchungsgruppe fanden sich 3 Probanden (1 weiblicher, 2 männliche Probanden), die das 3020insC Allel aufwiesen. Die relative Häufigkeit zwischen mutiertem Allel und Wildtypallel (wt) betrug 1,9 % (3/160).

Innerhalb der Kontrollgruppe waren 5 Probanden (2 weibliche, 3 männliche Probanden) Träger des 3020insC Allels. Die relative Häufigkeit lag bei 2,0 % (5/244).

Allel	Untersuchungsgruppe (%)	Kontrollgruppe (%)
3020insC	3 (1,9)	5 (2,0)
Wildtyp	157 (98,1)	239 (98,0)
Summe Σ	160 (100)	244 (100)

Tabelle 7: Allelverteilung

Weibliche Probanden	Untersuchungsgruppe (%)	Kontrollgruppe (%)
3020insC	1 (1,3)	2 (2,1)
Wildtyp	75 (98,7)	92 (97,9)
Summe Σ	76 (100)	94 (100)
Männliche Probanden	Untersuchungsgruppe (%)	Kontrollgruppe (%)
3020insC	2 (2,4)	3 (2,0)
Wildtyp	82 (97,6)	147 (98,0)
Summe Σ	84 (100)	150 (100)

Tabelle 8: Geschlechtsspezifische Allelverteilung

7.3 Verteilung der Genotypen des 3020insC Polymorphismus des NOD2-Gens

Die Träger des mutierten 3020insC Allels in der Untersuchungsgruppe wiesen alle 3 den heterozygoten Genotyp auf (3020insC/wt). Zwei der Patienten zählten zur Klasse II (2,5%), einer zur Klasse I (1,25%)(s.o. Abschnitt 6.1.1). Die restlichen Probanden trugen den homozygoten Genotyp des Wildtypallels (wt/wt) (96,3%). Das Verhältnis zwischen heterozygotem mutierten Genotyp und homozygotem Genotyp des Wildtypallels betrug in der Untersuchungsgruppe 3,7 % (3/80).

In der Kontrollgruppe waren ebenfalls alle 5 Probanden Träger der heterozygoten Genotypform des mutierten 3020insC Allels. Die relative Häufigkeit lag bei 4,1 % (5/122).

Genotyp	Untersuchungsgruppe (%)	Kontrollgruppe (%)
heterozygot 3020insC/wt	3 (3,7)	5 (4,1)
homozygot 3020insC/3020insC	0 (0,0)	0 (0,0)
homozygot Wildtyp (wt/wt)	77 (96,3)	117 (95,9)

Tabelle 9: Genotypenverteilung

Weibliche Probanden	Untersuchungsgruppe (%)	Kontrollgruppe (%)
heterozygot 3020insC/wt	1 (2,6)	2 (4,3)
homozygot 3020insC/3020insC	0 (0,0)	0 (0,0)
homozygot Wildtyp (wt/wt)	37 (97,4)	45 (95,7)

Männliche Probanden	Untersuchungsgruppe (%)	Kontrollgruppe (%)
heterozygot 3020insC/wt	2 (4,8)	3(4,0)
homozygot 3020insC/3020insC	0 (0,0)	0 (0,0)
homozygot Wildtyp (wt/wt)	40 (95,3)	72 (96,0)

Tabelle 10: Geschlechtsspezifische Genotypenverteilung

7.4 Statistische Auswertung

Der Vergleich zwischen den Genotypen der Untersuchungsgruppe und der Kontrollgruppe mit dem Pearson-Chi-Quadrat-Tests erbrachte die in der Tabelle 11 wiedergegebenen Werte. Alle drei Vergleichswerte lagen deutlich oberhalb der Signifikanzgrenze von $p < 0,05$. Auch der Vergleich der Allelhäufigkeiten mit dem Fisher's-Exact-Test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Parodontitis- und der Kontrollgruppe:

		Allele (vs. Kontrollgruppe)	Genotypen (vs. Kontrollgruppe)
Parodontitis (gesamt)		$p = 0,889$	$p = 0,887$
Geschlecht	weiblich	$p = 0,673$	$p = 0,670$
	männlich	$p = 0,847$	$p = 0,845$
Schweregrad der Parodontitis	mild	$p = 0,988$	$p = 0,987$
	moderat	$p = 0,634$	$p = 0,603$
	schwer	$p = 0,317$	$p = 0,313$

Tabelle 11: Gesamtübersicht der statistischen Verteilung der Allele und Genotypen

Parodontitisform	Wildtyp Allel	3020insC Allel	Gesamt	p-Wert (vs. Kontrolle)
mild	47 (97,9%)	1 (2,1%)	48 (100,0%)	0,988
moderat	62 (96,9%)	2 (3,1%)	64 (100,0%)	0,634
schwer	48 (100%)	0 (0,0%)	48 (100,0%)	0,317
Gesamt Σ	157 (98,1%)	3 (1,9%)	160 (100,0%)	0,889

Tabelle 12: Allelverteilung in Bezug auf den Schweregrad der Parodontitis

Parodontitisform	Genotypen			Gesamt	p-Wert (vs. Kontrolle)
	wt/wt	3020insC/wt	3020insC/3020insC		
mild	23 (95,8%)	1 (4,2%)	0 (0,0%)	24 (100,0%)	0,987
moderat	30 (93,8%)	2 (6,2%)	0 (0,0%)	32 (100,0%)	0,603
schwer	24 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	24 (100,0%)	0,313
Gesamt Σ	77 (96,3%)	3 (1,9%)	160 (100,0%)	80 (100,0%)	0,887

Tabelle 13: Genotypenverteilung in Bezug auf den Schweregrad der Parodontitis

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Gelelektrophorese nach Restriktion in Bezug auf die 3020insC Mutation des NOD2/CARD15 Gens. Abbildungen 6-12 Gele der Kontrollgruppe, Abbildungen 13-17 Gele der Untersuchungsgruppe.

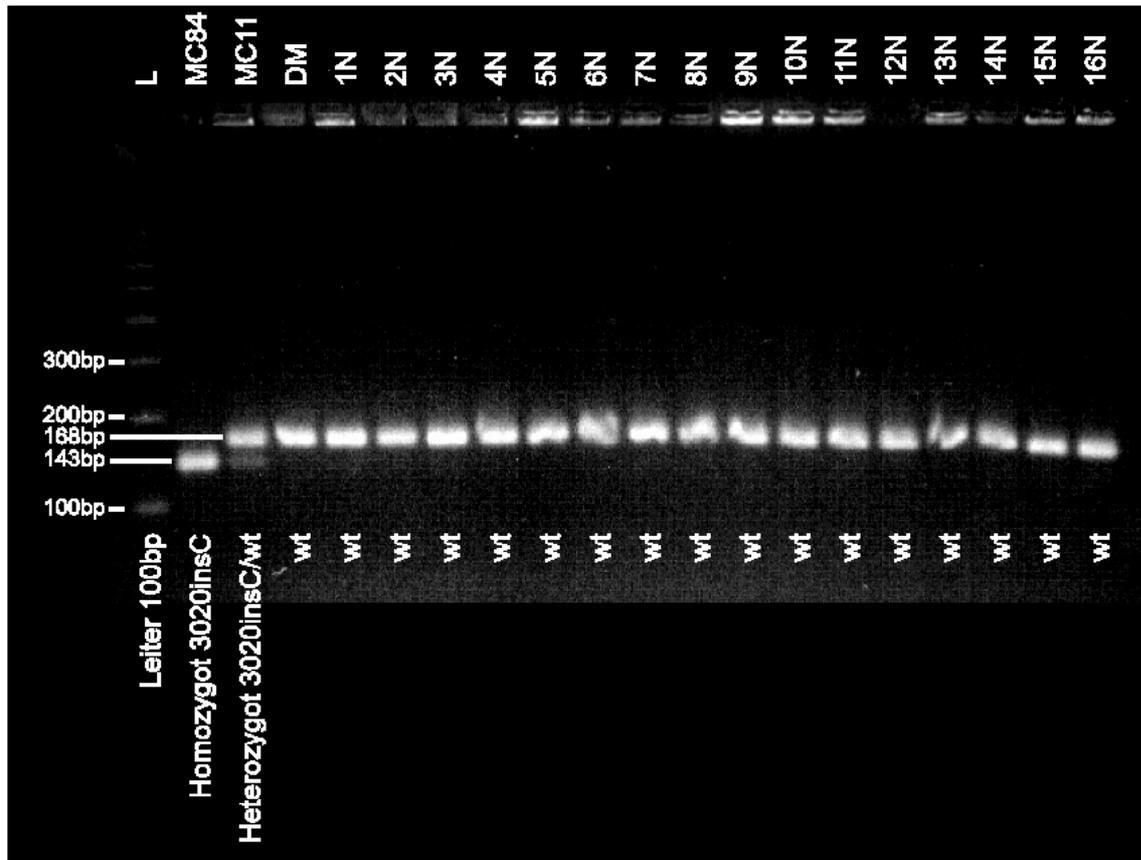


Abbildung 6: Patienten 1N-16N

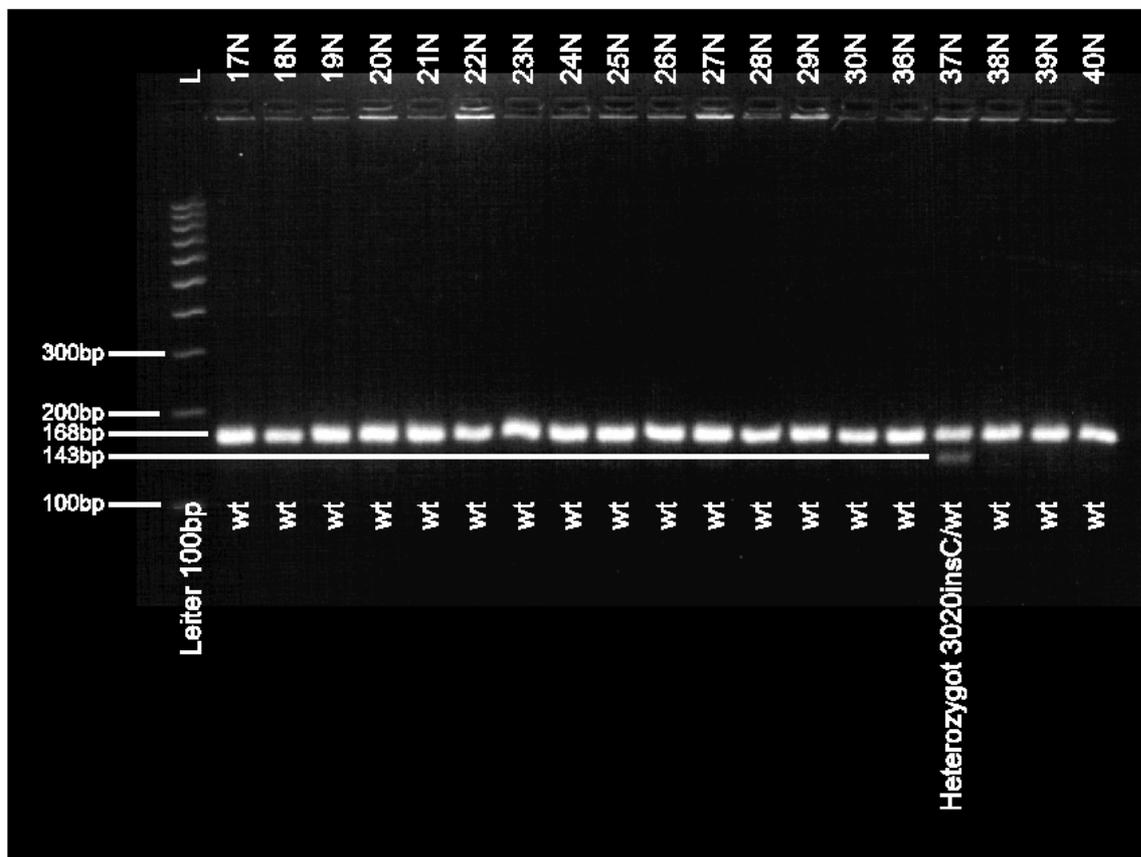


Abbildung 7: Patienten 17N-30N, 36N-40N

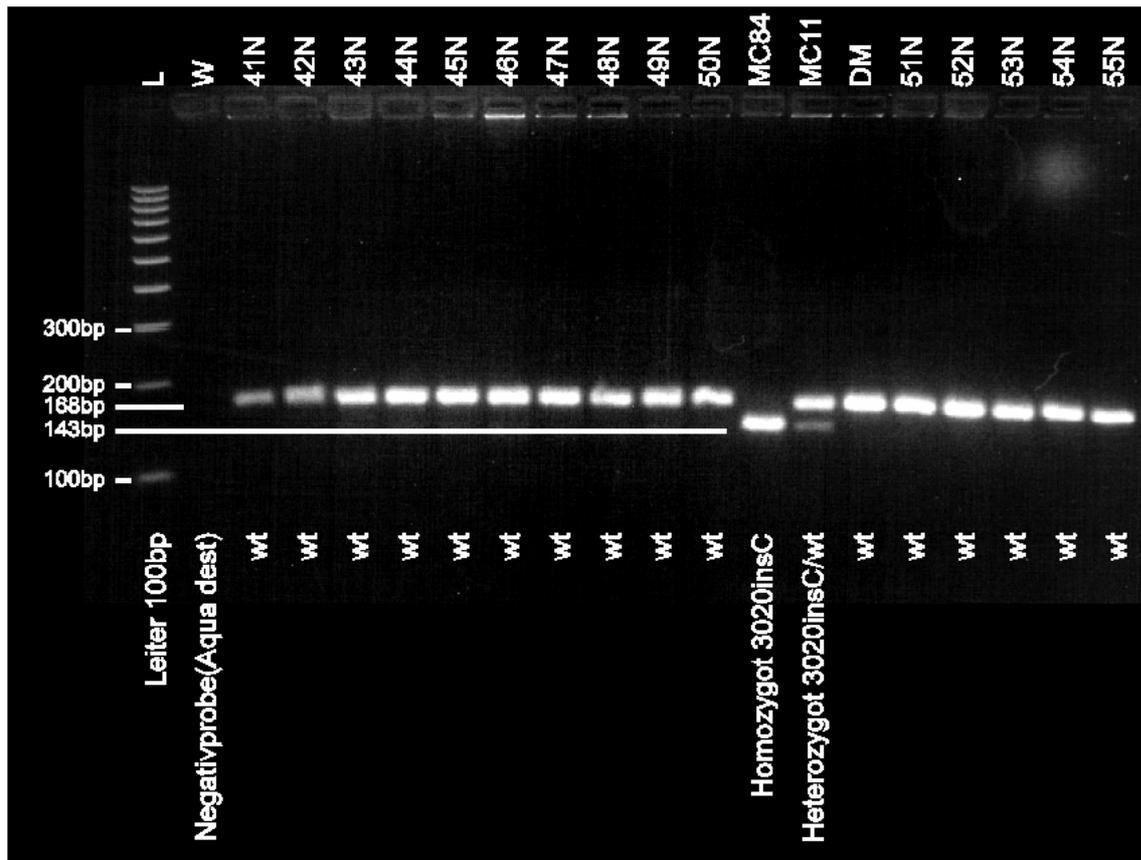


Abbildung 8: Patienten 41N-55N

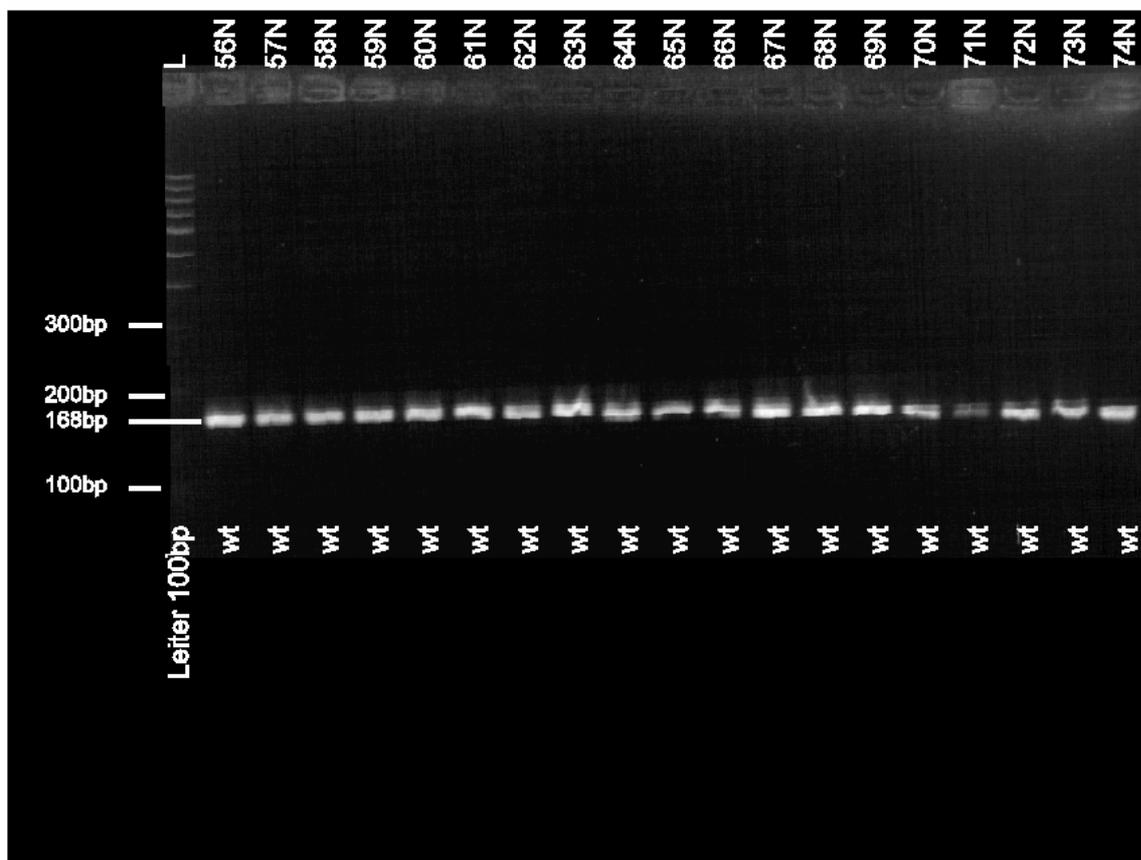


Abbildung 9: Patienten 58N-74N

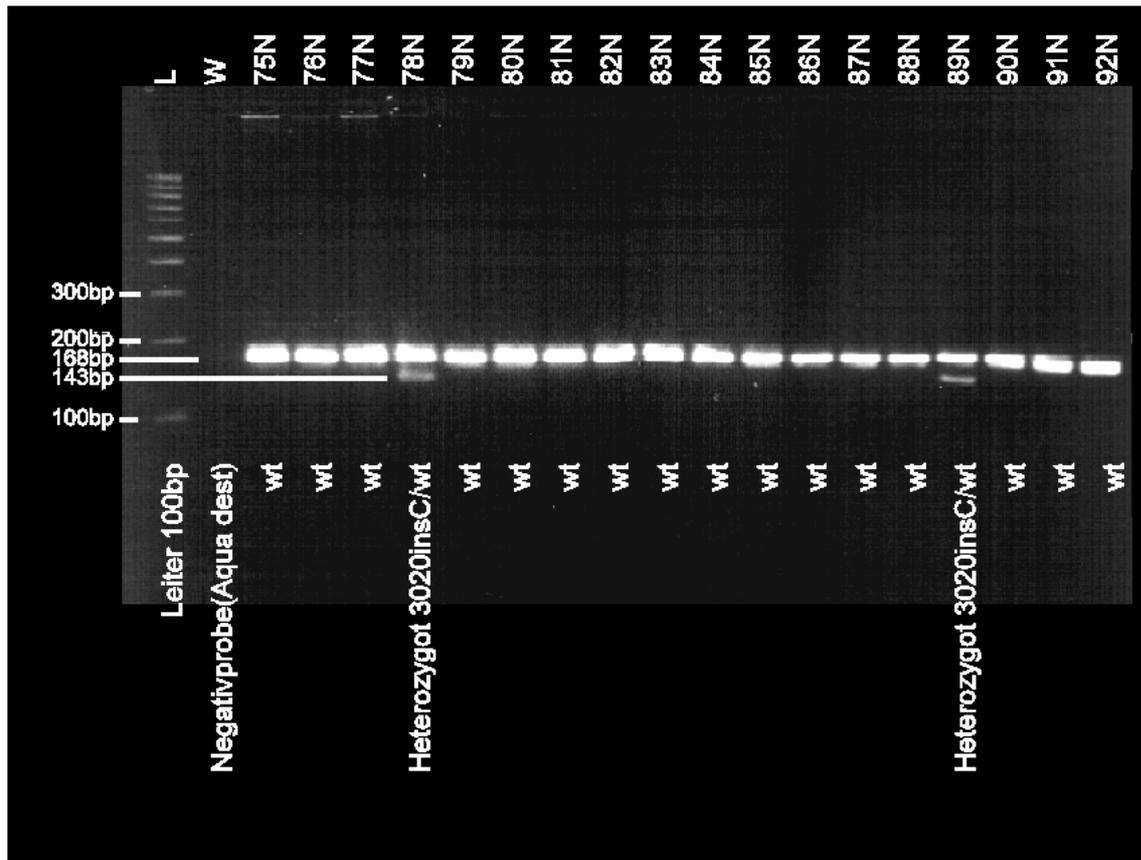


Abbildung10: Patienten 75N-92N

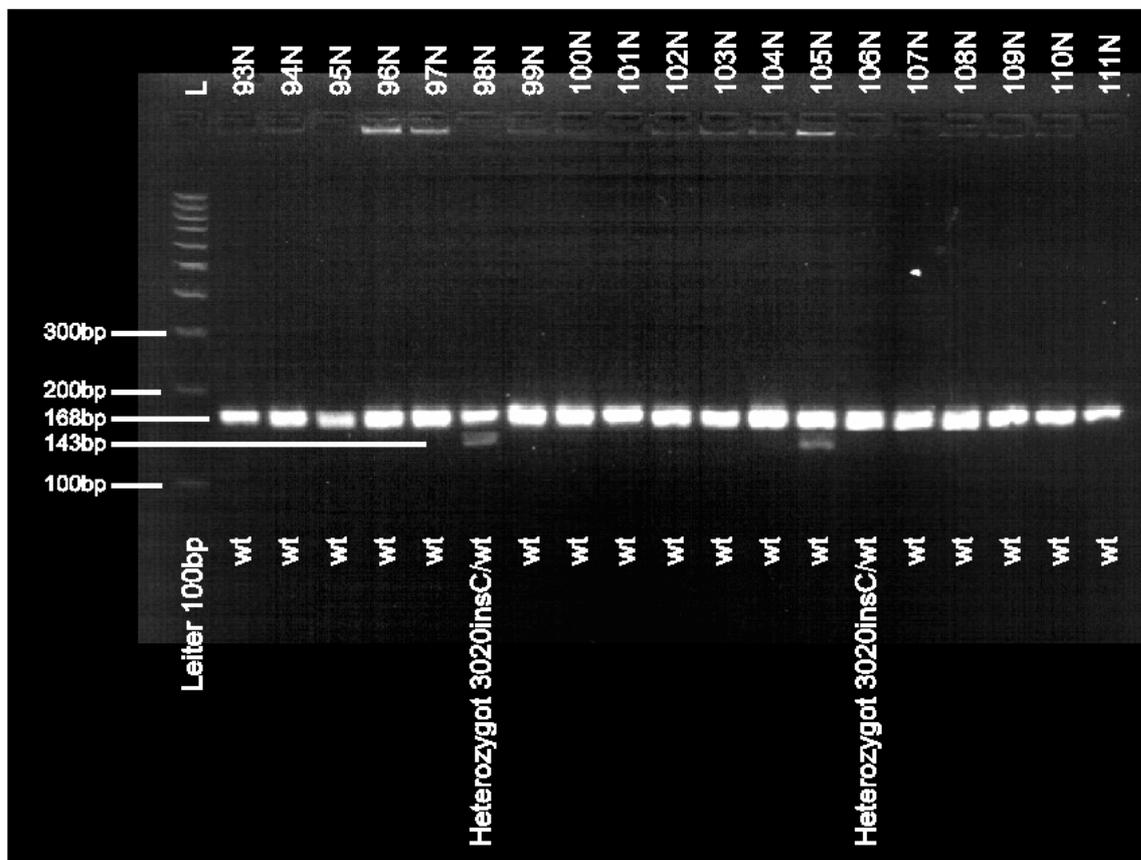


Abbildung11: Patienten 93N-111N

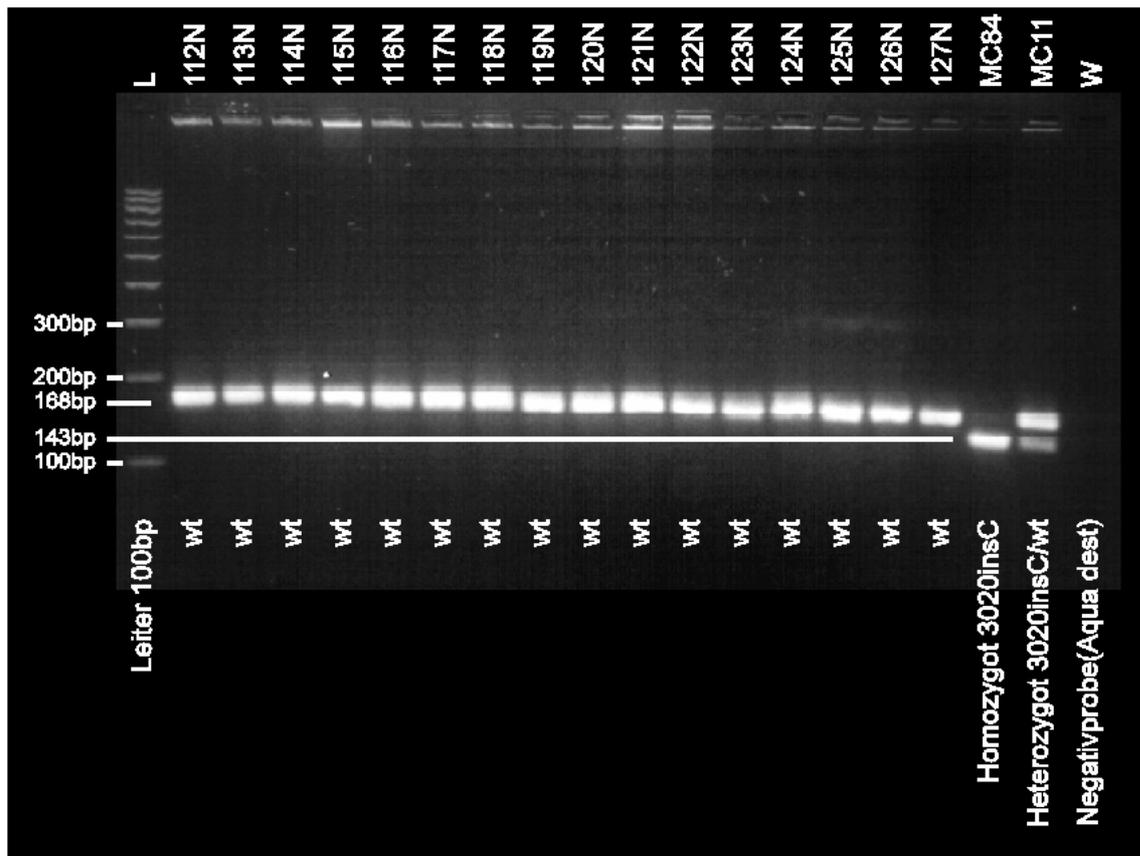


Abbildung 12: Patienten 112N-127N

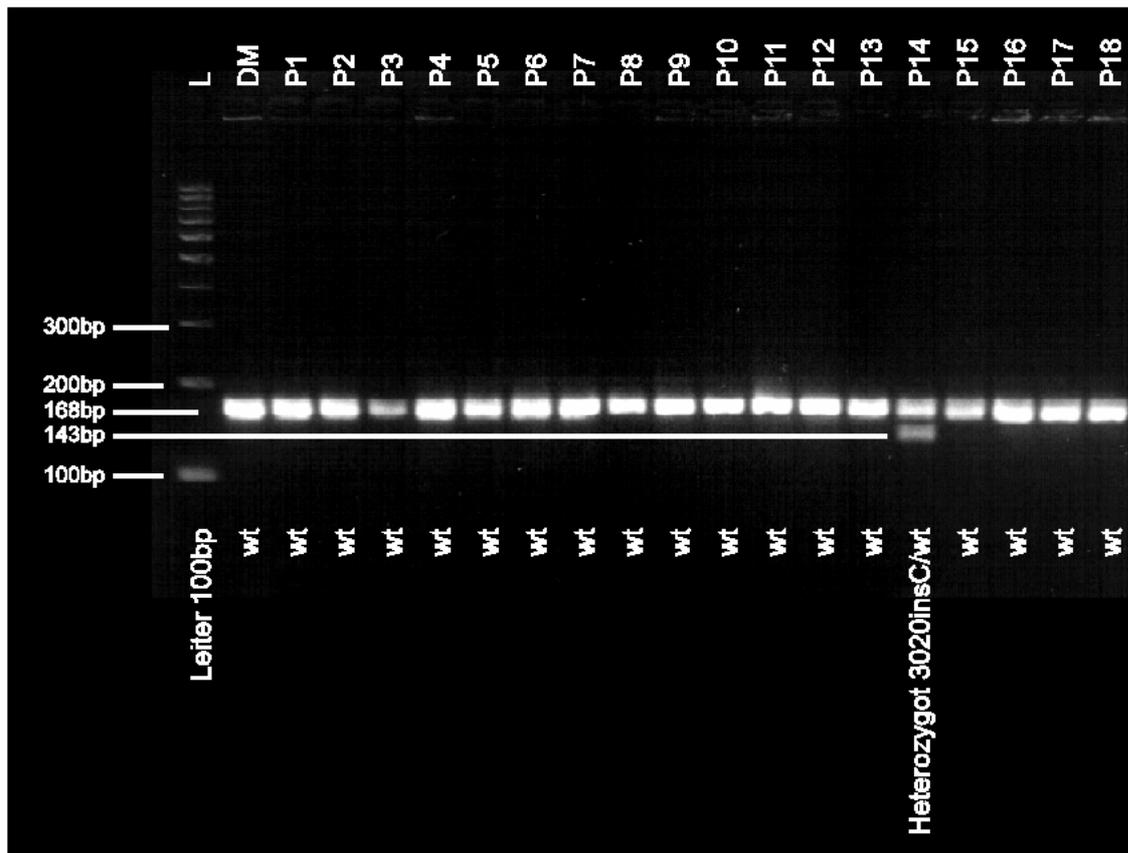


Abbildung13: Patienten P1-P18

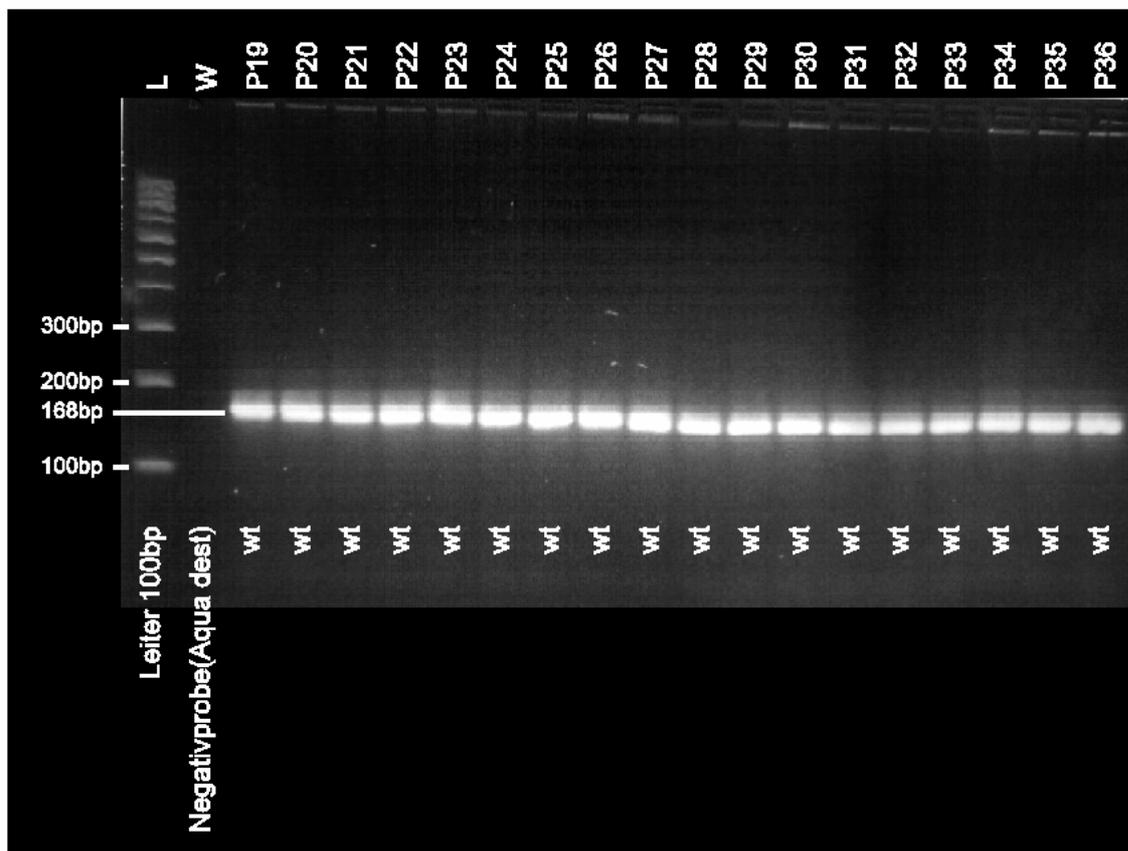


Abbildung14: Patienten P19-P36

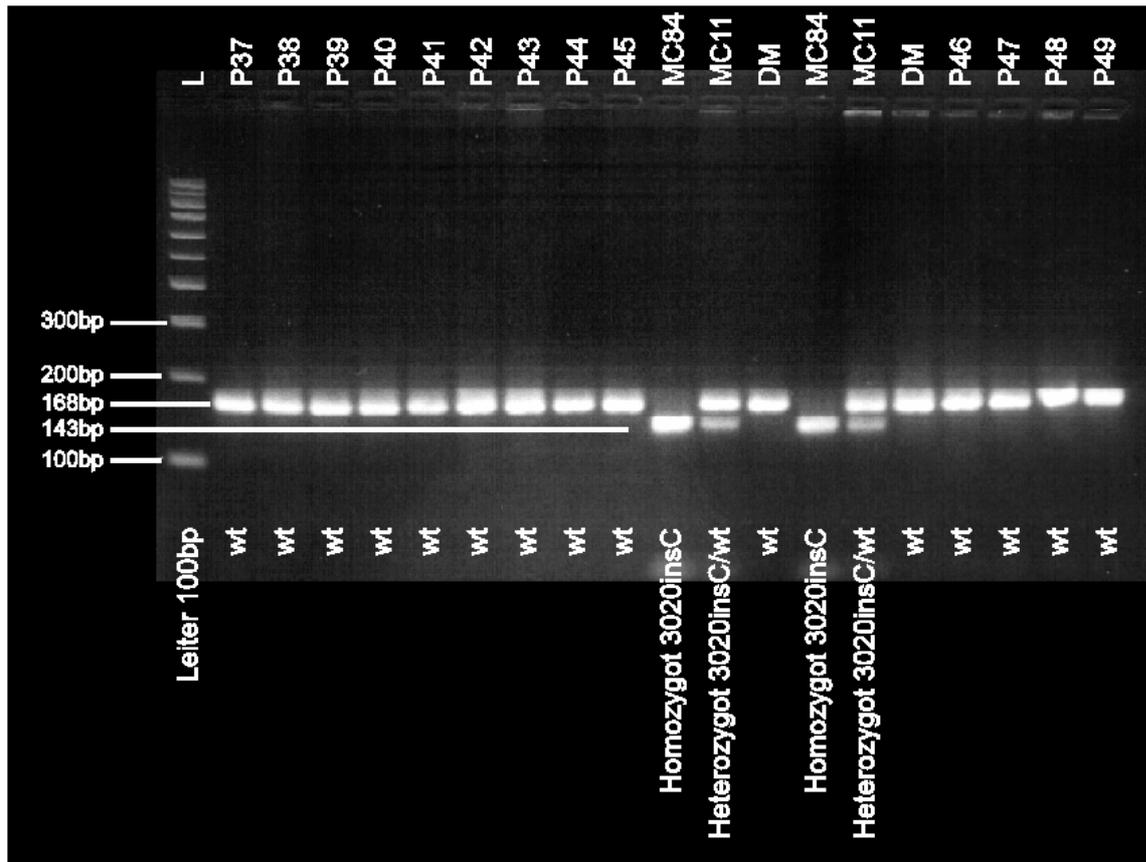


Abbildung15: Patienten P37-P49

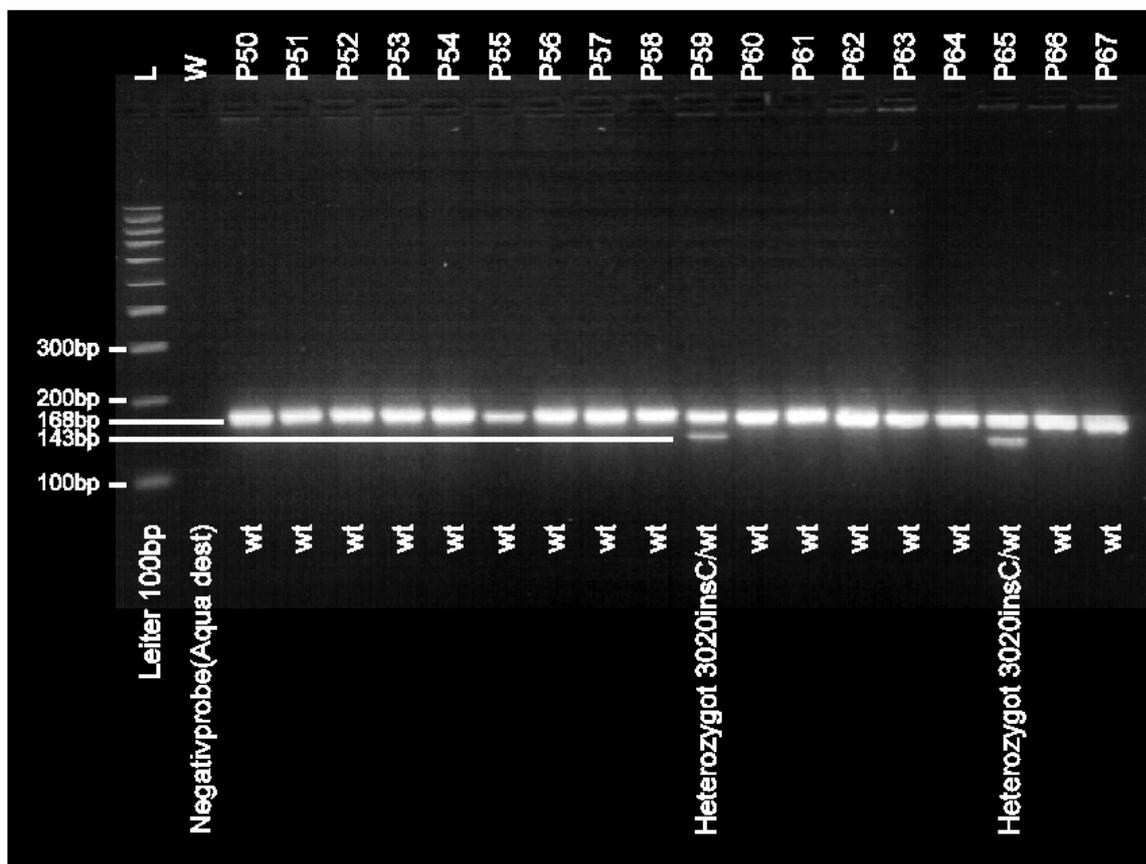


Abbildung16: Patienten P50-P67

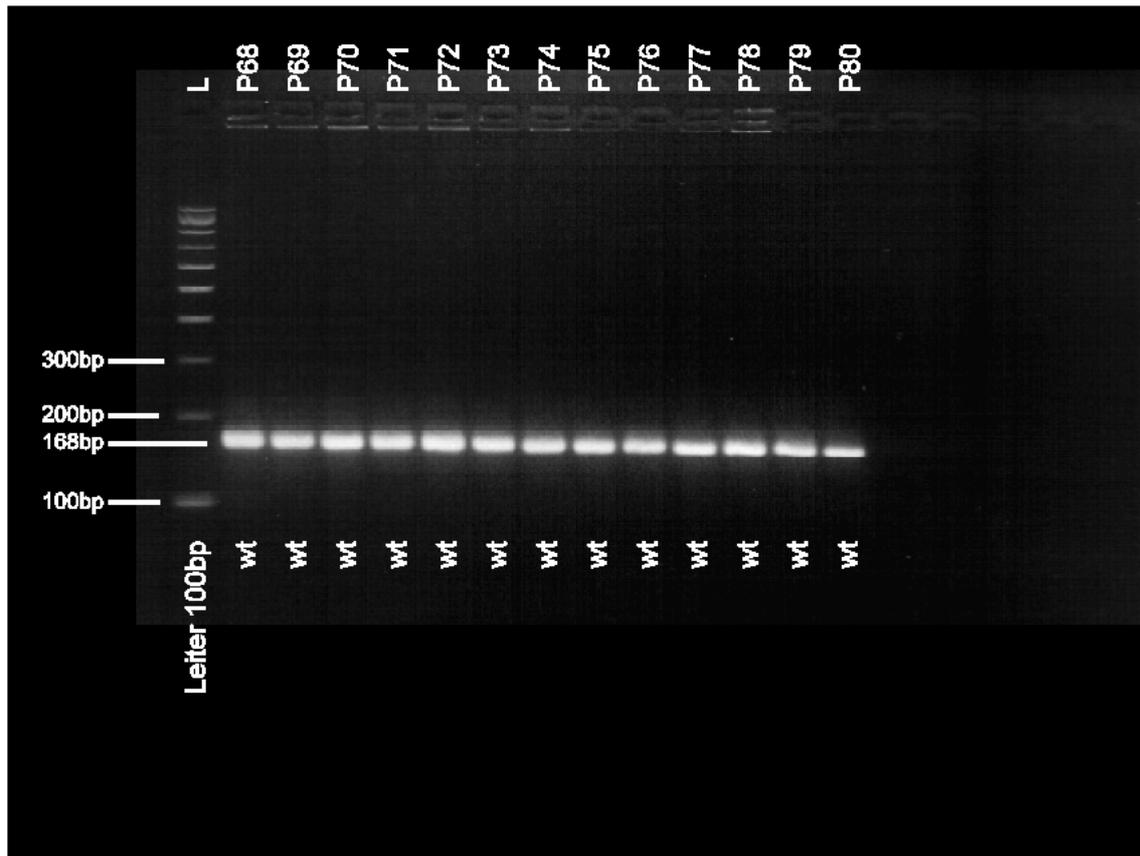


Abbildung17: Patienten P68-P80

8. Diskussion

8.1 Häufigkeit der 3020insC Mutation des NOD2 Gens

Die Hypothese, dass Patienten mit chronischer Parodontitis die 3020insC-Mutation des NOD2-Gens häufiger aufweisen als parodontal gesunde Personen, muss nach den vorliegenden Ergebnissen zunächst verworfen werden. Nur 8 Personen von insgesamt 202 Untersuchten wiesen den heterozygoten 3020insC/wt Genotyp auf (rund 4%). In der Gesamtheit waren lediglich 3 Probanden (2,6%) Träger des 3020insC Allels. Dieses Merkmal scheint demnach in der Bevölkerung nicht so häufig aufzutreten. Sollte der Zusammenhang zwischen Mutation und Parodontitis wirklich ausgeschlossen werden, müssten sich nachfolgende Untersuchungen speziell auf die Gruppe der Personen mit Mutation konzentrieren. Hier müsste eine ausreichend umfangreiche Stichprobe gewonnen werden, die dann differenziert untersucht werden könnte. In der ausgewählten Stichprobe konnte weder ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Parodontitis und der 3020insC Mutation, noch ein Zusammenhang zwischen männlichen und weiblichen Trägern der Mutation nachgewiesen werden.

8.2 Methodik

8.2.1 Auswahl der Stichprobe

In die vorliegende Studie sind nur Patienten aufgenommen worden, die in ihrer Vorgeschichte nicht an früh beginnenden Parodontitis-Formen erkrankt waren. Die Gründe für Zahnverluste durch Parodontitis konnten nur aus den anamnestischen Angaben der Probanden erschlossen werden. Ob ursächlich Traumen oder ausgedehnte kariöse Defekte für den Zahnverlust verantwortlich waren, kann nicht ausgeschlossen werden. Man muss feststellen, dass zum jetzigen Zeitpunkt keine sicheren diagnostischen Hilfsmittel zur exakten Diagnosestellung existieren und somit die Aufnahme von Patienten mit anderen Entitäten der Parodontitis nicht zwingend ausgeschlossen werden kann.

Die Problematik der Zuordnung zu einer spezifischen Entität wird anhand des folgenden Beispiels klar. Erkrankt ein junger Patient an aggressiver Parodontitis (alte Nomenklatur: früh beginnende Parodontitis), so ist er auch in höherem Alter daran erkrankt. Die 1999 neu festgelegte Nomenklatur sollte diese altersbezogene Einteilung ablösen. Dennoch stellten MOMBELLI et al. (2002) fest, dass die Zuordnung zu einer spezifischen Entität für viele Autoren immer noch problematisch sei. So werde der Begriff „adulte“ Parodontitis weiterhin häufiger benutzt als der der „chronischen“.

Grundsätzlich ist die Forderung nach einer syndrombezogenen Klassifikation erst dann gerechtfertigt, wenn alle pathogenetischen Vorgänge geklärt sind. Man beachte in diesem Zusammenhang den Modellcharakter des „critical pathway“ (TONETTI et al., 1999). Des weiteren befindet sich die Nomenklatur zur Einteilung der parodontalen Erkrankungen in einem ständigen Umbruch (vgl. hierzu Abschnitt 2.1). Neue Erkenntnisse zur Ätiologie, Therapie, Epidemiologie etc. machen Revisionen erforderlich. Das erschwert zusätzlich den Vergleich verschiedener Studien. Somit kann man auch nicht endgültig ausschließen, dass die 3020insC Mutation des NOD2/CARD15 Gens bei anderen Formen der Parodontitis (aggressiv) eine Rolle spielen könnte.

Erst wenn die Pathogenese vollkommen geklärt und verstanden ist, erscheint eine Syndromklassifikation als gerechtfertigt und sinnvoll (TONETTI et al., 1999).

8.2.1.1 Parodontaler Befund und Klassifizierung

Die Diagnosestellung „generalisierte chronische Parodontitis“ wurde in der hier vorliegenden Studie durch eindeutige Parameter festgelegt. Messergebnisse (Taschensondierungstiefen, vgl. Kapitel 6.1) können jedoch unter verschiedenen Behandlern differieren (ARMITAGE, 2003). Im vorliegenden Fall wurde die klinische Untersuchung der Probanden von vier verschiedenen Behandlern durchgeführt.

Für diese Studie wurde die Einteilung von den Forschungsgruppen um WIEBE (2000) und ARMITAGE (2003) nach mildem, moderatem und schwerem Stadium

übernommen (vgl. Abschnitt 6.1.1). Dabei ist bekannt, dass diese Festlegung behandlerabhängig und somit relativ uneinheitlich erfolgt (SCAREL-CAMINAGA et al., 2002; KORNMAN et al., 1997; BOCH et al., 2001).

Die Stichprobe enthielt weder Raucher noch Diabetiker, um ein mögliches Zusammenspiel zwischen der 3020insC Mutation und solchen Umwelteinflüssen auszuschließen.

Die ausgewählten Kontrollprobanden konnten nach der Befunderhebung eindeutig als gesund eingestuft werden. Man sollte aber an diesem Punkt nicht außer Acht lassen, dass es sich bei der Befundaufnahme nur um einen momentanen Status handelt. Die klinische Erfahrung zeigt, dass sich vor allem bei jungen Patienten, aber auch bei älteren Patienten, im weiteren Verlauf noch eine profunde Parodontitis entwickeln kann. Die Progression der Erkrankung kann zum Zeitpunkt der Diagnosestellung stagnieren und somit würde der Proband fälschlicherweise als gesund eingestuft (MOMBELLI et al., 2002). Die Diagnosestellung muss keinesfalls zwingend mit dem Zeitpunkt des Erkrankungsbeginns übereinstimmen. Deshalb wäre in diesem Fall eine Verlaufskontrolle sinnvoll. Auch hier zeigt sich wieder die Problematik der Nomenklatur. Es gibt immer noch keinen sicheren histopathologischen Anhaltspunkt zur genauen Festlegung des Ausbruchzeitpunktes (MOMBELLI et al., 2002).

8.2.1.2 Ethnische Unterschiede bei genetischen Studien

Die Ergebnisse dieser Studie müssen nicht zwangsläufig bei allen ethnischen Gruppen zutreffen. SUGITA et al. (2001) wiesen bereits auf dieses Problem hin. Die Assoziation des FcyRIIIb-NA1 Allels mit chronischen Parodontitiden wurde bei japanischen Probanden postuliert, konnte aber in einer anderen Studie an kaukasischen Probanden nicht bestätigt werden. Die Vermutung liegt nahe, dass auch ethnische Differenzen zum Scheitern genetischer Studien führen können (MOMBELLI et al., 2002). Die bisherigen Untersuchungen im Hinblick auf die NOD2/CARD15 3020insC Mutation wurden mit kaukasischen Familien durchgeführt (HUGOT et al., 1996; OGURA et al., 2001a; RADLMAYR et al., 2002). Ob diese Mutation auch in anderen ethnischen Gruppen einen Zusammen-

hang zwischen Schwere der Erkrankung und Mutation erkennen lässt, scheint zum aktuellen Stand der Forschung noch nicht eindeutig geklärt. Auch bleibt offen, ob die 3020insC Mutation mit marginalen Parodontitiden korreliert.

8.2.2 Genotypisierung in Bezug auf die 3020insC Mutation des NOD2/CARD15 Gens

Die Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus Analyse ist eine geläufige Methode zum Nachweis von Polymorphismen (SCAREL-CAMINAGA et al., 2002; LAINE et al., 2002; KORNMAN et al., 1997a; WALKER et al., 2000).

Im Zusammenhang mit der 3020insC Mutation des NOD2 Gens ist auch die Anwendung eines anderen Primer Paares möglich (OGURA et al., 2001). Das entstandene PCR Produkt besteht aus 533 bp, die verdauten Fragmente aus 319 bp (Wildtyp) bzw. 214 bp (3020insC) (vgl. hierzu Abschnitt 6.2.8). Über den NOD2/CARD15 3020insC Polymorphismus liegen im Zusammenhang mit chronisch marginalen Parodontitiden noch keine Studien vor. Die in Abschnitt 6.2 angegebenen Werte (Zentrifugationszeiten, Konzentrationen etc.) wurden durch Austesten ermittelt.

Die Darstellung von Polymorphismen kann neuerdings auch anstelle der Gelelektrophorese (KORNMAN et al., 1997; WALKER et al., 2000; RADLMAYR et al., 2002; HAMPE et al., 2002; FOLWACZNY & GLAS, 2002) direkt mit so genannten Sequenziergeräten erfolgen, was eine deutliche Zeitersparnis mit sich bringt (HAMPE et al., 2001).

8.3 Modelle zum Einfluss des NOD2-Polymorphismus auf die Pathogenese der Parodontitis

Obwohl kein Zusammenhang aus den hier vorliegenden Ergebnissen zwischen der 3020insC Mutation und chronisch marginalen Parodontitiden erkennbar ist, erscheint grundsätzlich plausibel, dass der NOD2-NFκB Weg bei der Pathogenese chronisch marginaler Parodontitiden eine Rolle spielen könnte.

Im Widerspruch zu den *in vitro* gewonnenen Ergebnissen (verminderte NFκB Aktivierung, s.o. Abschnitt 4.3) lassen diverse Studien darauf schließen, dass die 3020insC Mutation zu einer erhöhten Anfälligkeit für Gewebsdestruktionen im Zusammenhang mit der chronischen Magen-Darmentzündung Morbus Crohn führt. Morbus Crohn wurde hier mit der homozygoten 3020 insC Mutation assoziiert (HUGOT et al., 2001; OGURA et al., 2001a; RADLMAYR et al., 2002; HAMPE et al., 2002; FOLWACZNY & GLAS, 2002). Prinzipiell könnte dies auch bei chronisch marginalen Parodontitiden zutreffen. Ebenso wie bei der Pathogenese der marginalen Parodontitis spielt die übermäßige Bildung von proinflammatorischen Zytokinen, u.a. TNF-α, eine wichtige Rolle bei der Pathogenese des Morbus Crohn. So wurden bei dieser Krankheit erhöhte Spiegel von TNF-α in der Lamina propria der intestinalen Schleimhaut in Zusammenhang mit den destruktiven Prozessen gebracht (SCHREIBER et al., 1998; ZAREIE et al., 2001; CHO, 2001).

8.3.1 Wildtypform des NOD2 als Schutzbarriere

Zunächst bleibt zu klären, welche Funktion die Wildtypform des NOD2 eigentlich übernimmt. Denkbar wäre zum Beispiel, dass diese zum Beispiel als Schutzbarriere fungiert. Die Produktion von Zytokinen wie IL-10, die die Immunreaktion unterdrücken, könnte bei der Pathogenese eine wichtige Rolle spielen. Bei der Pathogenese marginaler Parodontitiden ist zu vermuten, dass eine verminderte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine das Bakterienwachstum infolge geschwächter Immunabwehr begünstigen könnte (VAN HEEL et al., 2001). Die Verbesserung der Lebensbedingungen für die Bakterien könnte diesen erleichtern, neue, möglicherweise aggressivere Virulenzfaktoren zu entwickeln, die zur Umgehung der Wirtsabwehr oder direkt zur Gewebsdestruktion führen. So kann zum Beispiel eine Anhäufung von Lipopolysacchariden mit einer erhöhten Gewebsdestruktion einhergehen (ABBAS et al., 1996, S. 297).

8.3.2 NOD2 als Rezeptor für Muramyl Dipeptid (MDP)

NOD2 gilt als Rezeptor für Lipopolysaccharide. Es ist vorstellbar, dass das Erkennungsdefizit infolge der 3020 insC Mutation zu einer übermäßigen Freisetzung der Zytokine nach Stimulation mit anderen bakteriellen (Lipoteichonsäuren, Lipopeptide), ja sogar endogenen Produkten führen könnte (VAN HEEL et al., 2001; OGURA et al., 2001a). Während der Niederschrift der vorliegenden Arbeit konnte diese These jedoch von der Forschungsgruppe um Inohara und Girardin widerlegt werden. In diesen neuen Studien wird festgestellt, dass NOD2 intrazellulärer Rezeptor für das aus Proteoglykanen stammende Muramyl-Dipeptid (MDP) ist. Das MDP ist sowohl bei gramnegativen, als auch bei grampositiven Bakterien nachweisbar (INOHARA et al., 2003; GIRARDIN et al., 2003). Die Autoren berichten, dass die von ihnen verwendeten, kommerziell erwerblichen LPS Präparate mit Peptidoglykanen verunreinigt waren und somit fälschlicherweise LPS als die durch NOD2 erkannte Substanz identifiziert wurde. Auch nach Stimulation der mutierten 3020insC Form des NOD2/CARD15 Gens mit MDP sei die Aktivität des NFκB signifikant vermindert und bestätigte die vorangehenden Studien (HUGOT et al., 2001; OGURA et al., 2001a; HAMPE et al., 2001).

Zur Pathogenese von marginalen Parodontitiden liegen erst sehr wenige Studien vor, die die Zytokinausschüttung mit MDP in Verbindung bringen. Die Mehrzahl der Untersuchungen basieren auf der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine nach LPS Stimulation (KORNMAN et al., 1997b; TAKASHIBA et al., 1999; PHILPOTT et al., 2000). Es ist denkbar, dass auch hier Verunreinigungen übersehen wurden und andere bakterielle Toxine für unterschiedlich ausgeprägte Wirtsreaktionen verantwortlich sein könnten (GIRARDIN et al., 2003). Auch der Einfluss von Viren bei der Pathogenese marginaler Parodontitiden wird diskutiert. Herpesviren sind zum Beispiel in der Lage, die Transkription des IL-1β Gens zu erhöhen und sich damit an der Gewebsdestruktion zu beteiligen (BOCH et al., 2001).

8.3.3 Störung des erworbenen Immunsystems als Folge der 3020insC Mutation

Eine weitere Überlegung besteht darin, ob nicht das Erkennungsdefizit der Monozyten bzw. Makrophagen infolge der 3020insC Mutation zu einer übersteigerten Immunantwort des erworbenen Immunsystems (Th1 und Th2 spezifische Zytokine) und damit zu einer verstärkten Gewebsdestruktion führen kann. Vorstellbar ist, dass die mindere Produktion der Th1 und Th2 zellspezifischen Zytokine (s.o. Kapitel 3.2.2), die die Bildung von Immunglobulinen begünstigen, zu verstärkter Anfälligkeit führen. Auch Defekte der B-Lymphozyten an sich und die damit verbundene Abschwächung der initialen Abwehrlinie durch spezifische Antikörper könnten dies begünstigen (HART & KORNMAN, 1997).

8.3.4 Spezifische Rezeptoren und deren Einfluss auf die Pathogenese

Rezeptoren, die für die Erkennung spezifischer Toxine verantwortlich sind, spielen bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen eine herausragende Rolle. Bezogen auf das zytosolische NOD2 ist denkbar, dass, ähnlich wie bei Pflanzen, die Änderung in der leucinreichen Domäne des NOD2 zu einer fehlenden Reaktion auf spezifische Toxine führen und somit das bakterielle Wachstum gefördert werden könnte (INOHARA et al., 1999). Auf welche Weise die bakteriellen Produkte in die Zelle gelangen und, ob noch ein Zwischenschritt bis zur Bindung des MDP an NOD2 vorausgeht, bleibt noch zu klären (OGURA et al., 2001b).

Weist das Erkennungspotential der Rezeptoren einen Defekt auf, so kann dies mit erhöhter Anfälligkeit für das jeweilige Pathogen einhergehen. Es ist zum Beispiel bereits nachgewiesen, dass eine Mutation der LRR Domäne des TLR4 zu erhöhter Anfälligkeit für pulmonale Infektionen durch gramnegative Bakterien führt (AGNESE et al., 2002). TLR2 und TLR4 werden nicht nur an der Oberfläche von Makrophagen exprimiert, sondern auch an Gewebezellen des parodontalen Gewebes wie z. B. Fibroblasten. Genetische Defekte der

ortsständigen Gewebezellen könnten ebenfalls zu erhöhter Anfälligkeit gegenüber parodontalen Erkrankungen beitragen (BOCH et al., 2001; MÜLLER, 2001, S.37). Ob der Polymorphismus der TLR auch mit der Pathogenese marginaler Parodontitiden assoziierbar ist und noch weitere spezifische Rezeptoren existieren, die bis dato noch nicht erkannt wurden, bleibt noch zu erforschen. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass auch Polymorphismen des NOD1, das bekanntlich ein intrazellulärer Rezeptor für LPS darstellt, bei der Pathogenese chronischer Parodontitiden involviert sein könnten (INOHARA et al., 1999; INOHARA et al., 2001).

8.3.5 NFκB: Knotenpunkt der Entzündungsreaktion

Der Transkriptionsfaktor NFκB spielt eine wichtige Rolle innerhalb von Entzündungsprozessen und kann einer Vielzahl von Störungen ausgesetzt sein. Die Überlegung erscheint plausibel, dass durch das Erkennungsdefizit bakterieller Pathogene durch die NOD2 3020insC Mutation andere Aktivierungswege des NFκB begünstigt und somit eine verstärkte Bildung der destruktiv wirkenden Zytokine nach sich ziehen könnte (OGURA et al., 2001a). SCHREIBER et al. (1998) wiesen in diesem Zusammenhang eine erhöhte Aktivität des NFκB in der Lamina propria der intestinalen Schleimhaut bei Patienten mit Morbus Crohn nach. Es bleibt zu überprüfen, ob noch weitere Aktivierungswege des NFκB existieren (PHILPOTT et al., 2000). TAKASHIBA et al. (1999) und NICHOLS et al. (2001) postulierten bereits, dass NFκB bei der Pathogenese der marginalen Parodontitis eine wichtige Rolle spielen und für Überempfindlichkeitsreaktionen gegenüber bakteriellen Toxinen, die mit erhöhter Gewebsdestruktion einhergehen, verantwortlich sein könnte. Die Tatsache, dass die Anwendung von Glukokortikoiden, die bekanntlich NFκB hemmen, die Progression des Gewebsverlusts infolge verminderter Freisetzung von IL-1β eindämmen, bekräftigt die von NICHOLS et al. (2001) und TAKASHIBA et al. (1999) aufgestellte Hypothese (PAGE et al., 1997).

Wie bereits beschrieben, spielt die Familie der NOD-Proteine eine Rolle bei der Vermittlung der Apoptose durch Aktivierung der Caspase 9 (OGURA et al.,

2001b). Die 3020insC Mutation könnte somit auch eine Störung der Steuerung der Apoptose nach sich ziehen. GAMONAL et al. (2001) vermuten, dass im Rahmen chronischer Parodontitiden die Apoptose sowohl durch mikrobielle Faktoren, als auch durch wirtsspezifische Veränderungen mit der Pathogenese verwickelt sein könnten. Verfrühter Zelltod der Makrophagen könnte zu verminderter Abwehrleistung führen.

8.4 Ausblick

Grundsätzlich können genetische Polymorphismen in für Zytokine (IL-1 β) oder Rezeptoren kodierenden Genen interindividuelle Unterschiede nach sich ziehen. Die für die proinflammatorischen Zytokine kodierenden Gene, die unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktors NF κ B stehen (z.B. TNF- α , ICAM-1), gilt es im Zusammenhang mit chronischen Parodontitiden weiter zu untersuchen. Genetische Defekte sollten aber nicht nur isoliert betrachtet, sondern auch in Verbindung mit Umweltfaktoren gebracht werden (KORNMAN et al., 1997a; WALKER et al., 2000; BOCH et al., 2001).

Das pathogenetische Modell des „critical pathway“ wird ständig neu ergänzt. Der umfangreiche Zytokinkomplex, der die Entzündungsreaktion des Wirts reguliert, bleibt im Rahmen der Pathogenese marginaler Parodontitiden auf molekularer Ebene noch verhältnismäßig unklar. Vor allem bei Infektionen mit gramnegativen Bakterien sind eine Reihe molekularer und zellulärer Prozesse involviert, die mit größerer Störanfälligkeit einhergehen. Ein weiterer Schritt wäre, die genauen Vorgänge der Signaltransduktion zu analysieren, um schließlich verbesserte Therapiemaßnahmen zur Eindämmung der Entzündungsreaktion und der damit verbundenen Gewebsdestruktion zu entwickeln. Welche Funktionen die einzelnen Zytokine während der Pathogenese *in vivo* eigentlich haben und welche Interaktionsmöglichkeiten zwischen den einzelnen Substanzen und Rezeptoren bestehen, muss noch geklärt werden (BOCH et al., 2001). Hier könnten neue Erkenntnisse über die Pathogenese des Morbus Crohn zu Fortschritten in der Parodontologie, aber auch umgekehrt, führen. Morbus Crohn und Parodontitis haben viele Gemeinsamkeiten bezüglich

der Pathogenese. Bei beiden Erkrankungen gelten zum Beispiel Funktionsstörungen neutrophiler Granulozyten (Chediak-Higashi-Syndrom, Papillon-Lefevre-Syndrom etc.) als Risikofaktoren (KORZENIK et al., 2000; HART & KORNMAN, 1997).

Den hier vorliegenden Ergebnissen zufolge spielt das 3020insC Allel des NOD2 Gens bei der Pathogenese chronisch marginaler Parodontitiden prima facie keine Rolle. Die Basis der aufgeführten Daten bilden *in vitro* Beobachtungen. Welche Rolle NOD2, auch in Hinblick auf Patienten mit Morbus Crohn *in vivo* wirklich einnimmt bleibt unklar. Die Suche nach spezifischen Kandidatengen für chronisch marginale Parodontitiden wird weiterhin Ziel der Forschung bleiben.

9. Zusammenfassung

Ein Hauptanliegen zahnmedizinischer Forschung ist das Erkennen von besonderer Anfälligkeiten für chronisch marginale Parodontitiden. Zum einen konzentriert sich die Forschung auf die Rolle spezifischer Bakterien im Zusammenhang mit Beginn und Progression der Erkrankung. Zum anderen rückt sie seit längerer Zeit die genetische Prädisposition in den Mittelpunkt ihrer klinischen Studien.

Einschränkungen der Makrophagenfunktion sind bereits mit aggressiven Formen der Parodontitis assoziiert worden. Im Zusammenhang mit chronischen Parodontitiden konnte bisher noch kein eindeutiger genetischer Marker gefunden werden. Makrophagen sind für die Phagozytose der parodontopathogenen Keime verantwortlich. Ihre proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α sind sowohl für die Entzündungsförderung, als auch für die Destruktionen des parodontalen Gewebes verantwortlich. Die Freisetzung dieser Substanzen wird über spezifische Rezeptoren vermittelt. Zu dieser Gruppe zählt das zytosolische NOD2, das hauptsächlich bei Makrophagen nachzuweisen ist.

Eine Punktmutation (3020insC) des NOD2-Gens wird mit destruktiven Formen der chronischen Magen-Darmentzündung Morbus Crohn in Verbindung gebracht. *In vitro* zeigte dieses defekte Protein eine verminderte Aktivierung des NF κ B nach Stimulation mit Lipopolysacchariden. Dadurch ist die Bildung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α gestört.

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob die 3020 insC Mutation in Zusammenhang mit der Pathogenese chronisch marginaler Parodontitiden steht. An der Studie nahmen 80 Probanden mit chronischer Parodontitis und 122 gesunde Kontrollprobanden teil, die bezüglich der 3020insC Mutation des NOD2 Proteins genotypisiert wurden.

Die Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied der Prävalenz der 3020insC Mutation des NOD2/CARD15 Gens zwischen Untersuchungsgruppe und Kontrollgruppe hinsichtlich der Allel- bzw. der Genotypenverteilung. Auch der Vergleich zwischen Schweregrad der Parodontitis und der 3020insC Mutation war nicht signifikant. Bei der geschlechtsspezifischen Differenzierung

konnte ebenfalls kein Unterschied festgestellt werden. Die 3020insC Mutation des NOD2/CARD15 Gens scheint damit keinen pathophysiologischen Einfluss auf die chronische Parodontitis zu besitzen.

In zukünftigen Studien sollten u.a. die Zusammenhänge zwischen Stimulierung von Monozyten/Makrophagen durch bakterielle Toxine und genetischen Polymorphismen weiter erforscht werden.

Literaturverzeichnis

- ABBAS, A.K., LICHTMAN A.H., POBER J.S.: Immunologie. Bern; Göttingen; Toronto; Seattle; Huber Verlag (1996).
- ADEREM, A., ULEVITCH, R.J.: Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* (2000); 406: 785-787.
- AGNESE, D.M., CALVANO, J.E., HAHM, S.J., COYLE, S.M., CORBETT, S.A., CALVANO, S.E., LOWRY, S.F.: Human Toll-like receptor 4 mutation but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* (2002); 186: 1522-1525.
- ALIPRANTIS, A.O., WEISS, D.S., ZYCHLINSKY, A.: Toll-like receptor-2 transduces signals for NF-kappa B activation, apoptosis and reactive oxygen species production. *J Endotoxin Res* (2001); 7(4): 287-91.
- ALIPRANTIS, A.O., YANG, R.B., MARK, M.R., SUGETT, S., DEVAUX, B., RADOLF, J.D., KLIMPEL, G.R., GODOWSKI, P., ZYCHLINSKY, A.: Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* (1999); 285: 736-739.
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY (AAP): Periodontal diseases: Pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol* (1996); 1: 926-932.
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY: International workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* (1999); 21: 7-209.
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY: Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics. Chicago: *Ann Periodontol* (1989); 1989: I/23-I/24.
- ARMITAGE, G.C.: Diagnosis of Periodontal Diseases. *J Periodontol* (2003); 74: 1237-1247.
- BOCH, J.A., WARASWAPATI, N., AURON, P.E.: Interleukin 1 Signal Transduction-Current Concepts and Relevance to Periodontitis. *J Dent Res* (2001); 80: 400-407.

- CHO, J.H.: The Nod2 Gene in Crohn's Disease: Implications for Future Research Into the Genetics and Immunology of Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Disease* (2001); 7: 271-275.
- COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D.E., KORBER, D.R., LAPPIN-SCOTT, H.M.: Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* (1995); 49 : 711-745.
- DANIEL, M.A., VAN DYKE, T.E.: Alterations in phagocyte function and periodontal infection. *J Periodontol* (1996); 67: 1070-1075.
- DARVEAU, R.P., TANNER, A., PAGE, R.C.: The microbial challenge in periodontitis. *Periodontology 2000* (1997); 14: 12-32.
- DENNISON, D.K., VAN DYKE, T.E.: The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontology 2000* (1997); 14: 54-78.
- DUAN, Y., FISHER, E., MALAMUD, D., GOLUB, E., DEMUTH, D.R.: Calcium-binding properties of SSP-5, the *Streptococcus gordonii* M5 receptor for salivary agglutinin. *Infect Immun* (1994); 62: 5220-5226.
- ECKMANN, L., JUNG, H., YANG, S.K., PANJA, A., FIERER, J., MORZYCKA-WROBLEWSKA, E., KAGNOFF, M.F.: A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* (1995); 95:55-65.
- GAMONAL, J., BASCONES, A., ACEVEDO, A., BLANCO, E., SILVA, A.: Apoptosis in chronic adult periodontitis analyzed by in situ DNA breaks, electron microscopy, and immunohistochemistry. *J Periodontol* (2001); 72: 517-525.
- GEMMELL, E., MARSHALL, R.I., SEYMOUR, G.J.: Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology 2000* (1997); 14: 112-143.
- GENCO, R.J.: Current view of risk factors for periodontal disease. *J Periodontol* (1996); 67: 1041-1049.

- GIRARDIN, S.E., BONECA, I.G., VIALA, J., CHAMAILLARD, M., LABIGNE, A., THOMAS, G., PHILPOTT, D.J., SANSONETTI, P.J.: Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *JBC Papers* (in press) (2003).
- GUHA, M. & MACKMAN, N.: LPS induction of genes expression in human monocytes. *Cellular signalling* (2001); 13: 85-94.
- HAFFAJEE, A.D. & SOCRANSKY, S.S.: Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000* (1994); 5: 78-111.
- HAMPE, J., CUTHBERT, A., CROUCHER, P.J.P., MIRZA, M.M., MASCHERETTI, S., FISHER, S., FRENZEL, H., KING, K., HASSELMAYER, A., MAC PHERSON, A.J.S., BRIDGER, S., VAN DEVENTER, S., FORBES, A., NIKOLAUS, S., LENNARD-JONES, J.E., FOELSCH, U.R., KRAWCZAK, M., LEWIS, C., SCHREIBER, S., MATHEW, C.G.: Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* (2001); 357: 1925-1928.
- HAMPE, J., GREBE, J., NIKOLAUS, S., SOLBERG, C., CROUCHER, P.J., MASCHERETTI, S., JAHNSEN, J., MOUM, B., KLUMP, B., KRAWCZAK, M., MIRZA, M.M., FOELSCH, U.R., VATN, M., SCHREIBER, S.: Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet* (2002); 359: 1661-1665.
- HART, T.C., KORNMAN, K.S.: Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000* (1997); 14: 202-215.
- HELLWIG, E., KLIMEK, J., ATTIN, T.: Einführung in die Zahnerhaltung. München; Jena; Urban & Fischer Verlag (1999).
- HSU, S.D., CISAR, J.O., SANDBERG, A.L., KILIAN M.: Adhesive properties of viridans streptococcal species. *Microb Ecol Health Dis* (1994); 7: 125-137.

- HUGOT, J.P., CHAMAILLARD, M., ZOUALI, H., LESAGE, S., CEZARD, J.P., BELAICHE, J., ALMER, S., TYSK, C., O'MORAIN, C.A., GASSULL, M., BINDER, V., FINKEL, Y., CORTOT, A., MODIGLIANI, R., LAURENT-PUIG, P., GOWER-ROUSSEAU, C., MACRY, J., COLOMBEL, J.F., SAHBATOU, M., THOMAS, G.: Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* (2001); 411: 599-603.
- INOHARA, N., KOSEKI, T., DEL PESO, L., HU, Y., YEE, C., CHEN, S., CARRIO, R., MERINO, J., LIU, D., NI, J., NUNEZ, G.: Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor kappa B. *J Biol Chem* (1999); 274: 14560-14567.
- INOHARA, N., OGURA, Y., CHEN, F.F., MUTO, A., NUNEZ, G.: Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* (2001); 276: 2551-2554.
- INOHARA, N., OGURA, Y., FONTALBA, A., GUTIERREZ, O., PONS, F., CRESPO, J., FUKASE, K., INAMURA, S., KUSUMOTO, S., HASHIMOTO, M., FOSTER, S.J., MORAN, A.P., FERNANDEZ-LUNA, J.L., NUNEZ, G.: Host Recognition of Bacterial Muramyl Dipeptide Mediated through NOD2. *J Biol Chem* (2003); 278: 5509-5512.
- INOHARA, N., OGURA, Y., NUNEZ, G.: Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr Opin Microbiol* (2002); 5: 76-80.
- ISHIKAWA, I., NAKASHIMA, K., KOSEKI, T., NAGASAWA, T., WATANABE, H., ARAKAWA, S., NITTA, H., NISHIHARA, T.: Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000* (1997); 14: 79-111.
- KHOURY, A.E., LAM, K., ELLIS, B., COSTERTON, J.W.: Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. *Am Soc Artif Intern Organs* (1992); 38: 174-178.

- KORNMAN, K.S., CRANE, A., WANG, H.Y., DI GIOVINE, F.S., NEWMAN, M.G., PIRK, F.W., WILSON, T.G., HIGGINBOTTOM, F.L., DUFF, G.W.: The interleukin 1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* (1997a); 24:72-77.
- KORNMAN, K.S., PAGE, R.C., TONETTI, S.: The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology* 2000 (1997 b); 14: 33-53.
- KORZENIK, J.R. & DICKGRAEFE, B.K.: Is Crohn's Disease an Immunodeficiency? A Hypothesis Suggesting Possible Early Events in the Pathogenesis of Crohn's Disease. *Digestive Diseases and Sciences* (2000); 45: 1121-1129.
- LAINE, M.L., FARRE, M.A., GARCIA-GONZALEZ, M.A., VAN DIJK, L.J., HAM, A.J., WINKEL, E.G., CRUSIUS, J.B., VANDENBROUCKE, J.P., VAN WINKELHOFF, A.J., PENA, A.S.: Risk factors in adult periodontitis: polymorphism in the interleukin-1 gene family. *Ned Tijdschr Tandheelkd* (2002); 109: 303-306.
- LOE, H., ANERUD, A., BOYSEN, H., MORRISON, E.: Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol* (1986); 13(5): 431-445.
- LOEFFLER, G.: *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Berlin; Heidelberg; New York; Barcelona; Budapest; Hongkong; London; Mailand; Paris; Singapur; Tokio; Springer Verlag (1999).
- LOESCHE, W.J.: The antimicrobial treatment of periodontal disease: changing the treatment paradigm. *Crit Rev Oral Biol Med* (1999); 10: 245-275.
- LOPPNOW, H., BRADE, H., DURRBAUM, I., DINARELLO, C.A., KUSUMOTO, S., RIETSCHEL, E.T., FLAD, H.D.: IL-1 induction-capacity of defined lipopolysaccharides partial structures. *J Immunol* (1989); 142: 3229-38.

- LORENZ, E., JONES, M., WOHLFORD-LENANE, C., MEYER, N., FREES, K.L., ARBOUR, N.C., SCHWARTZ, D.A.: Genes other than TLR4 are involved in the response to inhaled LPS. *Am Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2001); 281: 1106-1114.
- LOWENGUTH, R.A., CHIN, I., CATON, J.G., COBB, C.M., DRISKO, C.L., KILLOY, W.J., MICHALOWICZ, B.S., PIHLSTROM, B.L., GOODSON, J.M.: Evaluation of periodontal treatments using controlled-release tetracycline fibers: microbiological response. *J Periodontol* (1995); 66(8): 700-707.
- MICHALOWICZ, B.S., DIEHL, S.R., GUNSOLLEY, J.C., SPARKS, B.S., BROOKS, C.N., KOERTGE, T.E., CALIFANO, J.V., BURMEISTER, J.A., SCHENKEIN, H.A.: Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol* (2000); 71: 1699-1707.
- MOMBELLI, A., CASAGNI, F., MADIANOS, P.N.: Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol* (2002); 29: 10-21.
- MOUGHAL, N.A., ADONOGIANAKI, E., THORNHILL, M.H., KINANE, D.F.: Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally induced gingivitis. *J Periodont Res* (1992); 27: 623-630.
- MÜLLER, H.P. : *Parodontologie*. Stuttgart ; New York ; Thieme Verlag (2001).
- NICHOLS, T.C., FISCHER, T.H., EFTHYMOS, N.D., BALDWIN, A.S.: Role of nuclear factor kappa B (NF- κ B) in inflammation, periodontitis, and atherogenesis. *Ann Periodontol* (2001); 6: 20-29.
- NYMAN, S., & LINDHE, J.: Examination of patients with periodontal disease. In: LINDHE, J., KARRING, T., LANG, N.P.: *Clinical periodontology and implant dentistry* (1997); 383-395.

- OETHRINGER, M.: Mikrobiologie und Immunologie. Stuttgart; Jena; Lübeck; Ulm; Gustav Fischer Verlag (1997).
- OFFENBACHER, S. : Periodontal disease: pathogenesis. *Ann Periodontol* (1996); 1: 821- 878.
- OGURA, Y., BONEN, D.K., INOHARA, N., NICOLAE, D.L., CHEN, F.F., RAMOS, R., BRITTON, H., MORAN, T., KARALIUSKAS, R., DUERR, R.H., ACHKAR, J.P., BRANT, S.R., BAYLESS, T.M., KIRSCHNER, B.S., HANAUER, S.B., NUNEZ, G., CHO, J.H.: A frameshift mutation in Nod2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* (2001a); 411: 603-606.
- OGURA, Y., INOHARA, N., BENITO, A., CHEN, F.F., YAMAOKA, S., NUNEZ, G.: Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappa B. *J Biol Chem* (2001b); 276: 4812-4818.
- PAGE, R.C., OFFENBACHER, S., SCHROEDER, H.E., SEYMOUR, G.J., KORNMAN, K.S.: Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications. *Periodontology 2000* (1997); 14: 216-248.
- PAGE, R.C.: Host response tests for diagnosing periodontal diseases. *J Periodontol* (1992); 63, 356-366.
- PAGE, R.C.: The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol Res* (1991); 26: 230-242.
- PHILPOTT, D.J., YAMAOKA, S., ISRAEL, A., SANSONETTI, P.J.: Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J Immunol* (2000) ; 165: 903-914.
- RADLMAYR, M., TÖRÖK, H.P., MARTIN, K., FOLWACZNY, C.: The c-insertion mutation of the NOD2 gene is associated with fistulizing and fibrostenotic phenotypes in Crohn's disease. *Gastroenterology* (2002); 122: 2091-2092.
- REYNOLDS, J.J., MEIKLE, M.C.: Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontology 2000* (1997); 14: 144-157.

- ROGLER, G., BRAND, K., VOGL, D., PAGE, S., HOMEISTER, R., ANDUS, T., KNUECHEL, R., BAEUERLE, P.A., SCHOELMERICH, J., GROSS, V.: Nuclear factor kappa B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* (1998); 115: 357-369.
- SALVI, G.E., LAWRENCE, H.P., OFFENBACHER, S., BECK, J.D.: Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000* (1997); 14: 173-201.
- SANDERS, L.A.M., FELDMAN, R.G., VOORHORTS-OGINK, M.M., DE HAAS, M., RIJKERS, G.T., CAPEL, P.J., ZEGERS, B.J., VAN DE WINKEL, J.G.: Human immunoglobulin G (IgG) Fc receptor IIA (CD32) polymorphism and IgG₂-mediated bacterial phagocytosis by neutrophils. *Infect Immun* (1995); 63: 73-81.
- SCAREL-CAMINAGA, R.M., TREVILATTO, P.C., SOUZA, A.P., BRITO, R.B., LINE, S.R.: Investigation of an IL-2 polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* (2002); 29: 587-591.
- SCHREIBER, S., NIKOLAUS, S., HAMPE, J.: Activation of nuclear factor κ B in inflammatory bowel disease. *Gut* (1998); 42: 477-484.
- SCHWARTZ, Z., GOULTSCHIN, J., DEAN, D.D., BOYAN, B.: Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontology 2000* (1997); 14: 158-172.
- SEYMOUR, G.J.: Importance of the host response in the periodontium. *J Clin Periodontol* (1991); 18: 421-426.
- SHAPIRA, L., STABHOLZ, A., RIECKMANN, P., KRUSE, N.: Genetic polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF)-alpha promotor region in families with localized early-onset periodontitis. *J Periodontol Res* (2001); 36: 183-186.
- SOCRANSKY, S.S.: Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol* (1979); 6(Special Issue): 16-21.

- TAKASHIBA, S., VAN DYKE, T.E., AMAR, S., MURAYAMA, Y., SOSKOLNE, A.W., SHAPIRA, L.: Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor kappaB. *Infect Immun* (1999); 67: 5573-5578.
- TEMELES, DS., MCGRATH, H.E., KITTLER, E.L., SHADDUCK, R.K., KISTER, V.K., CRITTENDEN, R.B., TURNER, B.L., QUESENBERRY, P.J.: Cytokine expression from bone marrow derived macrophages. *Exp Dermatol* (1993); 21: 388-393.
- TERVAHARTIALA, T., KOSKI, H., XU, J.W., HAYRINEN-IMMONEN, R., HIETANEN, J., SORSA, T., KONTTINEN, Y.T.: Tumor necrosis factor-alpha and its receptors, p55 and p75, in gingiva of adult periodontitis. *J Dent Res* (2001); 80:1684.
- TONETTI, M.S., FREIBURGHANUS, K., LANG, N.P., BICKEL, M.: Detection of interleukin-8 and matrix metalloproteinase transcripts in healthy and diseased gingival biopsies by RNA/PCR. *J Periodontol Res* (1993); 28: 511-513.
- TONETTI, M.S., MOMBELLI, A.: Early-Onset Periodontitis. *Ann Periodontol* (1999); 4: 39-52.
- TONETTI, M.S.: Molecular factors associated with compartmentalization of gingival immune response and transepithelial neutrophil migration. *J Periodont Res* (1997); 32: 104-108.
- VAN HEECKEREN, A.M., RIKIHISHA, Y., PARK, J., FERTEL, R.: Tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 alpha, interleukin-6, and prostaglandin E2 production in murine peritoneal macrophage infected with *Ehrlichia risticii*. *Infect Immun* (1993); 61: 4333-4337.
- VAN HEEL, D.A., MCGOVERN, D.P.B., JEWELL, D.P.: Crohn's disease: genetic susceptibility, bacteria, and innate immunity. *Lancet* (2001); 357: 1902-1904.

- WALKER, S.J., VAN DYKE, T.E., RICH, S., KORNMANN, K.S., DI GIOVINE, F.S., HART, T.C.: Genetic polymorphisms of the IL-1 α and IL-1 β Genes in African-American LJP Patients and an African-American Control Population. *J Periodontol* (2000); 71 : 723-728.
- WIEBE, C.B., PUTNINS, E.E.: The Periodontal Disease Classification System of the American Academy of Periodontology – An Update. *J Can Dent Assoc* (2000); 66: 594-597.
- WHITTAKER, C.J., KLIER, C.M., KOLENBRANDER, P.E.: Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol* (1996); 50: 513-552.
- WILLIAMS, R.C., PAQUETTE, D.W.: Understanding the pathogenesis of periodontitis: a century of discovery. *J Int Acad Periodontol* (2000); 2: 59-63.
- YOSHIDA, H.: The role of Apaf-1 in programmed cell death: from worm to tumor. *Cell structure and function* (2003); 28: 3-9.
- ZAREIE, M., SINGH, P.K., IRVINE, E.J., SHERMAN, P.M., MCKAY, D.M., PERDUE, M.H.: Monocyte/macrophage activation by normal bacteria and bacterial products. *Am J Pathol* (2001); 158: 1101-1109.

Anhang

Beispiel für PCR-Kontrollgel (s.o. Abschnitt 6.2.8)

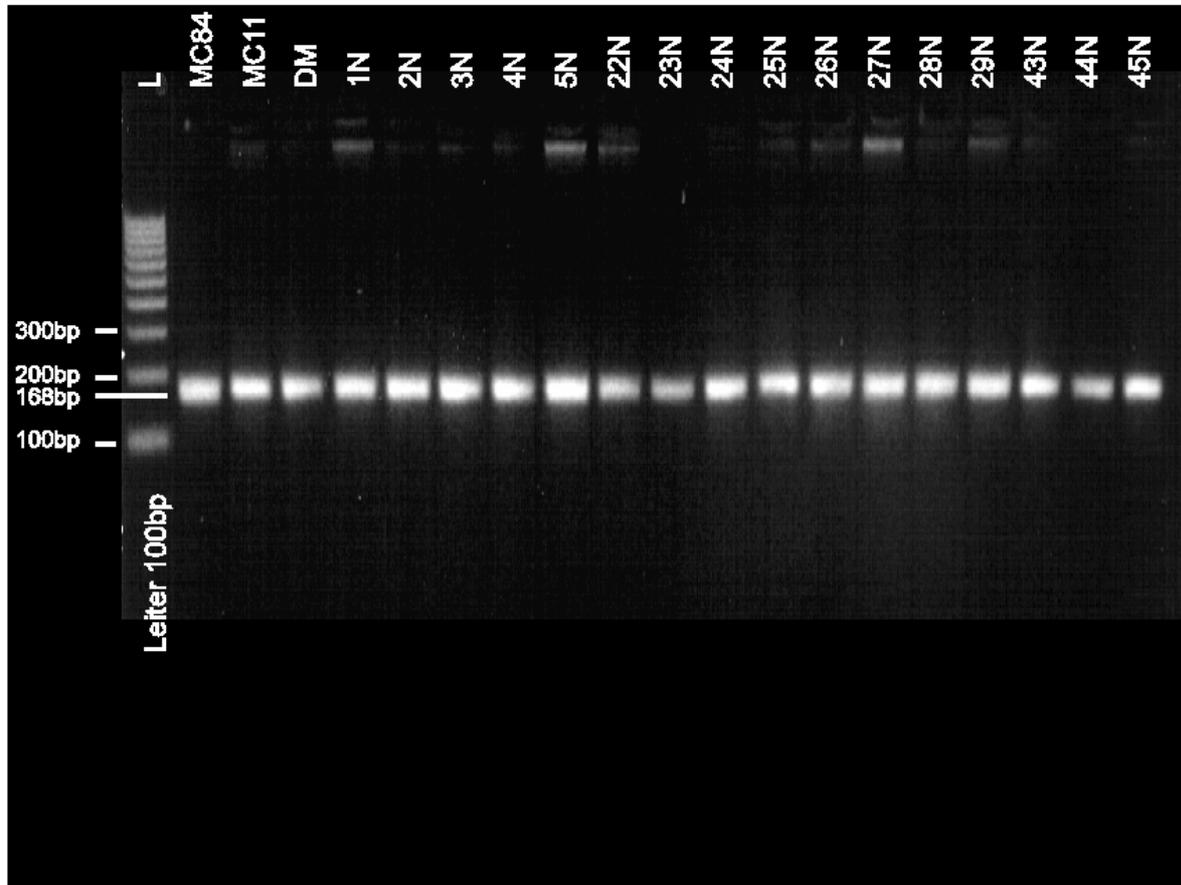


Abbildung 18: PCR-Kontrollgel für die Patienten 1N-5N, 22N-29N, 43N-44N

Danksagung

Eine Reihe von Umständen begünstigten die Entstehung der vorliegenden Arbeit, für die ich sehr dankbar bin. An erster Stelle möchte ich meinen Doktorvater PD Dr. Dr. Matthias Folwaczny nennen, der mir im Wintersemester 2000/01 dieses interessante Thema überließ. Für seine wohlwollende Hilfeleistung und Geduld während der Entstehung meiner Arbeit danke ich ihm oftmals. Mein Dank gilt weiterhin Frau Helga Török und Herrn Jürgen Glas, die mich in die Labortechnik eingeführt haben. Deren Unterstützung hat zum Gelingen des experimentellen Teils erheblich beigetragen. Herrn PD Dr. Christian Folwaczny ist für die Bereitstellung des gastroenterologischen Labors und der nötigen Materialien zu danken, meiner Kollegin Monika Mende für die Unterstützung bei der gemeinsamen Auswahl der Probanden und für die anregenden Diskussionen. Den Patienten, die sich für die Untersuchung zur Verfügung gestellt haben, bin ich ebenfalls zu Dank verpflichtet. Meinem Vater Lutz Mauermann und meinem Bruder Tobias Mauermann danke ich für viele hilfreiche Gespräche.

Augsburg, im Dezember 2003

Daniel Mauermann

Lebenslauf

Name: Daniel Mauermann
Geburtsdatum: 22.01.1977
Geburtsort: Augsburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: evang.-luth.
Eltern: Dr. phil. Lutz Mauermann, Akademischer Direktor
Gudrun Mauermann, Hausfrau
Geschwister: ein Bruder (Jahrgang 1974)
Anschrift: Hinter den Gärten 3, 86157 Augsburg

Schulbildung

1983 – 1984 Grundschule Oberottmarshausen, Landkr. Augsburg
1984 – 1987 König-Otto-Grundschule Königsbrunn
1987 – 1996 Math.-Nat. Gymnasium Königsbrunn
28.06.1996 Allgemeine Hochschulreife
1996 – 1997 Zivildienst im Fritz-Felsenstein-Haus e.V. Königsbrunn
(Geistig- und Körperbehindertenpflege)

Studium

1997 – 2003 Studium der Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
13.10.1998 Naturwissenschaftliche zahnärztliche Vorprüfung
23.03.2000 Zahnärztliche Vorprüfung
07.02.2003 Zahnärztliche Prüfung
25.02.2003 Erhalt der Approbation als Zahnarzt
Februar bis Juni 2003 Promotionsstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Beruf

16.06. – 21.11.2003 Vorbereitungsassistent in der Praxis Dr. K. Häring, Burgau/Schwaben
seit 01.12.2003 Vorbereitungsassistent in der Praxis Dr. K.-R. Eckle, Augsburg