

Aus der Abteilung Prothetik
(komm. Direktor: Dr. med. dent. N. Gersdorff)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Individualisierte Microarrayanalyse von PDL-Gewebe von Patienten mit
Parodontitis

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Michael Felix Stein
aus Lüneburg

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. N. Miosge

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. T. Beissbarth

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 2011

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1. Der Zahn.....	1
1.1 Zahnentwicklung.....	1
1.2 Histologie der Zähne.....	2
1.2.1 Schmelz.....	3
1.2.2 Dentin.....	5
1.2.3 Zement.....	7
1.2.4 Pulpa.....	8
1.3 Der Zahnhalteapparat (Parodontium).....	9
1.3.1 Parodontales Ligament.....	10
1.3.2 Alveolarknochen.....	12
1.3.3 Gingiva.....	13
2. Parodontitis.....	16
2.1 Definition und Klassifikation der Parodontalerkrankungen.....	16
2.2 Chronische Parodontitis.....	16
2.3 Abwehrmechanismen des Parodonts.....	19
3. Aufgabenstellung.....	22
4. Material und Methoden.....	23
4.1 Probenmaterial.....	23
4.2 Isolation der mRNA aus dem PDL.....	24
4.3 Umschreiben der mRNA in cDNA.....	25
4.4 Quantitative real-time Polymerase-Chain-Reaction (PCR).....	26
4.4.1 Allgemeines zur Methode.....	26
4.4.2 Pipettierschema.....	28
4.4.3 PCR-Programm.....	29
4.4.4 Statistik.....	29
4.4.5 Primerdesign.....	30
4.4.6 Gradienten-PCR.....	31
4.4.7 Sequenzierung der PCR-Produkte.....	32

Inhaltsverzeichnis

4.4.8	BLAST-Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool).....	32
4.5	Microarray.....	32
4.5.1	Vorbereitung der Proben für die Microarray-Analyse.....	32
4.5.2	Analyse der Daten.....	33
5.	Ergebnisse.....	35
5.1	Ergebnisse der Microarray-Analyse.....	35
5.1.1	Ergebnisse der Kollagen-Typ-I-Expression bei der Microarray-Analyse.....	37
5.1.2	Ergebnisse der Kollagen-Typ-IV-Expression bei der Microarray-Analyse.....	38
5.1.3	Ergebnisse der α -2-Macroglobulin-Expression bei der Microarray-Analyse.....	39
5.1.4	Ergebnisse der CD27-Expression bei der Microarray-Analyse.....	40
5.1.5	Ergebnisse der Hitzeschockprotein-90-kDa-alpha-class-A-member-1-Expression bei der Microarray-Analyse.....	41
5.1.6	Ergebnisse der Interleukin-28-Rezeptor-alpha-Expression bei der Microarray-Analyse.....	42
5.1.7	Ergebnisse der Phosphat-regulierende-Endopeptidase-Expression bei der Microarray-Analyse.....	43
5.2	Ergebnisse der real-time (RT)-PCR.....	44
5.2.1	Ergebnisse der Kollagen-Typ-I-Expression bei der real-time (RT)-PCR-Analyse	45
5.2.2	Ergebnisse der Kollagen-Typ-IV-Expression bei der real-time (RT)-PCR-Analyse.....	46
5.2.3	Ergebnisse der α -2-Macroglobulin-Expression bei der real-time (RT)-PCR-Analyse.....	47
5.2.4	Ergebnisse der CD27-Expression bei der real-time (RT)-PCR-Analyse.....	48
5.2.5	Ergebnisse der Hitzeschockprotein-90-kDa-alpha-class-A-member-1-Expression bei der real-time (RT)-PCR-Analyse.....	49
5.2.6	Ergebnisse der Interleukin-28-Rezeptor-alpha-Expression bei der real-time (RT)-PCR-Analyse.....	50
5.2.7	Ergebnisse der Phosphat-regulierende-Endopeptidase-Expression bei der real-time (RT)-PCR-Analyse.....	51
5.3	Übersicht der Ergebnisse.....	52
6.	Diskussion.....	53
6.1	Diskussion zur Methode.....	53
6.2	Diskussion der Ergebnisse.....	54
6.2.1	Kollagen Typ I alpha 1.....	54

Inhaltsverzeichnis

6.2.2	Kollagen Typ IV alpha 1.....	55
6.2.3	alpha-2-Macroglobulin.....	55
6.2.4	CD27.....	55
6.2.5	Hitzeschockprotein 90-kDa alpha class A member 1.....	56
6.2.6	Interleukin-28-Rezeptor alpha.....	57
6.2.7	Phosphat regulierende Endopeptidase.....	57
6.3	Bezug zu vergleichbaren Dissertationen.....	58
6.4	Ausblick.....	59
6.5	alpha-2-Macroglobulin als möglicher Therapieansatz bei der Parodontitis..	59
7.	Zusammenfassung.....	60
8.	Literaturverzeichnis.....	61

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Zahnentwicklung	S. 2
Abbildung 2	Histologie des Zahnes	S. 2
Abbildung 3	Längsschnitt durch einen nicht-entkalkten Zahn	S. 5
Abbildung 4	Schematische Darstellung der Pulpazonen	S. 9
Abbildung 5	Parodontium	S. 10
Abbildung 6	Die untereinander verflochtenen kollagenen Faserbündel	S. 12
Abbildung 7	Verlauf der gingivalen Faserbündel im vertikalen Schnitt	S. 14
Abbildung 8	Gesunde Gingiva (blaßrosa und gestipelt)	S. 14
Abbildung 9	Bereich des Zahnes, in dem PDL-Gewebe gewonnen wurde	S. 23
Abbildung 10	Darstellung der gemessenen Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl	S. 27
Abbildung 11	Exemplarische Schmelzkurve einer quantitativen real-time PCR	S. 28
Abbildung 12	Expression von Kollagen Typ I beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (Microarray) (G: Gesund; P: Parodontitis)	S. 37
Abbildung 13	Expression von Kollagen Typ I beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (Microarray)	S. 37
Abbildung 14	Expression von Kollagen Typ IV beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (Microarray) (G: Gesund; P: Parodontitis)	S. 38
Abbildung 15	Expression von Kollagen Typ IV beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (Microarray)	S. 38
Abbildung 16	Expression von α -2-Macroglobulin beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (Microarray) (G: Gesund; P: Parodontitis)	S. 39
Abbildung 17	Expression von α -2-Macroglobulin beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (Microarray)	S. 39
Abbildung 18	Expression von CD 27 beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (Microarray) (G: Gesund; P: Parodontitis)	S. 40

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 19 Expression von CD 27 beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (Microarray) S. 40
- Abbildung 20 Expression von Hitzeschockprotein 90 kDa alpha class A member 1 beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (Microarray) (G: Gesund; P: Parodontitis) S. 41
- Abbildung 21 Expression von Hitzeschockprotein 90 kDa alpha class A member 1 beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (Microarray) S. 41
- Abbildung 22 Expression von Interleukin-28-Rezeptor alpha beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (Microarray) (G: Gesund; P: Parodontitis) S. 42
- Abbildung 23 Expression von Interleukin-28-Rezeptor alpha beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (Microarray) S. 42
- Abbildung 24 Expression der Phosphat regulierenden Endopeptidase beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (Microarray) (G: Gesund; P: Parodontitis) S. 43
- Abbildung 25 Expression der Phosphat regulierenden Endopeptidase beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (Microarray) S. 43
- Abbildung 26 Expression von Kollagen Typ I beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (real-time (RT)-PCR) (G: Gesund; P: Parodontitis) S. 45
- Abbildung 27 Expression von Kollagen Typ I beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (real-time (RT)-PCR) S. 45
- Abbildung 28 Expression von Kollagen Typ IV beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (real-time (RT)-PCR) (G: Gesund; P: Parodontitis) S. 46
- Abbildung 29 Expression von Kollagen Typ IV beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (real-time (RT)-PCR) S. 46

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 30 Expression von α -2-Macroglobulin beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (real-time (RT)-PCR) (G: Gesund; P: Parodontitis) S. 47
- Abbildung 31 Expression von α -2-Macroglobulin beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (real-time (RT)-PCR) S. 47
- Abbildung 32 Expression von CD 27 beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (real-time (RT)-PCR) (G: Gesund; P: Parodontitis) S. 48
- Abbildung 33 Expression von CD 27 beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (real-time (RT)-PCR) S. 48
- Abbildung 34 Expression von Hitzeschockprotein 90 kDa alpha class A member 1 beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (real-time (RT)-PCR) (G: Gesund; P: Parodontitis) S. 49
- Abbildung 35 Expression von Hitzeschockprotein 90 kDa alpha class A member 1 beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (real-time (RT)-PCR) S. 49
- Abbildung 36 Expression von Interleukin-28-Rezeptor alpha beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (real-time (RT)-PCR) (G: Gesund; P: Parodontitis) S. 50
- Abbildung 37 Expression von Interleukin-28-Rezeptor alpha beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (real-time (RT)-PCR) S. 50
- Abbildung 38 Expression der Phosphat regulierenden Endopeptidase beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (real-time (RT)-PCR) (G: Gesund; P: Parodontitis) S. 51
- Abbildung 39 Expression der Phosphat regulierenden Endopeptidase beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (real-time (RT)-PCR) S. 51

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Zusammensetzung des Mastermixes	S. 28
Tabelle 2	PCR-Programm	S. 29
Tabelle 3	Oligonukleotidprimer für die real-time (RT)-PCR	S. 30
Tabelle 4	Pipettieransatz der Gradienten-PCR	S. 31
Tabelle 5	Programm der Gradienten-PCR	S. 31
Tabelle 6	Auflistung der Gene geordnet nach P-Wert	S. 35 - 36

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

a2macro	alpha-2-Macroglobulin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Basenpaare
Col I a1	Kollagen Typ I alpha 1
Col IV a1	Kollagen Typ IV alpha 1
ct	threshold cycle
EZM	Extrazelluläre Matrix
Hsp90	Hitzeschockprotein 90 kDa alpha class A member 1
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IL28RA	Interleukin-28-Rezeptor alpha
KHN	Knoop-hardness numbers
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MHC	Major histocompatibility complex
MMP	Matrixmetalloproteinase
MT-MMP	Membrane-type-MMP
NF- κ B	nukleärer Transkriptionsfaktor κ B
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDL	Parodontales Ligament
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
phex	Phosphat regulierende Endopeptidase
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR
Temp.	Temperatur
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAF	(TNF)-Rezeptor-assozierte Faktoren

Einleitung

1. Der Zahn

1.1 Zahnentwicklung

Ende der fünften Schwangerschaftswoche entstehen die Zähne durch ein Zusammenspiel aus Ektoderm und Mesenchym. Aus dem ektodermalen Mundhöhlenepithel wächst die Zahnleiste in das Mesenchym hinein. Zwischen der achten und 17. Schwangerschaftswoche entstehen am freien Rand der Zahnleiste jeweils fünf Anlagen der Milchzähne, welche sich während dieser Zeit vom Knospen- bis zum Glockenstadium entwickeln. Die Zahnleiste bildet sich danach zurück, nur ihr unterer Rand bleibt als Ersatzzahnleiste erhalten, aus der später die permanenten Zähne hervorgehen.

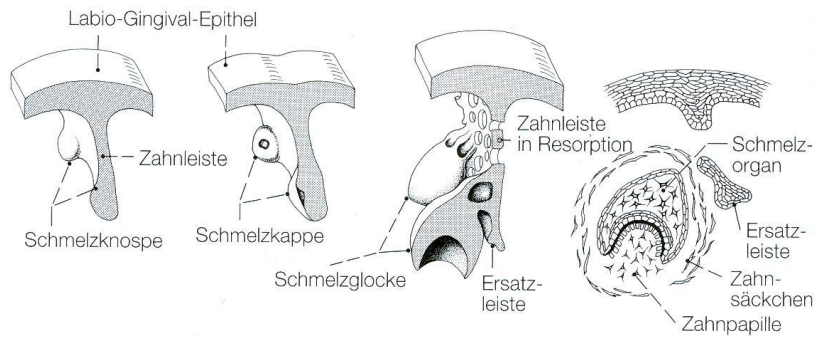
Aus dem Epithel der Zahnleiste entwickelt sich das epitheliale Schmelzorgan, das aus einem äußeren- und einem inneren Schmelzepithel und der Schmelzpulpa besteht. Tritt das epitheliale Schmelzorgan mit dem Mesenchym in Kontakt, verdichtet sich dieses zur Zahnpapille. Im Schmelzorgan, an der Grenze zur Papille, entwickeln sich die Ameloblasten aus dem inneren Schmelzepithel. Am Rand der Zahnpapille, angrenzend an das Schmelzorgan, differenzieren sich die Odontoblasten. Der übrige Teil der Zahnpapille entwickelt sich zur Zahnpulpa.

Die Odontoblasten bilden das noch unverkalkte Prädentin, welches durch die Ablagerung von Apatitkristallen zum definitiven Dentin mineralisiert. Der Zellkörper bleibt außerhalb des Dentins. Nur die Fortsätze, die Tomesschen Fasern, liegen in den Dentinkanälchen. Kurz nach Beginn der Dentinbildung bilden die Ameloblasten an ihrem zum Dentin gerichteten Zellpol die Schmelzmatrix, deren Mineralisation und Kristallisation in Schüben erfolgt. Nach Vollendung der Schmelzbildung gehen die Ameloblasten zugrunde.

Nach der Bildung der Krone wächst der Schmelzglockenrand mit äußerem und innerem Schmelzepithel in die Tiefe und bildet die sogenannte epitheliale Hertwigsche Wurzelscheide, welche die Bildung des Wurzeldentins induziert. Der Zement entwickelt sich aus den inneren Anteilen des Zahnsäckchens, aus den mittleren Anteilen entsteht das Parodontium und aus den äußeren Anteilen geht der Alveolarknochen hervor.

Einleitung

Abbildung 1: Zahnentwicklung

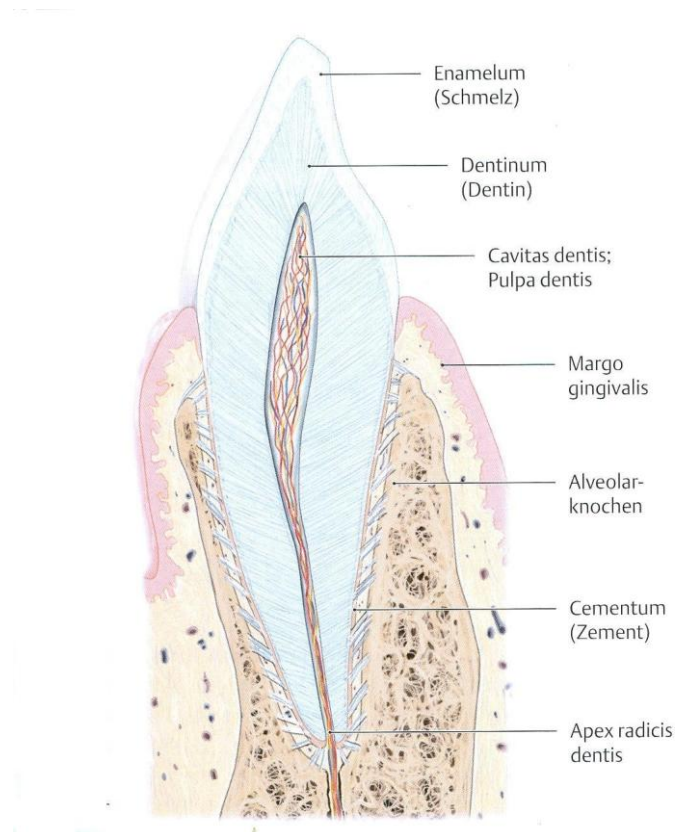


(aus Benninghoff und Drenckhahn, 2008, S.608)

1.2 Histologie der Zähne

Der Zahn besteht aus Zahnpulpa und Hartsubstanzen. Bei den Hartsubstanzen können drei verschiedene Arten unterschieden werden: Schmelz, Dentin und Zement.

Abbildung 2: Histologie des Zahnes



(aus Schünke et al., 2006, S.37)

Einleitung

1.2.1 Schmelz

Der Schmelz bildet die Außenbedeckung der Zahnkrone und ist zellfrei. Die Dicke schwankt zwischen wenigen μm am Zahnhals bis zu 2,5 mm an den Spitzen der Zahnhöcker (Welsch 2003). Die mittlere Dichte schwankt je nach Stelle der Analysenentnahme, dem „Reifezustand“ und der chemischen Zusammensetzung zwischen 2,8 und 3,0. Im Durchschnitt liegt die Härte zwischen 250 KHN (Knoop-hardness numbers) an der Schmelz-Dentin-Grenze und 390 KHN an der Schmelzoberfläche. Er wird nur während der Zahnentwicklung von den Ameloblasten gebildet und besteht zum Hauptteil aus anorganischen Komponenten, wobei die Menge der anorganischen Verbindung je nach Analysemethode und analysierter Probe zwischen 93 und 98 Gew.% schwankt. Der zweitgrößte Bestandteil ist Wasser, dessen Anteil zwischen 1,5 und 4 Gew.% schwankt. Der Rest setzt sich aus organischen Verbindungen wie Proteinen und Lipiden zusammen.

Die Zusammensetzung des Schmelzes wird durch zahlreiche Faktoren, wie Ernährung, Alter und zahnärztliche Maßnahmen, beeinflusst. Hauptsächlich besteht der Schmelz aus Kalzium, Phosphor, Karbonat, Magnesium und Natrium. Insgesamt wurden bisher über 40 Spurenelemente im Zahnschmelz nachgewiesen. Die Zusammensetzung unterscheidet sich an verschiedenen Stellen eines einzelnen Zahnes. Erniedrigte Werte für die Schmelzdichte scheinen mit dem Magnesium- und Karbonatgehalt des Schmelzes zu korrelieren, so ist an Stellen mit erhöhter Magnesiumkonzentration (in der Nähe der Dentinhörner und direkt unter der zentralen Fissur des Zahnes) eine geringere Dichte festzustellen als an den stark mineralisierten Zonen, wie bukkale und linguale Zahnflächen. Kalzium und Phosphor liegen in einem Verhältnis von 1 : 1,2 als Apatitverbindung in Form kleiner Kristalle vor.

Das Wasser kommt zum einen in kristalliner Form als Hydratationsschale und zum anderen Teil frei und hauptsächlich an organische Materie gebunden vor. Der Zahnschmelz funktioniert wie ein Molekularsieb bzw. Ionenaustauscher, da das frei gebundene Wasser bei Erwärmung verdampfen kann, der Schmelz jedoch auch bei Feuchtigkeitzufuhr Wasser aufnehmen kann, so dass Ionen mit dem Flüssigkeitsstrom in und aus dem Schmelz gelangen.

Der organische Anteil besteht im ausgereiften Schmelz zu 58% aus Proteinen, zu 40% aus Lipiden und Spuren von Kohlenhydraten, Zitrat und Laktat.

Strukturell gliedert sich der Schmelz in Prismen und interprismatische Substanz.

Ein Schmelzprisma setzt sich aus etwa 100 Apatitkristallen zusammen. Diese sind annähernd hexagonal und stellen sich in der Seitenansicht als kleine Stäbchen dar. Ein Schmelzkristall

Einleitung

besitzt im Vergleich zu anderen biologischen Hartgeweben eine erhebliche Größe. So sind sie durchschnittlich 160 nm lang, 40-70 nm breit und 26 nm dick. Alle Schmelzkristalle besitzen eine Hydrationschale, umgeben von einer Protein- und Lipidschicht.

Die interprismatische Substanz wird auch aus Schmelzkristallen gebildet, allerdings liegen diese ungeordneter und bilden mit der Längsachse der Prismen einen Winkel von annähernd 90°.

Man kann drei Prismenverbände unterscheiden. So können die Prismenverbände in einer Art Schlüssellochstruktur, als Pferdehuftyp oder in Form eines zylindrischen Typs angeordnet sein.

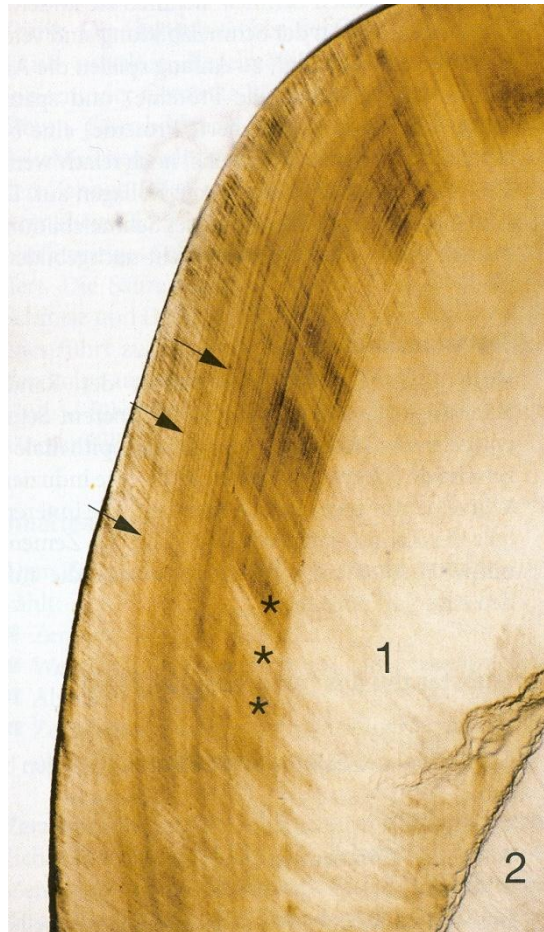
An der Oberfläche der menschlichen Zahnkrone befindet sich häufig eine 20 – 30 µm dicke prismenfreie Schicht, in der die Kristalle dicht gepackt parallel zur Oberfläche liegen.

Aufgrund der verschiedenen räumlichen Anordnung der Schmelzprismen zueinander zeigen sich im Schliff in den inneren zwei Dritteln des Zahnschmelzes von koronal nach zervikal abwechselnd dunkle und helle Streifen. Diese entstehen, da die Schmelzprismen sowohl in horizontaler als auch in vertikaler Richtung geschwungen verlaufen, so dass sie im Schnitt an einigen Stellen quer, an anderen Stellen längs zur Verlaufsrichtung getroffen werden. Dieses polarisationsoptische Phänomen wird Hunter-Schreger-Faserstreifung genannt.

Im Durchlichtmikroskop lassen sich außerdem die Retzius-Streifen erkennen. Sie entstehen durch den nicht kontinuierlich verlaufenden Prozess der Schmelzbildung und sind Ausdruck der periodischen Ruhephasen der Ameloblasten während der Schmelzbildung. Es handelt sich meist um hypomineralisierte Bereiche.

Einleitung

Abbildung 3: Längsschnitt durch einen nicht-entkalkten Zahn



(aus Welsch, 2003, S. 313)

1 Schmelz mit Retzius-Streifen (→) und Hunter-Schreger-Streifung (*); **2** Dentin

1.2.2 Dentin

Der größte Teil des menschlichen Zahnes besteht aus Dentin, welches die Pulpa umgibt. Im Bereich der Krone wird es von Schmelz und im Wurzelbereich von Zement bedeckt.

Das Dentin besteht zu 70 Gew.% aus anorganischem und zu 20 Gew.% aus organischem Material. Der Rest ist Wasser.

Der Großteil des organischen Anteils sind Kollagene. Der anorganische Anteil besteht, ähnlich dem Schmelz, hauptsächlich aus Phosphat und Kalzium, sowie verschiedenen Spurenelementen. Es liegt in kristalliner Form als Apatit bzw. amorphes Kalziumphosphat vor. Die Kristalle sind jedoch erheblich kleiner und dünner als die des Schmelzes. So beträgt ihre Länge 20 nm, die Breite 18 – 20 nm und die Dicke 3,5 nm. Zudem liegen sie nicht in Prismenform geordnet, sondern je nach Art des Dentins mehr oder weniger dicht gepackt vor.

Einleitung

Das Dentin wird von den Odontoblasten gebildet, deren Körper sich in der Zahnpulpa befinden und kann zeitlebens gebildet werden. Ihre Zellfortsätze durchziehen das Dentin, welche wiederum von 5-8 nm großen Filamenten durchzogen werden. Sie liegen in Dentinkanälchen und unterhalten das Dentin auch nach vollendeter Zahnbildung physiologisch.

Im Querschnitt unterscheiden sich Anzahl und Dichte der Dentinkanälchen des pulpenahen und des pulpenfernen Dentins. Der Durchmesser und das Volumen hängen auch vom Alter des Zahnes ab. Der Durchmesser der pulpenahen Dentinkanälchen beim jungen Menschen beträgt 4 – 5 μm . Etwa 80 % der Gesamtquerschnittsfläche des Dentins bestehen pulpenah aus dem Lumen der Dentinkanälchen, während es peripher nur etwa 4 % sind (im entkalkten Präparat). Absolute Zahlen zum Durchmesser, zur Dichte und Häufigkeit der Dentinkanälchen müssen kritisch betrachtet werden, da individuell sehr große Unterschiede festzustellen sind und sehr stark von den angewendeten Untersuchungsparametern abhängen.

Die Odontoblastenfortsätze sind in den Kanälchen häufig von organischen Strukturelementen umgeben. Nervenfasern lassen sich nur in vereinzelt Tubuli des Prädentins (an der Grenze zur Pulpa liegendes nicht vollständig ausgereiftes, hypomineralisiertes Dentin) nachweisen. Im peripheren Dentin gibt es keine Nervenendigungen.

Dem Prädentin folgen nach außen eine Zone der Mineralisation (Zwischendentin), das zirkumpulpale Dentin und das weniger stark mineralisierte Manteldentin, welches mit dem Zahnschmelz eine arkadenförmige Grenzlinie bildet und sehr stark von Seitenästen der Dentinkanälchen durchzogen ist. Die Dentinkanälchen werden von peritubulärem Dentin umgeben, welches die Kanalwände auskleidet, homogen, dicht und am stärksten von allen Dentinstrukturen mineralisiert ist. Im Alter kann es durch Apposition zunehmen (sklerotisches Dentin). Die Einengung der Dentinkanälchen ermöglicht der Pulpa, sich vor äußeren Reizen zu schützen. Das weniger dicht mineralisierte intertubuläre Dentin trennt die Dentinkanälchen voneinander.

Ein wichtiges Strukturmerkmal des Dentins sind die Ebner-Linien (Wachstumslinien, Konturlinien). Es handelt sich hierbei um hypomineralisierte Bereiche, die die Ruhephasen der Odontoblasten widerspiegeln. Sie verlaufen parallel zur Schmelz-Dentin-Grenze bzw. zur Dentin-Pulpa-Grenze im zirkumpulpalen Dentin.

Im Zahnschliff befinden sich im Manteldentin der Zahnwurzel körnerartige Strukturen, die der Zahnoberfläche folgen und nicht an den Wachstumslinien orientiert sind (Tomes-Körner-

Einleitung

Schicht). Sie ähneln dem Interglobulardentin (zwischen der kugelförmigen verkalkten Dentinegrundsubstanz gelegenes, unregelmäßig begrenztes und weniger mineralisiertes Dentin) und sind ebenfalls hypomineralisiert.

1.2.3 Zement

Das Zement ist ein knochenähnliches Gewebe, das die Wurzeloberfläche der Zähne und Teilbereiche der apikalen Wurzelkanalwände bedeckt. Selten findet man Zementinseln und -zungen auch auf der Schmelzoberfläche (meistens im zervikalen Bereich). Die Schmelz-Zement-Grenze ist nicht immer einheitlich. In 30 % der Fälle stoßen Schmelz und Zement direkt aneinander, zu 10 % liegt ein kurzer Bereich des Dentins frei. Bei 60 % der Zähne ist das Zement dem zervikalen Schmelz überlappend aufgelagert. Im Zement, das zeitlebens von den Zementoblasten gebildet wird, inserieren die kollagenen Faserbündel des Zahnhalteapparates, zu dem das Zement auch zugeordnet wird.

In seiner Härte (30 – 50 KHN) und Struktur ähnelt das Zement dem menschlichen Knochen, ist jedoch im Gegensatz zum Knochen jedoch nicht vaskularisiert. Das Zement ist in seiner Zusammensetzung und Dicke weniger konstant als Schmelz und Dentin und ist die am wenigsten mineralisierte Zahnhartsubstanz. Der Mineralgehalt beträgt ungefähr 65 Gew.%, die organische Komponente beträgt 23 Gew.% und der Rest ist mit 12 Gew.% Wasser. Kalzium und Phosphat in Form von Apatitkristallen oder amorphen Kalziumphosphaten (vornehmlich bei neu gebildetem Zement) bilden den anorganischen Anteil. Der organische Bestandteil besteht zu über 90 % aus Kollagenen.

Die Dentinoberfläche ist mit einer Schicht stark mineralisierten Zements bedeckt, die nach außen lamellenförmig stärker und weniger stark mineralisierte Zonen, welche Ausdruck periodischer Zementbildungsphasen und Ruhephasen sind, folgen. Bei der Zementschicht im koronalen Drittel der Zähne handelt es sich um azelluläres, fibrilläres Zement. Dieses enthält keine Zellen, dafür aber zahlreiche kollagene Fibrillen, die homogen mineralisiert sind und nahezu senkrecht zur Dentinoberfläche verlaufen. Sie sind Teil der inserierenden parodontalen Fasern. Senkrecht zu den einstrahlenden parodontalen Fasern liegen die zementeigenen Fasern, welche die Insertion unterstützen. Die Ausprägung der Wachstumslamellen ist weniger stark, da die Zementbildung und -neubildung sehr langsam erfolgt. Das azelluläre Faserzement ist an der Oberfläche stärker mineralisiert als die mittleren Zementschichten. Ihr liegt das Zementoid, eine 3 – 8 µm dicke unstrukturierte Zone auf, in

Einleitung

dem sich Zementoblasten befinden können.

Auch im apikalen Bereich, sowie im Bereich der Bi- und Trifurkation mehrwurzeliger Zähne, wird das Zement von senkrecht zur Zahnoberfläche einstrahlenden Fasern und dickeren Faserbündeln durchzogen. Diese sind jedoch weniger mineralisiert. Senkrecht dazu finden sich auch hier wieder zahlreiche Fasern und Faserbündel, die parallel zur Wurzeloberfläche liegen. In Lakunen liegen Zementozyten, deren Fortsätze durch Zementkanälchen in alle Richtungen ausstrahlen, daher stammt auch die Bezeichnung als zellulär-fibrilläres Zement. Hier können sich schwach und stark mineralisierte Zonen abwechseln. Auch Schichten azellulär-fibrillären Zements können vorkommen. Peripher findet sich wieder Zementoid mit Zementoblasten (Hellwig et al. 2009).

1.2.4 Pulpa

In der Zahnpulpa befindet sich gallertiges, mesenchymähnliches Bindegewebe, in dem Blutgefäße und sensible Nerven verlaufen. Die Nerven können sogar bis in die Dentinkanälchen vordringen. An der Grenze zum Dentin liegen die Odontoblasten, die einen epithelähnlichen Verband bilden und zeitlebens Dentin bilden können (Welsch 2003).

Die nutritive Funktion der Pulpa wird durch das Gefäßsystem und seine Innervation gewährleistet. So bilden Äste der Arteriolen an der Peripherie der Wurzel- und Kronenpulpa einen dichten Kapillarplexus, über den Odontoblasten und andere Pulpazellen ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden können. Unabhängig von diesem Plexus finden sich in der Wurzel- und Kronenpulpa zahlreiche arterio-venöse Anastomosen, die eine wichtige Rolle bei der Regulation des pulpalen Blutflusses spielen, da durch sie systemisch bedingte Blutdruckschwankungen, die die Pulpa schädigen könnten, ausgeglichen werden können.

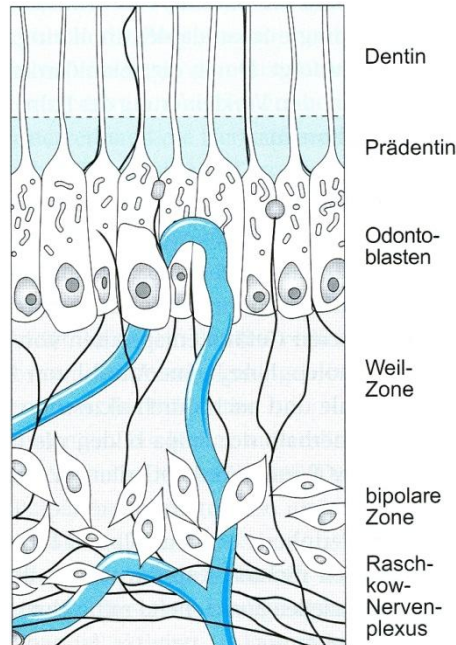
Die sensorische Funktion wird durch die afferenten Nerven der Pulpa bewerkstelligt. Die Nervenfasern treten zusammen mit den Blutgefäßen in Bündeln durch das Foramen apicale in die Pulpakammer ein bzw. aus. In der Wurzelpulpa gibt es wenige Verzweigungen, dafür kommt es aber in der Kronenpulpa zu ausgedehnten Verzweigungen. Erreichen die Nervenfasern die periphere Randzone, verlieren sie ihre Myelinscheide.

Unterhalb der bipolaren Zone bildet sich aus einer großen Anzahl hauptsächlich nicht myelinisierter Nervenaxone der Raschkow-Plexus.

Einleitung

Oberhalb der zellreichen bipolaren Zone, zur Pulpaperipherie hin, schließt sich die kernarme Weil-Zone an.

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Pulpazonen



(aus Hellwig et al., 2009, S. 313)

Die defensive Funktion der Pulpa besteht aus den zellulären und humoralen Abwehrleistungen, wobei die wichtigste Abwehrleistung die Bildung von Reizdentin durch die Odontoblasten ist (Hellwig et al. 2009).

1.3 Der Zahnhalteapparat (Parodontium)

Zum Zahnhalteapparat gehören folgende Strukturen:

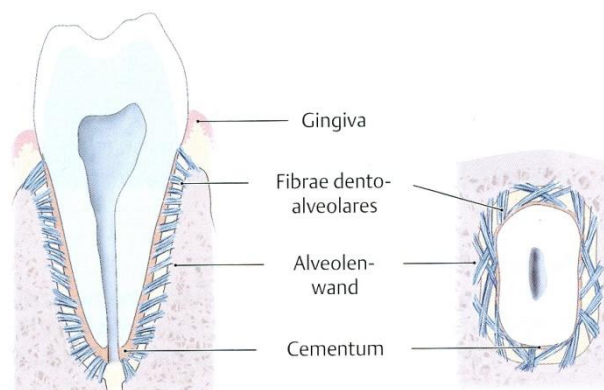
- Zement
- Parodontales Ligament
- Alveolarknochen
- Gingiva (soweit sie in Kontakt mit den anderen Strukturen steht).

Einleitung

1.3.1 Parodontales Ligament

Das parodontale Ligament (PDL) füllt den Periodontalspalt und besteht aus den Sharpeyschen-Fasern (kollagenen Faserbündeln) und lockerem Bindegewebe mit Fibroblasten und kleinen Blutgefäßen (Welsch 2003). Ca. 80 % der im PDL vorkommenden kollagenen Fasern sind vom Kollagen Typ I, 20 % der Fasern bestehen aus Kollagen Typ III (Butler et al. 1975). Durch die dicht gelagerten, gewellten Sharpeyschen-Fasern, zwischen denen einige elastische Fasern verlaufen, ist der Zahn nicht starr in der Alveole verankert, sondern federnd aufgehängt. Sie verlaufen überwiegend schräg abwärts in Richtung der Wurzelspitze und strahlen in den Alveolarknochen und das Zement ein. Beim Kauen unterliegen die Fasern überwiegend einer Zugbeanspruchung, welche je nach Kaudruck variiert. Um diesen zu regulieren, stehen die Fasern in Kontakt zu sensiblen Nervenendigungen (Welsch 2003). So beträgt die Dichte der Faserbündel funktionsloser Zähne nur ca. 10 % der Faserbündeldichte belasteter Zähne. Da sie in gewellter Form vorliegen, wird einerseits angenommen, dass Sharpey-Fasern keine Dehnbarkeit besitzen, so dass es zur Streckung der Faserbündel bei Belastungen der Zähne kommt. Andererseits besteht die Vorstellung, dass das gefäßreiche PDL eine Pufferfunktion wie ein flüssigkeitsgefüllter Raum besitzt. Eine Belastung der Zähne führt dann zu einer Verschiebung des nur wenig komprimierbaren Flüssigkeitspolsters in Knochenmarksräume bzw. zu einer Aufdehnung des koronalen Anteils des Periodontalspalts (Hellwig et al. 2009). So weist jeder Zahn eine physiologische Beweglichkeit auf. Sie beträgt bei einer Belastung von 2 – 5 N in horizontaler Richtung, je nach Zahngruppe, etwa 50 bis 100 µm (Lehmann et al. 2005). Es werden interradiikuläre Faserbündel, krestale Faserbündel, horizontale Faserbündel, schräge Faserbündel und apikale Faserbündel unterschieden.

Abbildung 5: Parodontium



(aus Schünke et al., 2006, S. 37)

Einleitung

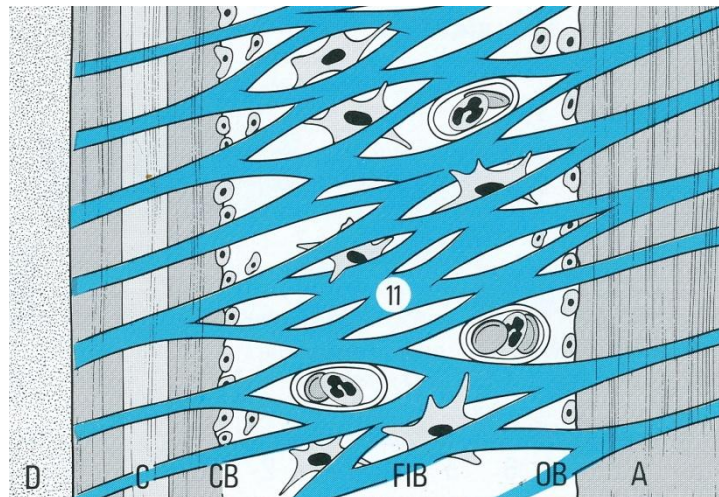
Die große Vielfalt der Kollagentypen und die Anordnung sowie die Vernetzung der Kollagenfibrillen bilden eine wesentliche Grundlage für die mechanische Stabilität des Gewebes. Neben fibrillenbildenden Kollagenen, wie z.B. Kollagen Typ I, II und III, gibt es nicht-fibrilläre Kollagene, wie z.B. Kollagen Typ IV, welches durch die Bildung eines dreidimensionalen Netzwerkes eine der wichtigsten Komponenten von Basalmembranen darstellt (Leitinger und Hohenester 2007; van der Rest und Garrone 1991).

Mehrheitlich besteht die Zellpopulation des PDLs aus Fibroblasten, die für die im Vergleich zu anderen Geweben hohe Umsatzrate von Kollagen verantwortlich sind (Hellwig et al. 2009). So ist die Umsatzrate des PDL ca. zweimal höher als die der Gingiva und viermal höher als die der Dermis. Sie wird durch die kaufunktionelle Belastung des Zahnes stimuliert, nimmt im Alter jedoch ab. Beim „Umbau“ wird der parodontale Faserapparat an geänderte Positionen oder geänderte funktionelle Belastungen angepasst (Müller 2006). Beim PDL handelt es sich somit um kein statisches System. Die Fibroblasten sind zum einen also maßgeblich an der Synthese von extrazellulärer Matrix, besonders Kollagen Typ I, beteiligt, zum anderen sind sie für den enzymatischen Abbau des Kollagens mit verantwortlich (Melcher und Chan 1981).

Außerdem finden sich im PDL Osteoblasten, Osteoklasten, Zementoblasten, Malassez-Epithelzellen (stammen aus den Resten der Hertwig-Epithelscheide (Becktor et al. 2007)) und Leukozyten (Hellwig et al. 2009).

Einleitung

Abbildung 6: Die untereinander verflochtenen kollagenen Faserbündel



D: Dentin

C: Zement

CB: Zementoblasten

FB: Fibroblasten (sternförmig)

Außerdem dazwischen Blutgefäße

OB: Osteoblast

A: Alveolarknochen

(aus Rateitschak et al., 1984, S.7)

Das PDL wird durch ein dichtes, anastomisierendes Blutgefäßnetz versorgt. Apikal und interradikulär befinden sich Direktverbindungen zwischen Arteriolen und Venolen, die sogenannten Wedl-Gefäßknäuel, die ein Stauchungsreservoir des PDLs bei Belastung darstellen (Hellwig et al. 2009). Neben dem Auffangen von Kaukräften hat das PDL auch eine Ernährungsfunktion für das Wurzelzement, das über Diffusion vom PDL versorgt wird (Lehmann et al. 2005).

1.3.2 Alveolarknochen

Der Alveolarknochen, in den die Fasern inserieren, ist aus Lamellenknochen mit Havers-Systemen aufgebaut. Bei unphysiologischer Belastung oder Zahnausfall kann sich der Alveolarknochen schnell zurückbilden.

Einleitung

1.3.3 Gingiva

Die Gingiva bedeckt den Alveolarknochen und umfasst die Zahnhäule (Gingivalsaum). Es lassen sich zwei verschiedene Hauptstrukturen unterscheiden. Das orale Epithel und das orale Sulkusepithel mit dem Saumepithel.

Das orale Epithel ist ein besonders fester Teil der Mundschleimhaut. Es ist fest mit dem Periost verwachsen. Das mehrschichtige Plattenepithel ist unvollständig verhornt (Welsch 2003) und besteht aus vier Schichten:

- Stratum basale
- Stratum spinosum
- Stratum granulosum
- Stratum corneum

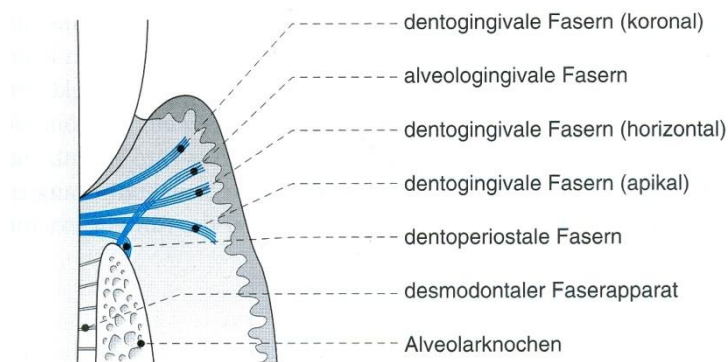
(Hellwig et al. 2009), wobei das Stratum granulosum sehr dünn ist.

Im Epithel lassen sich Langerhans-, Merkelzellen und Melanozyten finden. Die Gingiva unmittelbar am Zahn ist lockerer als die Schleimhaut, die am Knochen befestigt ist. Das den Sulcus gingivalis ringförmig umgebende mehrschichtige Plattenepithel wird als Saumepithel bezeichnet. Es ist relativ dünn und unverhornt. Seine Basalmembran folgt dem Epithel in die Tiefe, wo sie umschlägt und sich dann eine basalmembranartige extrazelluläre Matrix zwischen Epithel und Schmelzoberfläche befindet. Die Basallamina wird somit zur wichtigsten Befestigungsstruktur zwischen Gingivaepithel und Kronenbasis und verhindert das Eindringen von Bakterien in die tiefer gelegenen Gewebe (Welsch 2003). Innerhalb des Saumepithels befinden sich aus dem Bindegewebe eingewanderte neutrophile Granulozyten und Makrophagen sowie Lymphozyten. Sie stellen neben den teilweise phagozytosefähigen Zellen des Saumepithels die zelluläre Abwehr des Saumepithels dar.

Das gingivale Bindegewebe besteht hauptsächlich aus Kollagenfasern, Fibroblasten, Proteoglykanen und Blutgefäßen. Der ausgeprägte Faserapparat des Bindegewebes verleiht der Gingiva ihre feste Konsistenz. Er gruppiert sich zu Faserbündeln, die mehrheitlich aus kollagenen Fasern bestehen. Seltener sind Oxytalanfasern und elastische Fasern werden meist perivaskulär gefunden. Die Faserbündel werden entsprechend ihrer Verlaufsrichtung unterschieden in: Dentogingivale Fasern, dentoperiostale Fasern, zirkuläre Fasern, semizirkuläre Fasern, transseptale Fasern, transgingivale Fasern, intergingivale Fasern, alveologingivale Fasern und interpapilläre Fasern (Hellwig et al. 2009).

Einleitung

Abbildung 7: Verlauf der gingivalen Faserbündel im vertikalen Schnitt



(aus Hellwig et al., 2009, S 441)

Die in dem Binde- und Stützgewebe unter der Basalmembran vorkommenden Kollagenfasern sind vom Typ I und III (Everts et al. 1998). Sie setzen in der Basalmembran an, wodurch die makroskopisch erkennbare Oberflächenstippelung der Gingiva erklärt werden kann.

Abbildung 8: Gesunde Gingiva (blaßrosa und gestipelt)



(aus Rateitschak et al., 1984, S.37)

Zu 65 % besteht die Zellpopulation des Bindegewebes aus Fibroblasten, die unter anderem für die Kollagensynthese verantwortlich sind. Außerdem finden sich dort polymorphkernige Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Zahlreiche Makrophagen befinden sich in einer Zone, die direkt dem Saumepithel angelagert ist. Dort befindet sich auch der gingivale Plexus, der bei entzündlichen Reaktionen äußerst permeabel wird und somit eine wichtige Rolle bei

Einleitung

der Abwehr äußerer Noxen spielt (Hellwig et al. 2009).

In der gesunden Mundhöhle ist der Sulcus gingivales mit Flüssigkeit gefüllt. In dieser Sulkusflüssigkeit befinden sich unter anderem die Bakterien der physiologischen Mundflora. So finden sich im gesunden Parodontium zu ca. 75 % Kokken und zu 16 – 17 % gerade, unbewegliche stäbchenförmige Bakterien. Nur geringe Anteile der Bakterienflora bestehen aus fusiformen Stäbchen und beweglichen stäbchen- bzw. fadenförmigen Mikroorganismen (Spirochäten). Bei entzündlichen Erkrankungen des Parodontiums vermehren sich die Spirochäten und die beweglichen Stäbchen sehr stark, bei entsprechender Abnahme der Kokken (Lehmann et al. 2005).

Einleitung

2. Parodontitis

2.1 Definitionen und Klassifikationen der Parodontalerkrankungen

Die „International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions“ hat sich 1999 auf eine neue Einteilung der vielfältigen Formen von Parodontalerkrankungen weltweit verständigt. Dies geschah auch, um die in den letzten Jahren neu erforschten Krankheitsbilder zu klassifizieren und Parodontalerkrankungen nicht, wie bei der alten Klassifikation von 1988 von der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie, ausschließlich nach dem Lebensalter des Auftretens und der Progressionsrate unterteilen zu können. Nach der aktuellen Einteilung der parodontalen Erkrankungen werden acht verschiedene Hauptgruppen unterschieden (Hellwig et al. 2009):

1. Gingivale Erkrankungen
2. Chronische Parodontitis
3. Aggressive Parodontitis
4. Parodontitis als Manifestation von Systemerkrankungen
5. Nekrotisierende Parodontalerkrankungen
6. Parodontalabszesse
7. Parodontitis im Zusammenhang mit endodontalen Läsionen
8. Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformationen.

2.2 Chronische Parodontitis

Bei der Parodontitis handelt es sich definitionsgemäß um eine bakterielle, entzündliche Erkrankung des Parodontiums (Preshaw et al. 2004). Bei der chronischen Parodontitis sind alle Anteile des marginalen Parodonts betroffen, das heißt Erkrankungen der Gingiva, des Desmodonts, des Wurzelzements und des Alveolarknochens mit fortschreitendem Stützgewebeverlust.

Die Kardinalsymptome der chronischen Parodontitis (früher: langsam fortschreitende Erwachsenenparodontitis) sind die Taschenbildung und/oder Rezessionen. Die chronische Parodontitis tritt meist ab dem 30. bis 35. Lebensjahr auf. Sie kann sich aber auch bei Kindern und Jugendlichen entwickeln. Durch die unzureichende Mundhygiene der Patienten finden sich große Mengen an Plaque und supra- bzw. subgingivalem Zahnstein, so dass in der Regel

Einleitung

eine Gingivitis vorliegt (Hellwig et al. 2009). Die Ausbildung der Plaque, einem strukturierten Biofilm, gilt als wichtigster Entstehungsfaktor. So haften sich zunächst gram-positive, aerobe Mikroorganismen aus dem Speichel an die Pellicleschicht (Duan et al. 1994). Diese, aus Speichelglykoproteinen bestehende, Schicht bildet sich trotz gründlicher Reinigung innerhalb weniger Stunden auf allen Glattflächen. Die Pionierkeime produzieren extrazelluläre Polysaccharide (Fruktane, Glukane), an die sich die Bakterien anlagern können. Dies ist die erste Phase der Plaquebildung (der Erstbesiedlung des Zahnes), welche es nun den gram-negativen Kokken sowie auch gram-positiven und negativen Stäbchen ermöglicht, die Zahnoberfläche zu besiedeln (Whittaker et al. 1996).

Neben der Gingivitis zeigen sich Knochenabbau, Abszesse, Zahnwanderungen und -kippungen sowie Zahnfleischtaschen mit Attachmentverlust. Erhöhte Zahnbeweglichkeiten sind im Verlauf als Spätsymptom zu beobachten. Die Krankheit verläuft in Schüben, so dass sich Phasen der erhöhten parodontalen Destruktion mit Phasen der Stagnation abwechseln. Es zeigt sich eine langsame bis mäßige Progression, wobei die Erkrankung als Erkrankung des einzelnen Parodonts zu verstehen ist, so dass sich akute, aktive Taschen (Zahnfleischtaschen mit typischen Entzündungszeichen) neben ruhenden, inaktiven Taschen befinden können.

In der subgingivalen Plaque der nicht aktiven Taschen findet sich im Vergleich zu einem gesunden Parodont vermehrt gramnegative anaerobe Mikroorganismen und Spirochäten (Hellwig et al. 2009). Für die Kolonisierung vieler Bakterien bietet die subgingivale Region sehr günstige und völlig andere Bedingungen als die supragingivalen Bereiche. So sind die Bakterien gegen Mundhygienemaßnahmen und Spülwirkung des Speichels geschützt, was selektive Kolonisierung von Bakterien zu Folge hat, die nicht direkt auf Oberflächen haften. Außerdem sind obligat anaerobe Bakterien in tiefen parodontalen Taschen bevorzugt, da dort ein geringer Sauerstoffpartialdruck von durchschnittlich etwa 1,7 kPa und ein niedriges Redoxpotenzial von -80 bis -100 mV herrscht (Müller 2006). Bei den aktiven Taschen kann die Zusammensetzung der subgingivalen Plaque der Zusammensetzung der aggressiven Parodontitiden ähneln. So finden sich dort *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Tannerella forsythia*. Diese Hauptverursacher von Parodontalerkrankungen werden von Mensch zu Mensch übertragen. Vor allem *Porphyromonas gingivalis* wird für die schweren Destruktionen verantwortlich gemacht, da es die Funktion der neutrophilen Granulozyten behindert.

Es ist möglich, dass unterschiedliche Infektionsarten auftreten. So lassen sich drei Arten unterscheiden: Die endogene Infektion, die opportunistische Infektion und die exogene

Einleitung

Infektion.

Bei der endogenen Infektion kommt es zur Infektion mit Bakterien, die zur normalen Flora der Haut, Nase, Mundhöhle sowie des Intestinal- und Urogenitaltrakts gehören. So kann es bei schlechter Mundhygiene, Änderungen im Ökosystem oder bei drastischen Änderungen in der lokalen oder systemischen Abwehr zur überproportionalen Vermehrung dieser potenziell pathogenen Bakterien, die in jeder Mundhöhle vorkommen, kommen.

Die opportunistische Infektion tritt in einem systemisch oder lokal geschwächten Organismus auf, wobei opportunistische Pathogene meist nicht besonders virulent sind.

Bei der exogenen Infektion handelt es sich um eine Infektion mit Mikroorganismen, die im Allgemeinen nicht in der Mundhöhle vorkommen. So kommen unter den Parodontal-Pathogenen am ehesten *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* als exogene Pathogene infrage. Virulente Varianten werden bei gesunden Parodontalverhältnissen nicht angetroffen. Sie werden z.B. durch parodontal erkrankte Eltern im Wechselgebiss übertragen. Relativ häufig ist ein Carrierstatus, dabei erkranken die Träger der Bakterien zunächst nicht. Darüber hinaus sind exogene Infektionen mit Enterobakterien, Pseudomonaden und Staphylokokken möglich, welche im Sinne einer Superinfektion (exogen oder endogen) eine bestehende Parodontitis negativ beeinflussen.

Als ursächliche Pathogene für die meisten Formen der Parodontitis werden *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Tannerella forsythia* angesehen, wobei Bakterien nicht alleine in der Lage sind eine destruktive Parodontitis auszulösen. Dies hängt von verschiedenen Faktoren, wie z.B. anfälliger Wirt, Anwesenheit der Pathogene, Abwesenheit nützlicher Mikroorganismen und Ökologie der Tasche, ab (Müller 2006).

Nicht immer spricht eine chronische Parodontitis auf die eingeleiteten Therapiemaßnahmen an und erweist sich zum Teil als therapieresistent.

Die klinischen Symptome können an einzelnen oder allen Zähnen eines Gebisses vorliegen, so dass man, wenn weniger als 30 % der Flächen betroffen sind, von einer lokalisierten chronischen Parodontitis spricht. Sind über 30 % der Flächen befallen, handelt es sich um die generalisierte Form der Parodontitis. Die Schwere der Erkrankung kann in drei Schweregrade unterteilt werden und für einzelne Flächen, einzelne Zähne oder die gesamte Dentition angegeben werden. Bei einem Attachmentverlust von 1 bis 2 mm handelt es sich um eine leichte, bei einem Attachmentverlust von 3 bis 4 mm um eine mäßige und bei einem Attachmentverlust von über 5 mm um eine schwere Erkrankung (Hellwig et al. 2009).

Einleitung

2.3 Abwehrmechanismen des Parodonts

Ob sich eine destruktive entzündliche Parodontalerkrankung entwickelt, hängt davon ab, ob es dem Organismus zusammen mit neutrophilen Leukozyten, Antikörpern und Komplement gelingt, eine Exposition des Bindegewebes mit Bakterien der Plaque, ihrer Stoffwechselprodukte und Lipopolysacchariden zu verhindern.

Kann dieses verhindert werden, kommt es nur zu leichten Formen der Erkrankung ohne Zahnverlust. Die destruktiven Prozesse sind meist Folge einer exzessiven Aktivierung der Makrophagen und Lymphozyten.

Anscheinend reagieren einige Menschen sofort mit der Aktivierung von Makrophagen und Lymphozyten auf dentogingivale Plaque, zum einen durch überschießende Freisetzung von Prostaglandin E₂ und Interleukin-1 β beeinflusst, zum anderen durch einen hyperaktiven Makrophagen-Phänotyp beeinflusst, der vermutlich überwiegend genetisch determiniert ist, aber eventuell auch durch Rauchen, Stress, Ernährung und wahrscheinlich Osteoporose (Müller 2006; James et al. 1999).

Bei einer akuten Entzündung werden die im Blut zirkulierenden Leukozyten chemotaktisch in die betroffene Region beordert und es kommt durch die initiale Haftung der Leukozyten zu einer Zunahme der Permeabilität der Gefäße, so dass die Leukozyten zwischen zwei Endothelzellen aus der Blutbahn ins Gewebe einwandern können. Dies wird durch die Noxen der Plaque und durch invasierende Mikroorganismen ausgelöst (Rateitschak und Wolf 1984). Bei den Noxen handelt es sich um Metabolite wie Butyrat, Propionat, chemotaktische Peptide wie N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin und Lipopolysaccharid (Müller 2006). Diese Noxen veranlassen, dass die Saamepithelzellen Entzündungsmediatoren wie Interleukin-8 (IL-8), Tumor Nekrose-Faktor- α (TNF α), Interleukin-1 (IL-1), Prostaglandin E₂ (PGE₂) und Matrixmetalloproteinasen (MMP) sezernieren, die zur Proliferation bzw. Differenzierung von Entzündungszellen führen. Ausschlaggebender Regulator der Entzündungsdifferenzierung und der Immunantwort ist dabei der nukleäre Transkriptionsfaktor NF- κ B. Die Infektion wird an die Leukozyten durch eine verstärkte Sekretion von Interleukinen (IL-1 β und IL-6) aus dem Saamepithel gesteuert (Schuerer-Maly 1994; Müller 2006). Die Migration der Granulozyten folgt dabei dem Gradienten chemotaktischer Faktoren, wie bakteriellen Peptiden (N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin), Chemokinen (IL-8) (von den Zellen des Saamepithels abgegeben), von anderen Granulozyten freigesetzten Molekülen wie Leukotrien B₄ sowie der Komplementkomponente C5a. Dabei kommt es zu einer Auflockerung des Sulkusbodens und zur lateralen Proliferation der basalen Zellen. Von den aktivierten

Einleitung

Makrophagen werden die proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, IL-10, TNF α , Chemokine wie IL-8 und monocyte chemo-attractant protein 1 sowie PGE₂ und Gewebekollagenase produziert. Somit ist die Rekrutierung von T-Lymphozyten und weiteren Monozyten aus dem Venolenplexus gewährleistet. Die neutrophilen Granulozyten phagozytieren, unterstützt durch Komplement und Antikörper (Opsine), die Bakterien und ihre Produkte.

Bei der etablierten Läsion ist die laterale Proliferation des Saumepithels ausgeprägt und durch einen intraepithelialen Riss bildet sich eine gingivale Tasche mit nachfolgender bakterieller Proliferation in den subgingivalen Bereich. Spezifische Populationen mononukleärer Zellen dominieren nun im Infiltrat und zu den T-Lymphozyten gesellen sich vermehrt B-Lymphozyten und Plasmazellen, die Gammaglobuline sezernieren (Müller 2006, adaptiert nach Page & Schroeder 1990).

Nach unbestimmter Zeit lässt die ständige Herausforderung des Wirtsorganismus durch subgingival kolonisierende Bakterien die spezifischen und unspezifischen Abwehrmechanismen zusammenbrechen. Überschreitet die Progression die Schmelz-Zement-Grenze wird das Stadium der Parodontitis erreicht. So sind nun alle Strukturen des Parodonts betroffen. Im Bereich der parodontalen Tasche wird das pathologisch veränderte Wurzelzement über Resorptionslakunen von Bakterien penetriert. Mit zunehmender Entzündung erlahmt die Migration der Neutrophilen Granulozyten.

Mangelt es an alpha-2-Macroglobulin und α 1-Proteinaseinhibitor, kann es zu exzessiver parodontaler Destruktion kommen.

Es findet eine Immunregulation durch T-Lymphozyten statt, die sich aufgrund ihrer Oberflächenantigene differenzieren lassen, so binden T-Helferzellen (CD4+) an Antigene des MHC-II-Komplexes und erkennen Epitope, die von entsprechenden Zellen präsentiert werden.

Th1-Zellen übernehmen die Regulation der zellvermittelten Immunantwort über Zytokine (IL-2, Interferon-gamma (IFN- γ)), die die Phagozytose neutrophiler Granulozyten verstärken und Makrophagen aktivieren. Außerdem stimulieren sie die Produktion proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1). Diese binden an Oberflächenrezeptoren von Fibroblasten und veranlassen diese Zellen zur Produktion von MMPs und PGE₂ (Müller 2006).

Die MMPs sind eine wichtige Gruppe von proteolytischen Enzymen, die sich anhand ihrer DNS-Sequenz und ihres Domänenaufbaus klassifizieren lassen. So lassen sich Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine und MT-MMP (Membrane-type-MMP) als wichtigste Vertreter unterscheiden. Die Hauptsubstrate der Kollagenasen sind Kollagene der Typen I, II

Einleitung

und III. Für die Gruppe der Gelatinasen sind die Hauptsubstrate denaturiertes Kollagen, die Kollagene der Typen I, II, III und IV, Fibronectin, Gelatin und Laminin (Visse und Nagase 2003; Aimes und Quigley 1995; Reynolds und Meikle 1997; Birkedal-Hansen et al. 1993). Kollagen Typ IV wird dabei hauptsächlich von MMP-2 und MMP-9 abgebaut. Obwohl sie zur Gruppe der Gelatinasen gehören, werden sie auch Typ-IV-Kollagenase genannt (Birkedal-Hansen et al. 1993).

PGE₂ aktiviert Osteoklasten und leitet damit die Knochenresorption ein. TNF- α und IL-1 sind ebenfalls direkt an der Knochendestruktion beteiligt.

Die Th2-Zellen regen durch zellspezifische Interleukine (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) die B-Zellen zur Differenzierung zu Plasmazellen an, was wiederum zu einer erhöhten Bereitstellung von spezifischen Antikörpern führt. Außerdem werden durch sie Mastzellen und eosinophile Granulozyten stimuliert. T-Helferzellen mit Th2-Zytokinprofil sind charakteristisch für progressive Läsionen (Müller 2006).

Einleitung

3. Aufgabenstellung

Mit dieser Arbeit sollen die Ergebnisse der Microarray-Analysen ausgewertet und mithilfe der real-time (RT)-PCR verifiziert werden. Dabei lag der Schwerpunkt in der Erforschung der Genexpressionsunterschiede bei PDL-Proben von Probanden mit gesunden parodontalen Verhältnissen und PDL-Proben von Probanden mit chronischer Parodontitis. Die, in dieser Dissertation untersuchten, Gene wurden ausgewählt, da sie die am deutlichsten regulierten Gene des Microarrays waren, bei denen der P-Wert nicht über 0,05 lag. Im Gegensatz zu den von unserer Forschungsgruppe angefertigten Arbeiten zu diesem Thema (vom Orde 2008; vom Orde 2011; Szydlik 2009) wurden in der vorliegenden Arbeit, die am stärksten regulierten Gene zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Desweiteren wurden bei dieser Dissertation zunächst einzelne Microarrays eingesetzt und die Ergebnisse einzeln erhoben und dann statistisch ausgewertet. Die vorherigen Untersuchungen zeigten Daten von gepoolten Proben, bei denen weniger eindeutige Ergebnisse anzunehmen sind.

Die zentrale Fragestellung dieser Dissertation ist:

1. Welche Veränderungen der Genexpression lassen sich bei Kollagen Typ I alpha 1 und Typ IV alpha 1, α -2-Macroglobulin, CD27, Hitzeschockprotein 90 kDa alpha class A member 1, Interleukin-28-Rezeptor alpha und Phosphat regulierender Endopeptidase bei der chronischen Parodontitis im Vergleich zum gesunden Parodont feststellen?
2. Inwieweit gibt es Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Microarray-Untersuchungen und denen der real-time (RT)-PCR?

Material und Methoden

4. Material und Methoden

4.1 Probenmaterial

Die Gewebeproben entstammen zehn Patienten, die sich in der Zahnklinik der Universitätsmedizin Göttingen behandeln ließen. Sie wurden von extrahierten Zähnen entnommen. Die Proben mit gesundem Parodont stammen zum einen von Zähnen, die aufgrund kieferorthopädischer Behandlung extrahiert wurden und zum anderen von bereits durchgebrochenen Weisheitszähnen. Das erkrankte Parodontalgewebe wurde von nicht mehr erhaltungswürdigen Zähnen, die aufgrund einer chronischen Parodontitis extrahiert werden mussten, gewonnen.

Die Proben wurden direkt nach der Extraktion in 50-ml-Röhrchen (Sarstedt, # 62,547,254) steril verpackt und unmittelbar nach der Extraktion schockgefroren. Danach wurde sie bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Bei der Präparation des Gewebes wurde das Gewebe vom mittleren Drittel der Wurzel gewonnen, da sich hier bei der Parodontitis noch PDL-Zellen vermuten und sich im apikalen Bereich der Wurzel die Zeichen einer Parodontitis nicht vollständig finden lassen, da das PDL hier zum Teil noch intakt ist.

Abbildung 9: Bereich des Zahnes, in dem PDL-Gewebe gewonnen wurde



Alle Patienten, deren Proben verwendet wurden, wurden über die Hintergründe dieser Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis, dass ihre Proben verwendet werden dürfen.

Material und Methoden

4.2 Isolation der mRNA aus dem PDL

Die steril weggefrorenen Proben wurden für zwölf Stunden separat in RNAlater™ (Quiagen, # 1018087) einem RNA-Stabilisations-Reagenz eingelegt. Dieses verhindert, dass das PDL während der Präparation von RNAsen zersetzt wird. Das Gewebe wurde im mittleren Drittel der Wurzeloberfläche mittels eines Skalpells (P.J. Dahlhausen & Co. GmbH, # 11000.00710), unter dem Mikroskop mit Handschuhen präpariert. Die so präparierte Probe wurde 1 ml peq GOLD TriFast (peqLab Biotechnologie GmbH, # 30-210) in ein 2-ml-Eppendorfcup gegeben. Dieses Gemisch wurde kräftig gevortext und danach mit dem Ultra-Turrax (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen) homogenisiert. Das homogene Gemisch wurde für 5 min bei 13600 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2-ml-Eppendorfcup, zusammen mit 200 µl Chloroform, überführt und geschüttelt. Danach wurde das Cup 2 min bei Raumtemperatur ruhig stehen gelassen. Nach den 2 min Ruhen folgten wieder 5 min Zentrifugieren. Der Überstand wurde in ein neues 2-ml-Eppendorfcup pipettiert, wobei nichts von der mittleren Phase mitgenommen werden durfte. Darauf wurde das gleiche Volumen Chloroform : Isoamylalkohol im Verhältnis von 24:1 (AppliChem, # A1935,0500) gegeben. Dieses Gemisch wurde geschüttelt und dann bei 2min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde dies 5 min bei 13600 UpM zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues 2-ml-Eppendorfcup mit 350 µl RLT-Puffer (Quiagen, # 79216) und 3,5 µl β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, # 63689) gegeben, gut gemischt und 350 µl abs. Ethanol dazugegeben. Diese 700 µl wurden auf eine RNAeasy Mini Säule (Quiagen, # 1011708) pipettiert, kurz zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Hierbei bindet die RNA an eine Silikatmembran und lässt sich dadurch sehr einfach reinigen. Darauf wurden zunächst 700 µl RW1-Puffer (Quiagen, # 1015763) pipettiert, dieses zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Als nächstes wurde diese Prozedur zweimal hintereinander mit 500 µl RPE-Puffer (Quiagen, # 1018013) durchgeführt. Danach wurden die Säulen in ein neues Sammelröhrchen gegeben und diese 1 min bei 13600 UpM trocken zentrifugiert. Die trockene Säule wurde in ein Biopur 1,5-ml-Eppendorfcup gesteckt und 50 µl RNase-freies H₂O wurden direkt auf die Membran pipettiert und für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurde 1 min bei 13600 UpM zentrifugiert. Der dabei entstandene Durchfluss enthält die mRNA. Die Konzentration der mRNA wurde mittels eines Nanodrop 1000 Spectrometers (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt.

Material und Methoden

4.3 Umschreiben der mRNA in cDNA

Die cDNA-Synthese erfolgte mithilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kit (Quiagen, # 205313).

Das Endvolumen von 200 μl sollte eine cDNA-Konzentration von 1ng/ μl enthalten, wofür die Menge an RNA berechnet wurde, die dafür eingesetzt werden sollte. Bei der Berechnung wurde davon ausgegangen, dass das reverse transkriptase Enzym einen Umsatz von mRNA zu cDNA von 1:1 erreicht.

Rechenbeispiel: mRNA-Konzentration: 53,84 ng

Für die Erstellung von 200 μl cDNA mit einer Konzentration von 1 ng/ μl

$$\text{————} = 3,740 \mu\text{l}$$

werden 3,740 μl mRNA benötigt

+ 8,260 μl RNase freies H₂O

+ 2 μl Wipeout Buffer

⇒ **14 μl**

+ 1 μl Reverse Transkriptase

+ 4 μl Puffer

+ 1 μl Primer Mix

⇒ **20 μl**

+ 180 μl RNase freies H₂O

⇒ **200 μl (1 ng/ μl)**

Als erstes wurde die mRNA bei 42°C für 2 min in einem genomic DNA Wipeout Buffer inkubiert, wodurch die darin enthaltenen DNasen die eventuell vorhandene genomische DNA eliminieren. Danach wurde die mRNA mit einem Primer Mix, einem Puffer und der Reversen Transkriptase für 15 min bei 42°C inkubiert. Dabei wurde die mRNA zu cDNA umgeschrieben. Anschließend daran wurde die Reverse Transkriptase für 2 min bei 95°C inaktiviert.

Material und Methoden

4.4 Quantitative real-time Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

4.4.1 Allgemeines zur Methode

Die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) dient der Amplifikation bestimmter Nukleotidmatrizen, wodurch deren Anzahl bestimmt werden kann. Somit ist die PCR eine molekularbiologische Methode zur quantitativen Analyse der Transkription und Expression bestimmter Gene, wobei schon geringste Mengen an Ausgangsmaterial zur Analyse ausreichen. Die PCR wird mittels einer hitzestabilen Taq-Polymerase und eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs (SYBR-Green) durchgeführt. Die Taq-Polymerase wurde als Enzym gewählt, da sie den 95°C-Schritt des Cyclers-Programms ohne zu denaturieren übersteht. Der verwendete SYBR Green Mix (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG, Invitrogen, # 11733-046) enthält neben der thermostabilen Taq-Polymerase und dem mit der DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green $MgCl_2$ und einen dNTP-Mix.

Es können bei der PCR drei Schritte unterschieden werden:

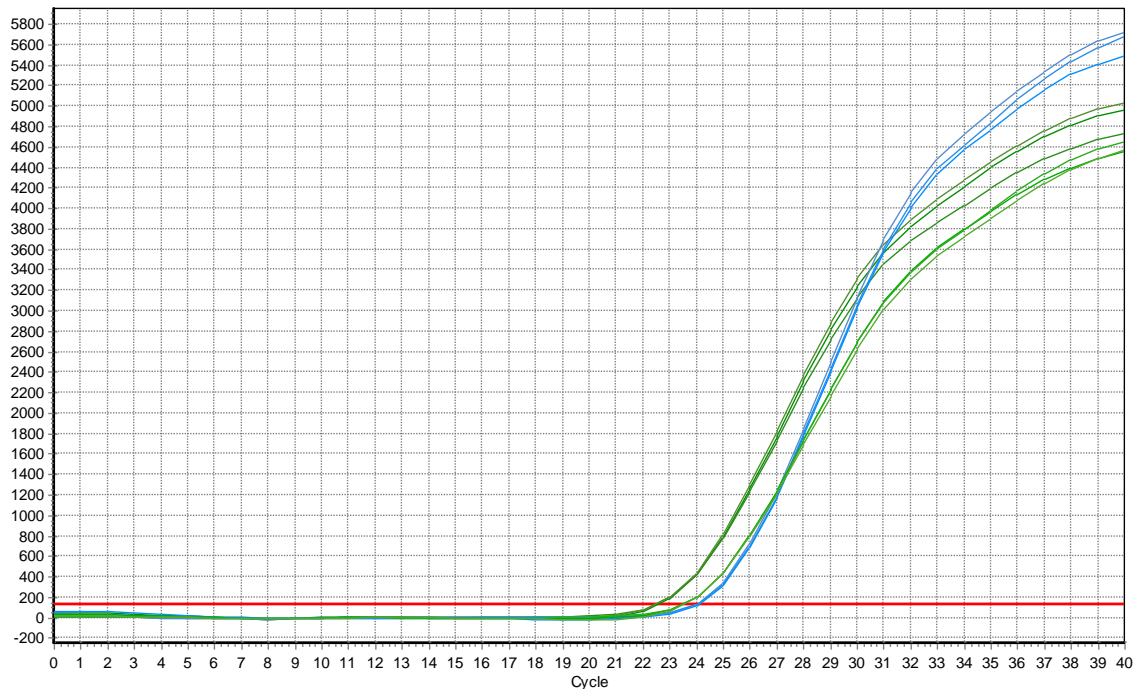
1. Bei 95°C wird die DNA in Einzelstränge denaturiert
2. Bei einer individuell von jedem Primer abhängigen Temperatur (siehe „Gradienten-PCR“) lagern sich die Primer an die DNA an (Annealing).
3. Bei 72°C erfolgt die Synthese der Komplementärstränge durch die Taq-Polymerase (Elongation) und den Einbau des SYBR-Green-Fluoreszenzfarbstoffes.

Diese drei Schritte wiederholen sich bis zu 45-mal, wobei sich die DNA bei jedem Zyklus theoretisch verdoppelt. Durch die Einlagerung des SYBR-Green-Farbstoffes in die DNA kann diese Amplifikation sichtbar gemacht werden. Während der PCR wird vom Programm ein Schwellenwert festgelegt. Der Zyklus bei dem dieser Schwellenwert überschritten wird, gibt den ct-Wert an (= threshold cycle). Mit Hilfe dieses ct-Wertes können Rückschlüsse auf die DNA-Menge des Zielgens gezogen werden, da die Fluoreszenz proportional zu der eingesetzten Anzahl der DNA-Moleküle ist. Das bedeutet, dass je höher die Menge an DNA-Molekülen in der Probe ist, desto früher wird der ct-Wert erreicht, bzw. je größer der ct-Wert ist, desto weniger der gesuchten DNA befindet sich in der Probe. Theoretisch wird bei diesem eben beschriebenen Ablauf der Amplifikation die DNA in jedem Zyklus der PCR verdoppelt, was einem exponentiellen Wachstum entsprechen würde. Jedoch findet dieses exponentielle Verdopplung nur in den ersten 35 bis 38 Zyklen der PCR statt, da während der späteren Zyklen entstanden Nebenprodukte die Reaktion behindern können und nicht mehr genug

Material und Methoden

Oligonukleotidprimer für jedes DNA-Molekül vorliegen können. Somit ist es nicht mehr möglich, dass jedes DNA-Molekül mit einem Primer hybridisiert und als Vorlage für die Komplementärstrangsynthese dienen kann, so dass bei einer PCR, die keine real-time PCR ist, nach 50 Zyklen kein Rückschluss aus der Menge des generierten PCR-Produktes auf die ursprünglich eingesetzte Menge gezogen werden könnte.

Abbildung 10: Darstellung der gemessenen Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl



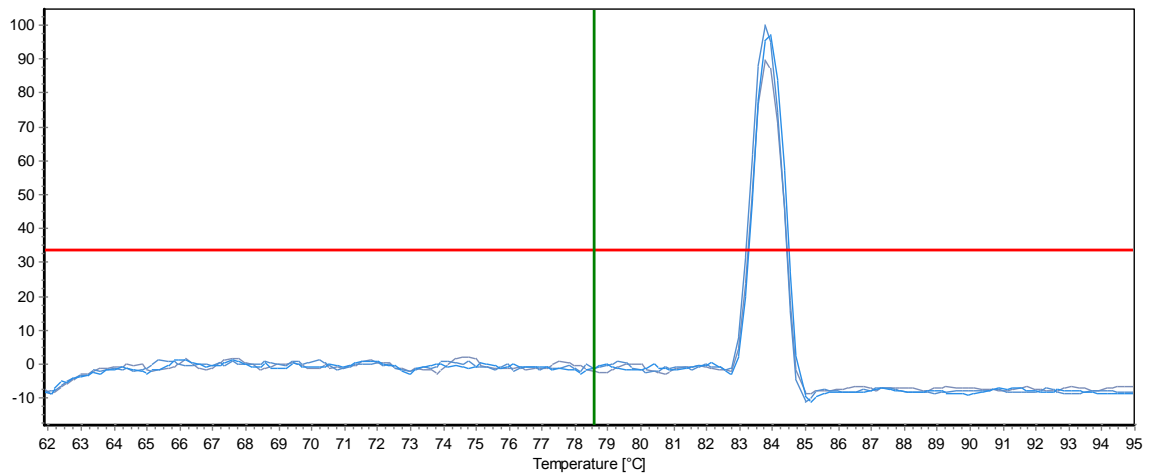
Threshold: 137 (Noiseband)
Baseline settings: automatic, Drift correction OFF

Im Anschluss an die drei Schritte folgt die Schmelzkurve, anhand derer man erkennen kann, ob es sich ausschließlich um das gesuchte Gen handelt oder ob neben diesem zusätzliche nicht erwünschte Produkte oder Primer-Dimere vorhanden sind. Ein Primer-Dimer ist daran zu erkennen, dass es aufgrund seiner geringeren Basenzahl eine deutlich niedrigere Schmelztemperatur als das PCR-Produkt aufweist.

Bei der Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte werden während kontinuierlicher Fluoreszenzmessung die PCR-Produkte in 0,2°C-Schritten zu je 8 Sekunden von der spezifischen Annealingtemperatur - 1°C bis 95°C erhitzt. Mit dem Erreichen der für das PCR-Produkt spezifischen Schmelztemperatur denaturiert die doppelsträngige DNA und das bis dahin gebundene SYBR Green kann nicht mehr binden, weswegen kein Fluoreszenzsignal mehr messbar ist.

Material und Methoden

Abbildung11: Exemplarische Schmelzkurve einer quantitativen real-time PCR



Threshold: 33%

4.4.2 Pipettierschema

Die cDNA wurde für die qRT-PCR nach folgendem Schema vorbereitet:

Tabelle 1: Zusammensetzung des Mastermixes

	Pro Well	Mastermix (3-fach)
cDNA	1 ng (\neq 1 μ l in 1 ng auf 1 μ l)	3 ng
Primer (for + rev)	2 μ l	2 μ l
SYBR-Green Mix	5 μ l	15 μ l
Nuklease-freies Wasser	auf 10 μ l auffüllen	auf 30 μ l auffüllen

Aus dem Mastermix wurden in eine PCR-96-Well-Platte (Biozym Scientific GmbH, # 621835) jeweils 10 μ l pro Well pipettiert. Die Wells wurden danach mit Optical Flat Caps (Biozym Scientific GmbH, # 621816) verschlossen und kurz anzentrifugiert, dadurch wird gewährleistet, dass sich der gesamte Ansatz unten im Well befindet.

Drei Mal wurde die qRT-PCR mit dreifachen Ansätzen, mittels eines Mastercylers ep gradient S realplex² (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), und folgendem Protokoll durchgeführt:

Material und Methoden

4.4.3 PCR-Programm

Tabelle 2: PCR-Programm

Initiale Denaturierung	2 min	95°C	
Denaturierung	15 sek	95°C	
Annealing	15 sek	53°C-63°C	45 Zyklen
Elongation	20 sek	72°C	
Letzte Elongation	10 min	72°C	
Schmelzkurve	15 sek je 8 sek	Annealing-Temp. -1°C auf 95°C	in 0,2°C-Schritten

4.4.4 Statistik

Die gewonnenen PCR-Daten wurden gegen die cDNA von periimplantärem Gewebe und mittels des Housekeeping-Gens Mitogen-Activated Protein Kinase 1 (MAPK-1) nach Pfaffl (2001) normalisiert. MAPK-1 wurde als Housekeeping-Gen eingesetzt, da es in unseren Proben identische ct-Werte aufwies.

Um die Effizienz der PCR bestimmen zu können, wurde eine Standardkurve exemplarisch für MAPK-1 durch eine Standardverdünnungsreihe generiert. Die cDNA periimplantären Gewebes mit einer Konzentration von 1ng/µl wurde als Standard-DNA eingesetzt. Dabei wurde die cDNA in 1:10 Verdünnungsschritten in einem Verdünnungsbereich zwischen 1:1 und 1:1000 verdünnt und wurde jeweils in den wie oben beschriebem PCR-Ansatz von 10µl eingesetzt.

Durch den Vergleich der Proben ist die weitere Berechnung der Ratio möglich. Es wurde sichergestellt, dass alle durch die qRT-PCR ermittelten ct-Werte einer Intertest- und Intratest-Variationsbreite von $\leq 1\%$ unterlagen. Der relative Expressionsunterschied zwischen dem Housekeeping-Gen zur Referenzprobe, normalisiert durch das Referenzgen MAPK-1, wird hierbei aus der arithmetischen Formel $E^{-\Delta\Delta CT}$ (E = Effizienz der PCR) berechnet. Diese Formel leitet sich wie folgt ab:

Material und Methoden

Bei MAPK-1 lag die Effizienz bei einem Wert von 2,01, somit wurde für die Referenzprobe eine Effizienz von 2 angenommen, wodurch die Formel zur Bestimmung der Ratio $2^{-\Delta\Delta CT}$ lautet.

4.4.5 Primerdesign

Mithilfe der primer3 shareware wurden die Primersequenzen für die PCR hergestellt und die Primersequenzen wurden mithilfe der NCBI Blast Datenbank (Nucleotide-Nucleotide Blast (blastn), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) überprüft. Es wurde dabei darauf geachtet, dass die Primer eine maximale Länge von 18-22 Basen aufwiesen und der Basengehalt von Guanin und Cytosin ungefähr 50% betrug. Um Alignments (Gene, bei denen die Nukleotidsequenz der Nukleotidsequenz anderer Gene ähnelt) ausschließen zu können, wurden die ausgewählten Primer mit der Online-Datenbank von NCBI abgeglichen.

Die spezifischen Sequenzen wurden dann zur Firma Operon Biotechnologie GmbH (Köln, Deutschland) gesendet, welche die Primer synthetisierte. Diese von der Operon Biotechnologie GmbH synthetisierten Primer wurden lyophilisiert geliefert und nach Herstellerangaben mit Nuklease-freiem Wasser resuspendiert und bei einer Temperatur von -20°C gelagert.

Tabelle 3: Oligonukleotidprimer für die real-time (RT)-PCR

Gen	Forward primer	Reverse primer	Länge	Annealing-Temperatur
Col I a1	ttccccagccacaaagagtc	cgatcatgcacaacacct	261 Bp	61°C
Col IV a1	ggagataaaggggctcaagg	ttttcaccggtaatccag	189 Bp	61°C
CD27	gaccatccaaggagagtgga	tgtagcatgtgggtctttcg	236 Bp	63°C
Hsp90	ccagttcgggtgttggtttt	tcctttattcttcttctcca	219 Bp	63°C
a2macro	tggctctggcttcattcc	gcaaaactcatccgtctcgta	242 Bp	60°C
IL28RA	tgtcccaaaaaggaactgac	ggttcaatgtagggtggaa	161 Bp	61,6°C
phex	atgcaggaacgaaaagg	gcgagttttaggacgt	160 Bp	53,1°C
MAPK-1	ccaccatattctggagcagt	cagtcctctgagcccttgc	186 Bp	59°C

Material und Methoden

4.4.6 Gradienten-PCR

Zur Ermittlung der für jeden Primer spezifischen Annealing-Temperatur, die für die optimale Anlagerung des Primers an die cDNA und damit für einen einwandfreien Ablauf der PCR verantwortlich ist, wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Dabei wurden für jeden Primer acht verschiedene Annealing-Temperaturen getestet. Hierfür wurde für jeden Primer und jede Temperatur ein Ansatz von 10µl eingesetzt. Bei der verwendeten cDNA handelt es sich um cDNA aus parodontitischem PDL mit einer Konzentration von 1ng/µl. Der Pipettieransatz für die Gradienten-PCR setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 4: Pipettieransatz der Gradienten-PCR

Substanzen	Menge (in µl)
cDNA	1 µl
Primer (for + rev)	2 µl
SYBR-Green-Mix	5 µl
Nuklease-freies Wasser	2 µl

Mit diesem Ansatz wurde im Mastercyclers ep gradient S realplex² (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) eine real-time PCR nach folgendem Programm durchgeführt:

Tabelle 5: Programm der Gradienten-PCR

Initiale Denaturierung	2 min	95°C	
Denaturierung	15 sek	95°C	
Annealing	15 sek	variabel	45 Zyklen
Elongation	20 sek	72°C	
Letzte Elongation	10 min	68°C	
Schmelzkurve	15 sek	Annealing-Temp. -1°C	
	je 8 sek	auf 95°C	in 0,2°C-Schritten

Die für jeden Primer spezifische Annealing-Temperatur wurde mithilfe der fluoreszenzvermittelten Extinktion ermittelt. Da die gemessene Extinktion proportional zu der im Ansatz vorhandenen cDNA ist, konnten Rückschlüsse auf die Effektivität der Primer bei einer bestimmten Temperatur gezogen werden. Die Temperatur mit der höchsten Extinktion, welche einen einzelnen, hohen, schlanken Piek in der Schmelzkurve aufwies, wurde als die

Material und Methoden

für den Primer spezifische Annealing-Temperatur festgelegt. Die spezifischen Annealing-Temperaturen der hier verwendeten Primer sind in der im Abschnitt 3.3.5 Primerdesign vorkommenden Tabelle dargestellt.

4.4.7 Sequenzierung der PCR-Produkte

Um die Spezifität der Primer zu ermitteln, wurde eine Sequenzierung der PCR-Produkte durchgeführt. Dies wurde nach der Methode von Sanger von der Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

Die durch die Sequenzierung von der Sequence Laboratories Göttingen GmbH ermittelten Nukleotidsequenzen wurden an uns übermittelt.

4.4.8 BLAST-Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool)

Die übermittelten Nukleotidsequenzen wurden mit der NCBI-Nukleotiddatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) abgeglichen. Hierdurch konnte festgestellt werden, ob das PCR-Produkt dem Zielgen entsprach. War dies der Fall, konnten die Primer für die Versuche mit der real-time PCR verwendet werden.

4.5 Microarray

4.5.1 Vorbereitung der Proben für die Microarray-Analyse

Die Genexpressionsanalyse mittels der Microarray-Technologie wurde mit einem Affymetrix GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array (Fa. Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) im Transkriptomanalyselabor des Zentrums Biochemie & Molekulare Zellbiologie der Universität Göttingen durchgeführt. Dabei wurden 19.793 humane Gene durch 28.869 auf dem GenChip befindliche Primer untersucht.

0,3 µg der gesamten mRNA wurden als Ausgangsmaterial zur Herstellung der cDNA benutzt. Die cDNA wurde mit dem WT Target Labeling und Control Reagents (Affymetrix, Cat. No. 900652) synthetisiert. Die Reinigung der cDNA wurde mittels des GeneChip® Sample Cleanup Moduls (Affymetrix) durchgeführt.

Die in-vitro-Transkription fand mit dem WT Target Labeling Kit (Affymetrix) statt. Danach wurde die gesamte Menge des Reaktionsprodukts mit dem GeneChip® cRNA Sample

Material und Methoden

Cleanup Module (Affymetrix) gereinigt und mittels NanoDrop ND-1000 quantifiziert. Die cDNA-Synthese (ss) wurde mit dem WT Target Labeling Kit (Affymetrix) durchgeführt und 5,5 µg der ssDNA wurden durch enzymatische Prozesse in Fragmente von 35 – 200 Basen aufgespalten. Der Grad der Fragmentierung und der Längenverteilung wurden durch das Kapillar-Elektrophorese-Verfahren mit dem Agilent 2100 Bioanalyser überprüft und es wurde nach der Fragmentierung eine Terminal labeling Reaktion (Biotin) mittels des WT Labeling Kits (Affymetrix, Cat. No. 900652) durchgeführt.

Die biotinierte fragmentierte ssDNA wurde nach Herstellerangaben auf dem GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix, Cat. No. 901171) hybridisiert. Die Hybridisierung wurde für 16 Stunden bei 60 rpm und 45°C im GeneChip® Hybridization Oven 640 (Affymetrix) vollzogen. In der GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix) wurde der Array nach Herstellerangaben gewaschen und gefärbt. Zur Färbung des Arrays mit streptavidin R-phycoerythrin (SAPE, Invitrogen, USA) wurde das Antikörpersignal-, Wasch- und Färbeprotokoll angewandt. Um die Färbung zu verstärken, wurde die SAPE-Lösung zweifach, mit einem Färbungsschritt mit einem biotinierten anti-streptavidin Antikörper (Vector Laboratories, Californien, USA) dazwischen, gefärbt. Danach wurden die Arrays mittels des GeneChip® Scanners 3000 7G gescannt.

4.5.2 Analyse der Daten

Die Intensitätsdaten wurden mittels der Affymetrix AGCC Software (version 2.0) extrahiert und mit dem affy (Gautier et al. 2003) und dem limma package (Smyth 2004) von Bioconductor (Gentleman et al. 2004) analysiert.

Die Microarray-Daten-Analyse besteht aus folgenden Schritten:

- 1.) Between-Array Normalisierung
- 2.) Transkriptweise Zusammenfassung der Einzelintensitäten
- 3.) Hierarchisches Clustering und PCA-Analyse
- 4.) Anpassen der Daten an ein lineares Modell
- 5.) Ermittlung der differentiellen Genexpression.

Material und Methoden

Die Quantil-Normalisierung wurde bei den log₂-transformierten Fluoreszenzsignalen als Methode für die between-Array-Normalisierung angewandt, um die Intensitätsverteilungen zwischen den Arrays anzupassen (Irizarry et al. 2003). Für die transkriptweise Zusammenfassung wurde das Median-polish-Verfahren verwendet. Die Clusteranalyse wurde durch einen hierarchischen Ansatz mit der Average-Linkage-Methode durchgeführt. Die Abstände wurden als 1 - Korrelationskoeffizient von Pearson definiert. Die PCA-Analyse wurde unter Verwendung der princomp-Funktion mit der R-Software durchgeführt. Zur Abschätzung der durchschnittlichen Gruppenwerte für jedes Gen und zur Bewertung der differentiellen Genexpression wurde ein einfaches lineares Modell an die Daten angepasst und so die Gruppen-Mittelwerte und Standardabweichungen für jedes Gen erhalten. Um Gene mit signifikanten Expressionsunterschieden zwischen den Gruppen zu finden, wurde eine empirische Bayes-Statistik angewandt, welche die Standardabweichung der geschätzten Werte mildert (Smyth 2004). Aus dieser modifizierten T-Statistik werden die P-Werte errechnet und bzgl. des multiplen Testens mit der Benjamini-Hochberg-Methode (Benjamini und Hochberg 1995) korrigiert. Die P-Wert-Adjustierung garantiert eine kleinere Anzahl von falsch-positiven Kandidaten. Bei den in dieser Dissertation verwendeten Genen wurde darauf geachtet, dass der P-Wert nicht über 0,05 lag.

Ergebnisse

5. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Genexpressionsprofile von drei Proben aus gesundem parodontalen Gewebe und drei Proben aus chronisch erkranktem parodontalen Gewebe, die jeweils aus fünf Proben (Patientenproben aus gesundem Parodont: G2, G4, G6, G8; und Patientenproben von Patienten mit chronischer Parodontitis: P4, P5, P6, P11) ausgewählt wurden, durch die Methodik der Microarray-Analyse und der real-time (RT)-PCR eruiert. Die daraus gewonnenen Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

5.1 Ergebnisse der Microarray-Analyse

Durch die Verwendung des GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array wurden die Expressionsdaten für 19.793 humane Gene im gesunden und chronisch infizierten Parodontalgewebe ermittelt. In dieser Dissertation wurden die Genexpression von Kollagen Typ I alpha 1 und Typ IV alpha 1, α -2-Macroglobulin, CD27, Hitzeschockprotein 90 kDa alpha class A member 1, Interleukin-28-Rezeptor alpha und Phosphat regulierender Endopeptidase untersucht. Diese Gene wurden ausgewählt, da sie die am deutlichsten regulierten Gene des Microarrays waren, bei denen der P-Wert nicht über 0,05 lag.

Tabelle 6: Auflistung der Gene geordnet nach P-Wert

Rang	Gen
1	phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked
2	regulator of G-protein signaling 5
3	alpha-2-macroglobulin
4	small nucleolar RNA, C/D box 21
5	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
6	myeloid cell nuclear differentiation antigen
7	multiple EGF-like-domains 9
8	G protein-coupled receptor 116
9	sorbin and SH3 domain containing 2
10	lymphoid enhancer-binding factor 1
11	netrin G1
12	sorbin and SH3 domain containing 1
13	matrix extracellular phosphoglycoprotein
14	zinc finger protein 208

Ergebnisse

15	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9
16	transmembrane 4 L six family member 18
17	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3
18	zinc finger protein 799
19	chromosome X open reading frame 36
20	secreted frizzled-related protein 2
21	proteolipid protein 1
22	zinc finger protein 436
23	neurexin 1
24	selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)
25	macrophage expressed gene 1
26	Cdc42 GTPase-activating protein
27	cadherin 19, type 2
28	ribosomal protein L24
	...
303	methyltransferase like 11A
304	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1
305	CD27 molecule
306	chromosome 9 open reading frame 103
	...
332	RAD51 homolog C (<i>S. cerevisiae</i>)
333	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1
334	centrosomal protein 135kDa
	...
515	fibrillin 2
516	collagen, type I, alpha 1
517	aspartyl-tRNA synthetase
	...
644	leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 1
645	collagen, type IV, alpha 1
646	small nucleolar RNA, C/D box 43
	...
722	kelch-like 21 (<i>Drosophila</i>)
723	interleukin 28 receptor, alpha (interferon, lambda receptor)
724	hypothetical gene supported by AJ002784
	...
	...
19.793	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 8

Ergebnisse

5.1.1 Ergebnisse der Kollagen-Typ-I-Expression bei der Microarray-Analyse

Abbildung 12: Expression von Kollagen Typ I beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (Microarray)
(G: Gesund; P: Parodontitis)

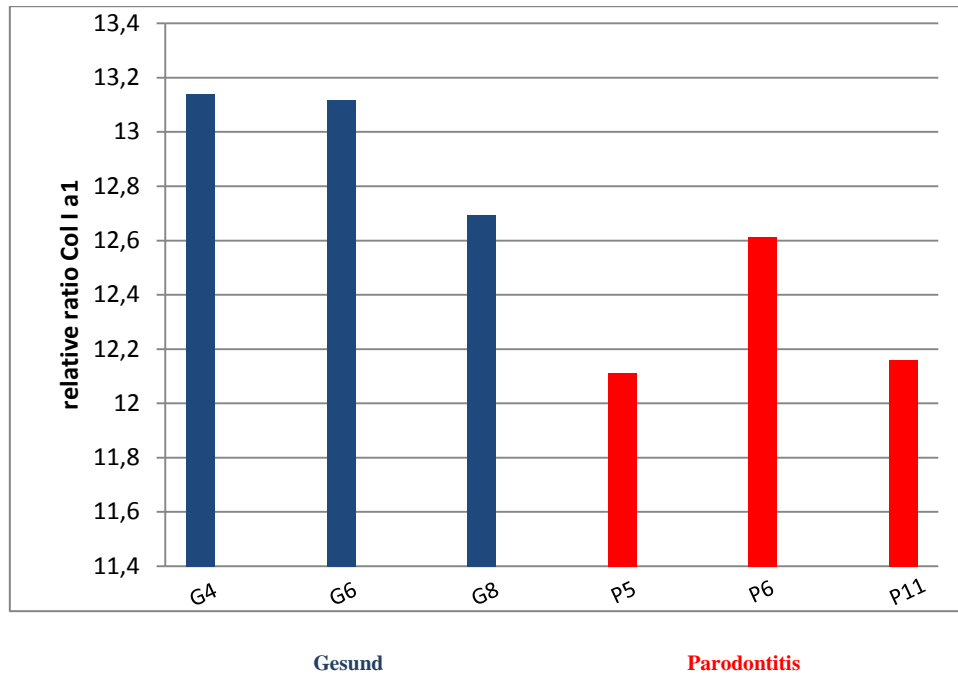
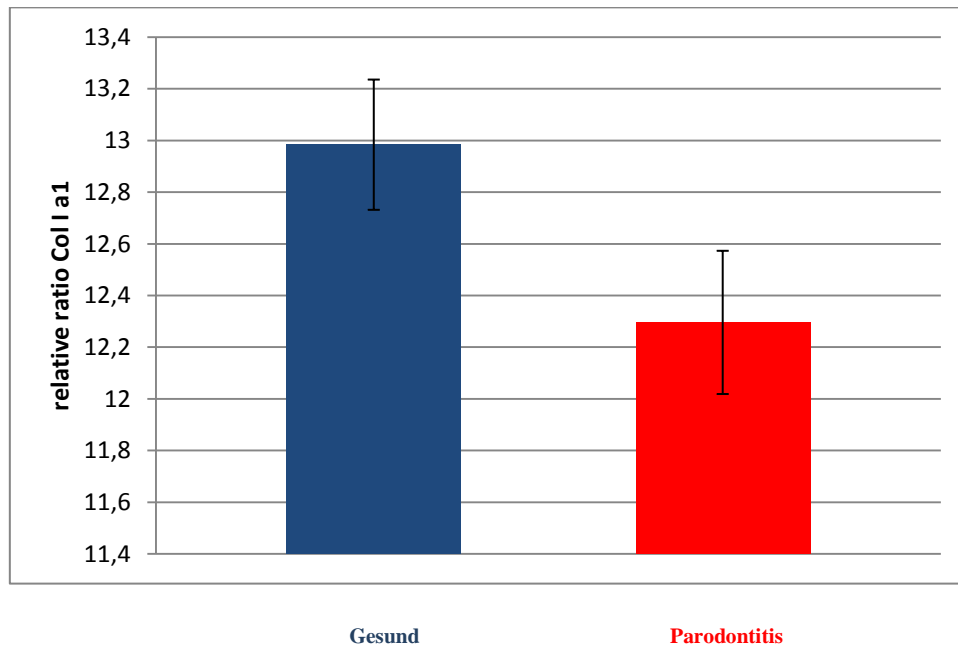


Abbildung 13: Expression von Kollagen Typ I beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (Microarray)



Bei Kollagen Typ I alpha 1 ist die Genexpression im parodontal erkrankten Gewebe gegenüber der im gesunden parodontalen Gewebe erniedrigt.

Ergebnisse

5.1.2 Ergebnisse der Kollagen-Typ-IV-Expression bei der Microarray-Analyse

Abbildung 14: Expression von Kollagen Typ IV beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (Microarray)
(G: Gesund; P: Parodontitis)

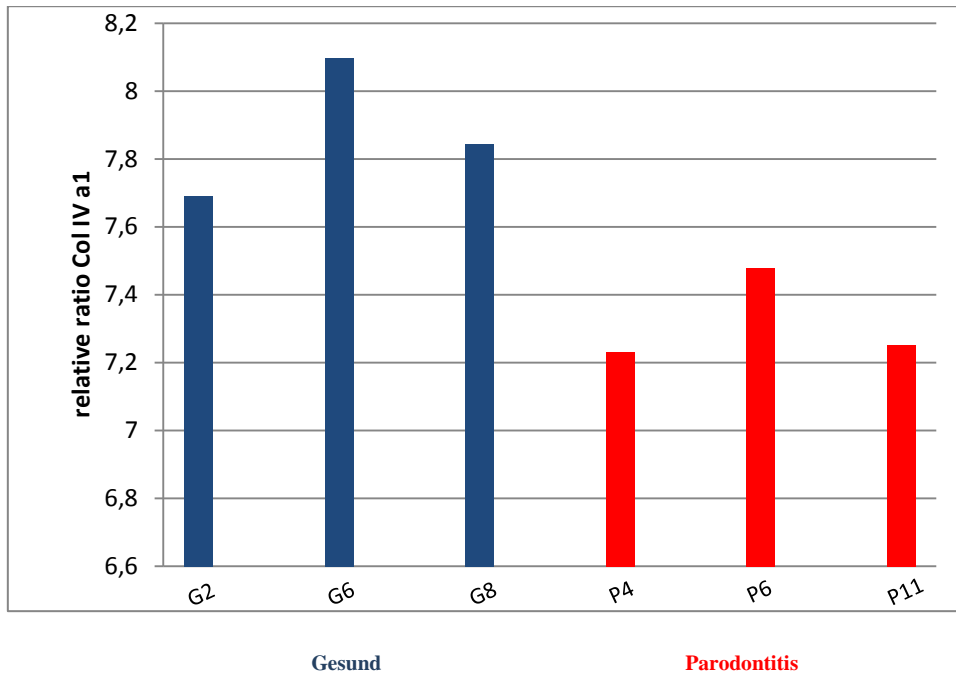
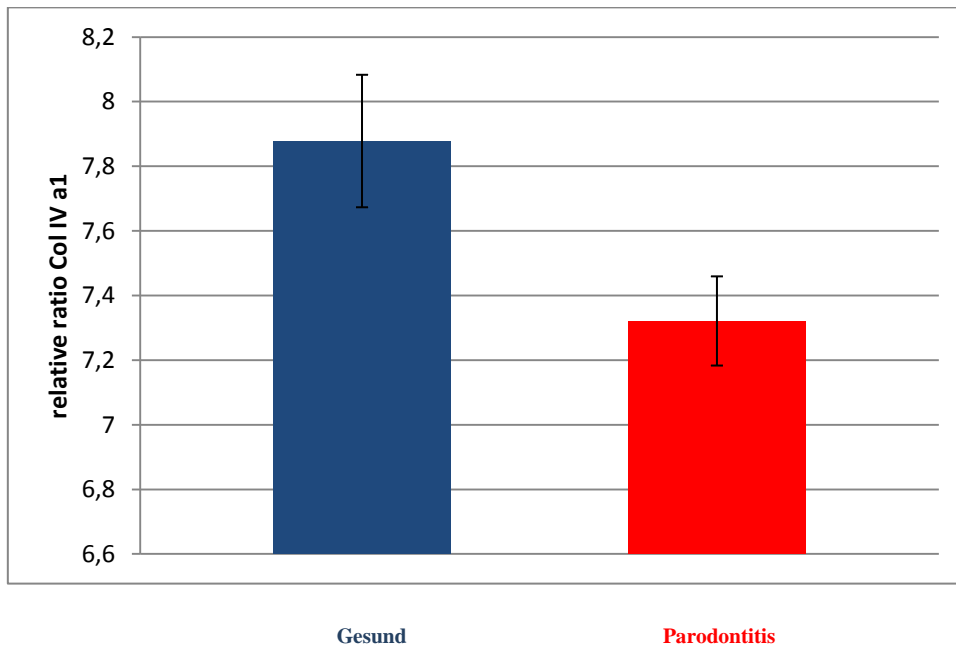


Abbildung 15: Expression von Kollagen Typ IV beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (Microarray)



Bei Kollagen Typ IV alpha 1 ist die Genexpression im parodontal erkrankten Gewebe gegenüber der im gesunden parodontalen Gewebe erniedrigt.

Ergebnisse

5.1.3 Ergebnisse der α -2-Macroglobulin-Expression bei der Microarray-Analyse

Abbildung 16: Expression von α -2-Macroglobulin beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (Microarray)
(G: Gesund; P: Parodontitis)

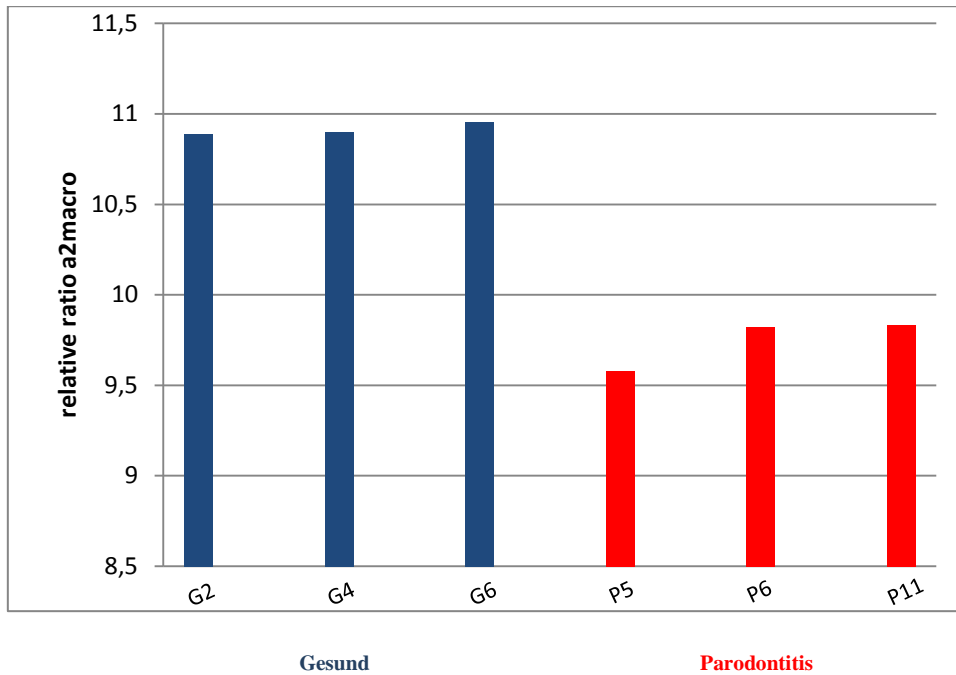
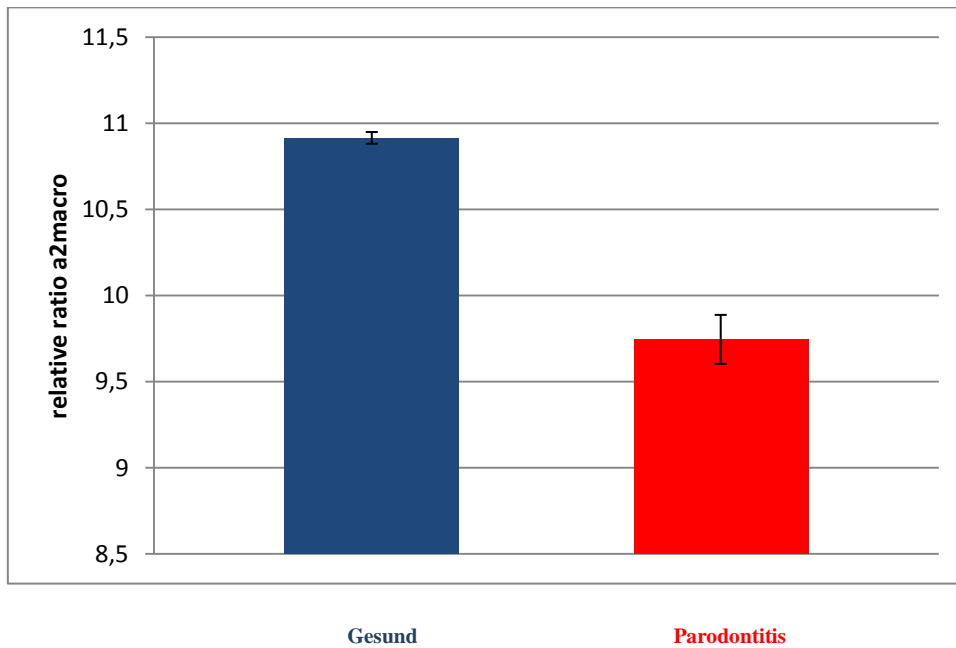


Abbildung 17: Expression von α -2-Macroglobulin beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst)
(Microarray)



Bei α -2-Macroglobulin ist die Genexpression im parodontal erkrankten Gewebe gegenüber der im gesunden parodontalen Gewebe erniedrigt.

Ergebnisse

5.1.4 Ergebnisse der CD27-Expression bei der Microarray-Analyse

Abbildung 18: Expression von CD 27 beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (Microarray)

(G: Gesund; P: Parodontitis)

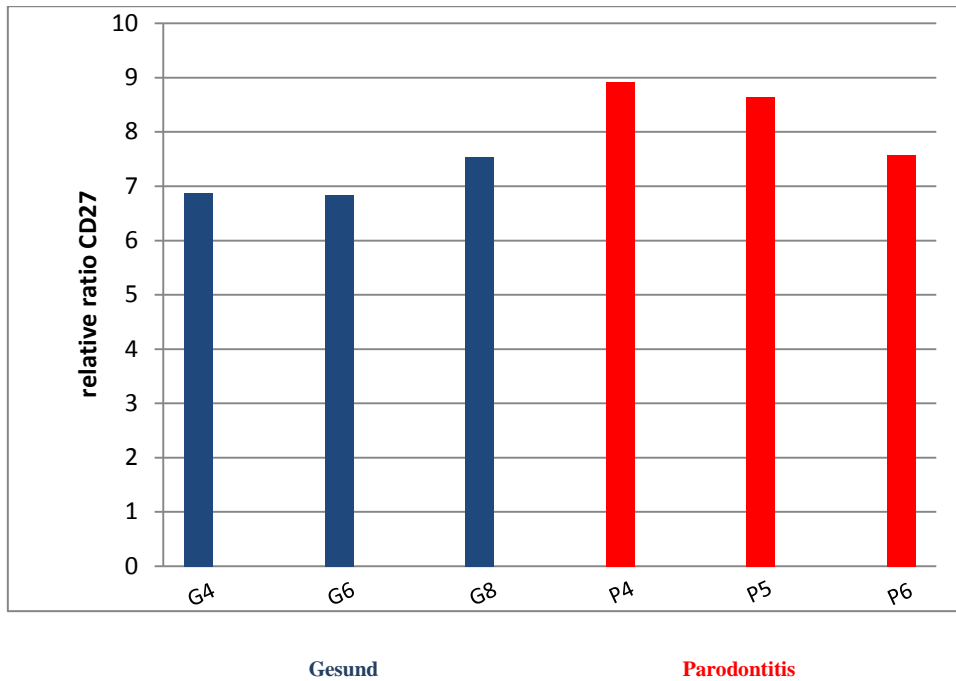
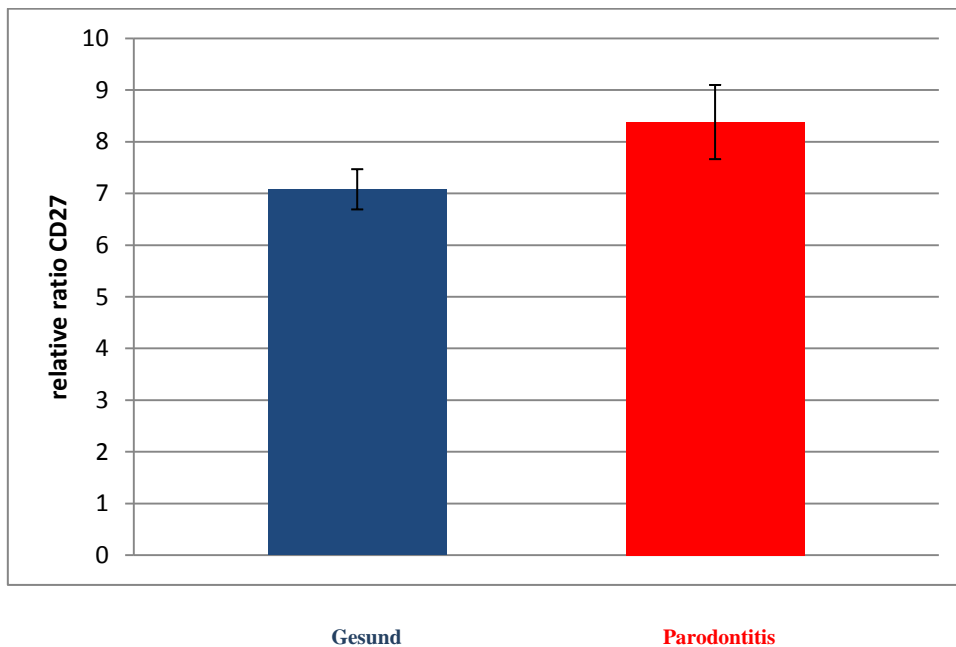


Abbildung 19: Expression von CD 27 beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (Microarray)



Bei CD 27 ist die Genexpression im parodontal erkrankten Gewebe gegenüber der im gesunden parodontalen Gewebe erhöht.

Ergebnisse

5.1.5 Ergebnisse der Hitzeschockprotein-90-kDa-alpha-class-A-member-1-Expression bei der Microarray-Analyse

Abbildung 20: Expression von Hitzeschockprotein 90 kDa alpha class A member 1 beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (Microarray) (G: Gesund; P: Parodontitis)

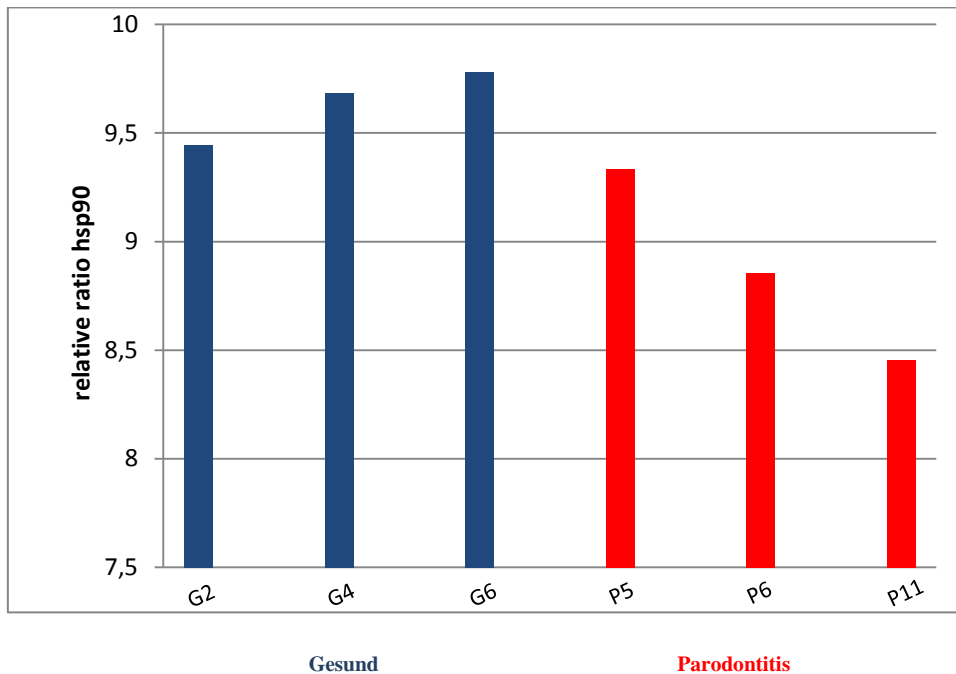
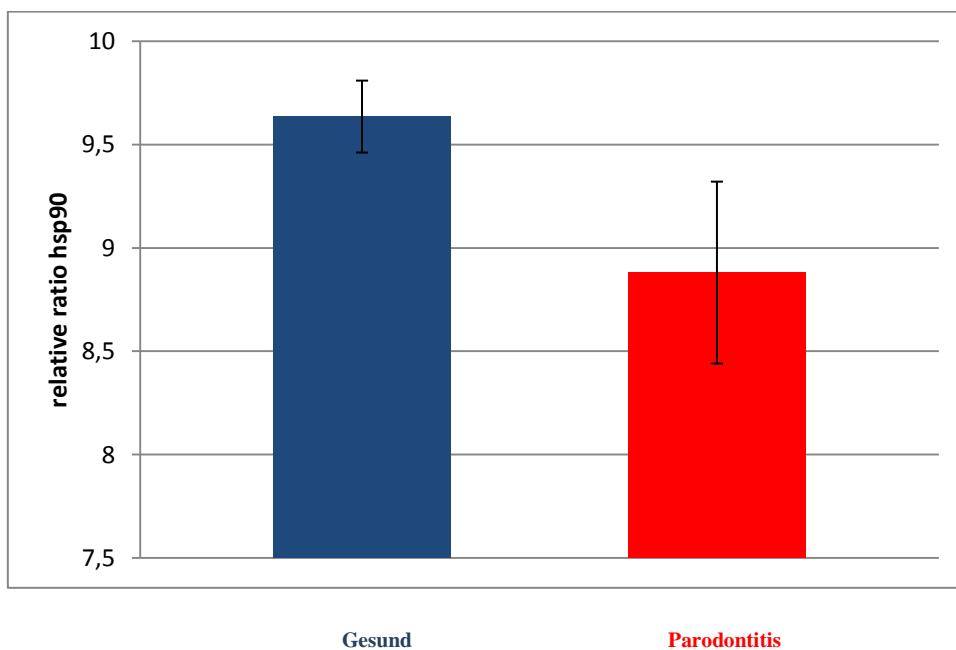


Abbildung 21: Expression von Hitzeschockprotein 90 kDa alpha class A member 1 beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (Microarray)



Beim Hitzeschockprotein 90 kDa alpha class A member 1 ist die Genexpression im parodontal erkrankten Gewebe gegenüber der im gesunden parodontalen Gewebe erniedrigt.

Ergebnisse

5.1.6 Ergebnisse der Interleukin-28-Rezeptor-alpha-Expression bei der Microarray-Analyse

Abbildung 22: Expression von Interleukin-28-Rezeptor alpha beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (Microarray)
(G: Gesund; P: Parodontitis)

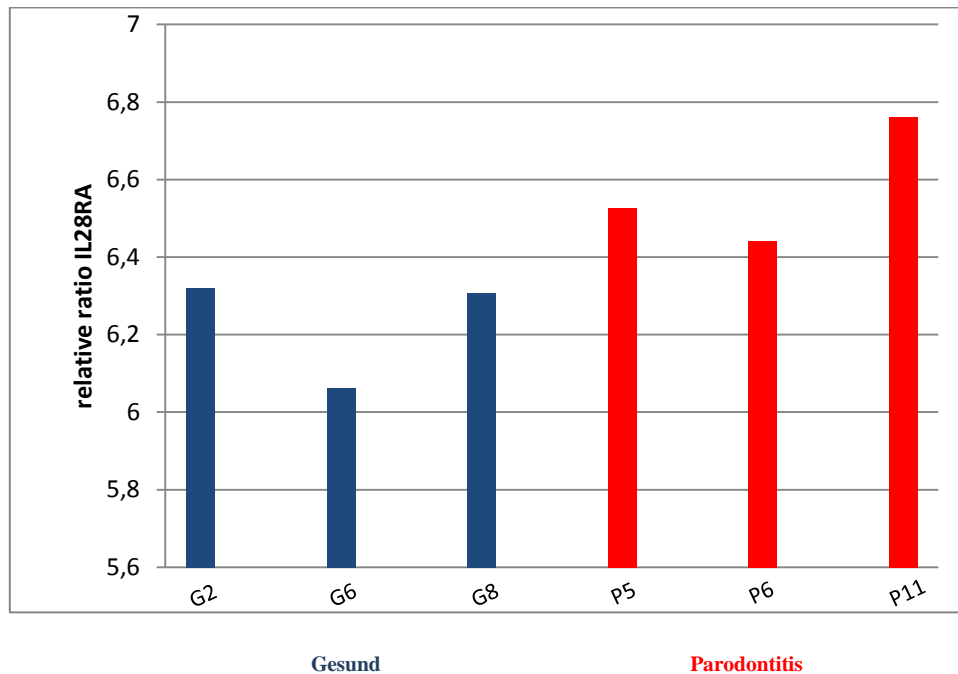
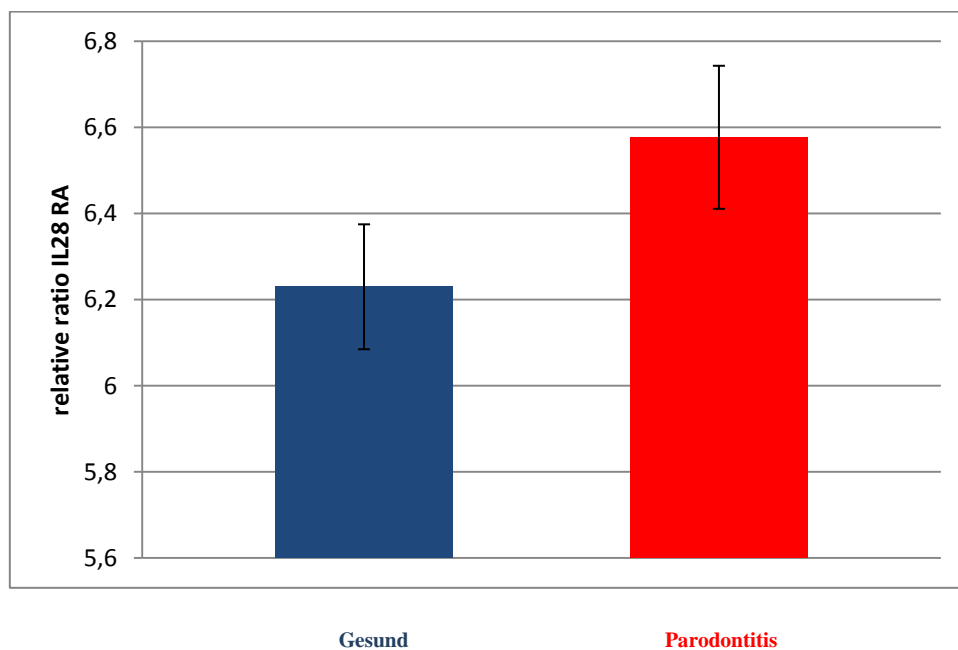


Abbildung 23: Expression von Interleukin-28-Rezeptor alpha beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (Microarray)



Beim Interleukin-28-Rezeptor alpha ist die Genexpression im parodontal erkrankten Gewebe gegenüber der im gesunden parodontalen Gewebe erhöht.

Ergebnisse

5.1.7 Ergebnisse der Phosphat-regulierende-Endopeptidase-Expression bei der Microarray-Analyse

Abbildung 24: Expression der Phosphat regulierenden Endopeptidase beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (Microarray)
(G: Gesund; P: Parodontitis)

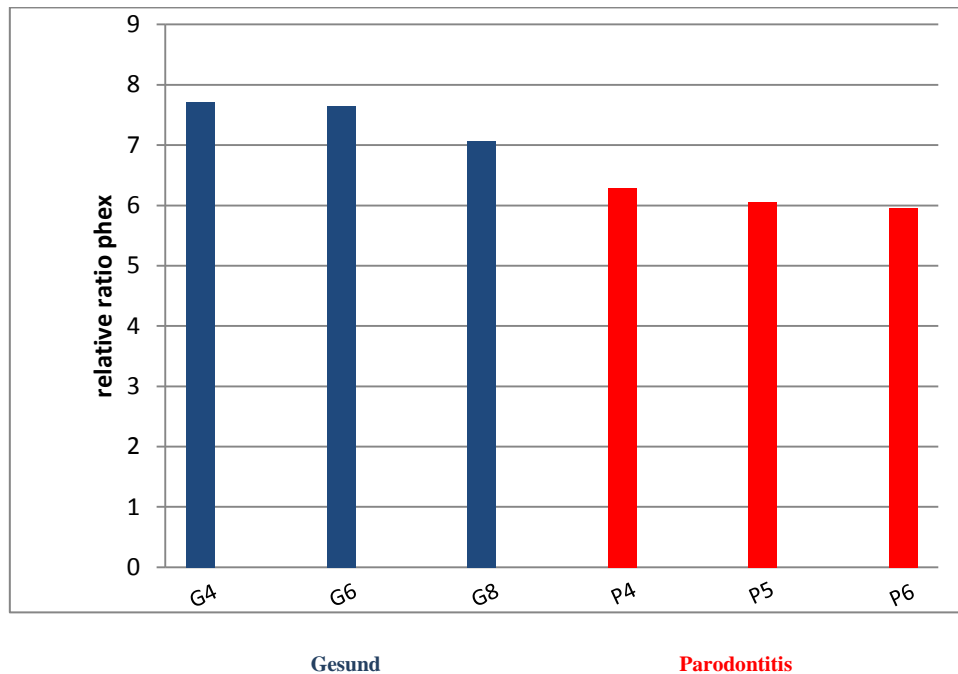
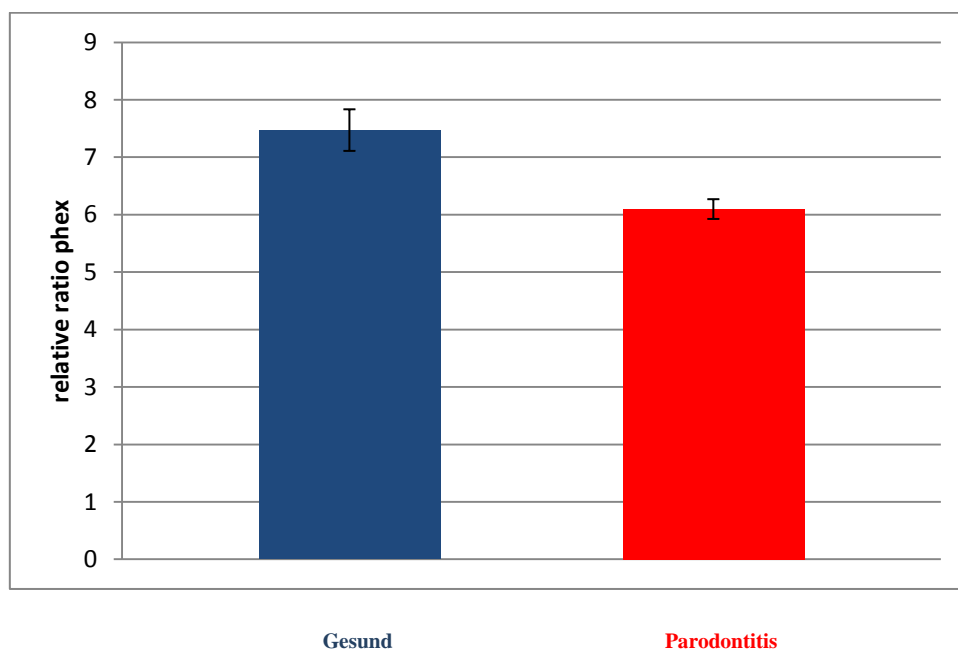


Abbildung 25: Expression der Phosphat regulierenden Endopeptidase beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis
(zu Gruppen zusammengefasst) (Microarray)



Bei der Phosphat regulierenden Endopeptidase ist die Genexpression im parodontal erkrankten Gewebe gegenüber der im gesunden parodontalen Gewebe erniedrigt.

Ergebnisse

5.2 Ergebnisse der real-time (RT)-PCR

Zur Verifizierung der im Microarray gewonnenen Ergebnisse wurden die Gene mittels der real-time (RT)-PCR untersucht. Die PCR-Produkte wurden mittels der Schmelzkurve überprüft und durch die relative Quantifizierungsmethode nach Pfaffl (Pfaffl 2001) normalisiert.

Ergebnisse

5.2.1 Ergebnisse der Kollagen-Typ-I-Expression bei der real-time (RT)-PCR-Analyse

Abbildung 26: Expression von Kollagen Typ I beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (real-time (RT)-PCR)
(G: Gesund; P: Parodontitis)

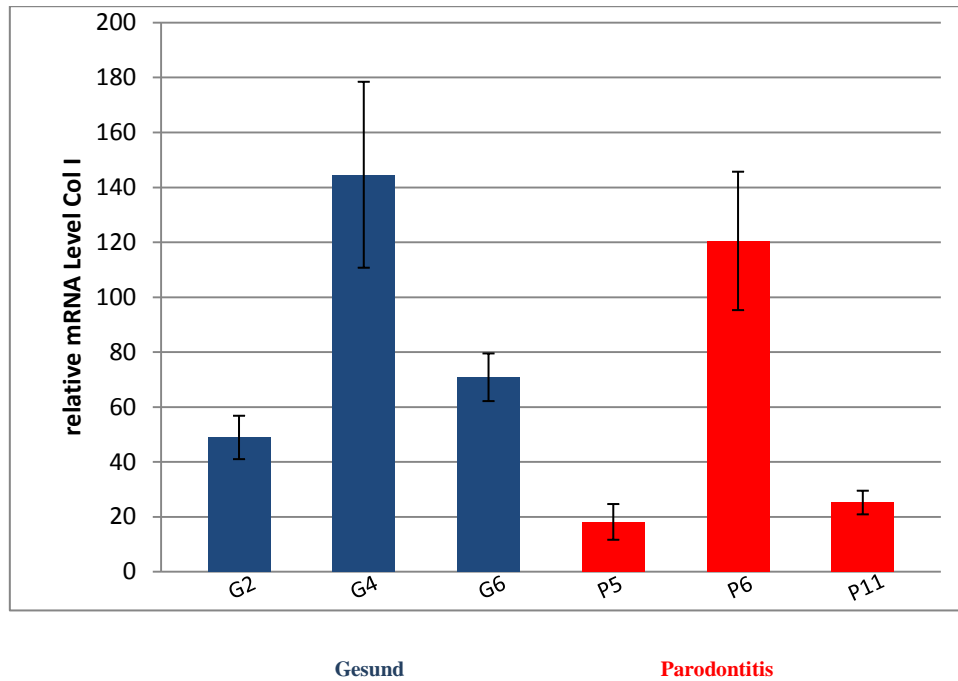
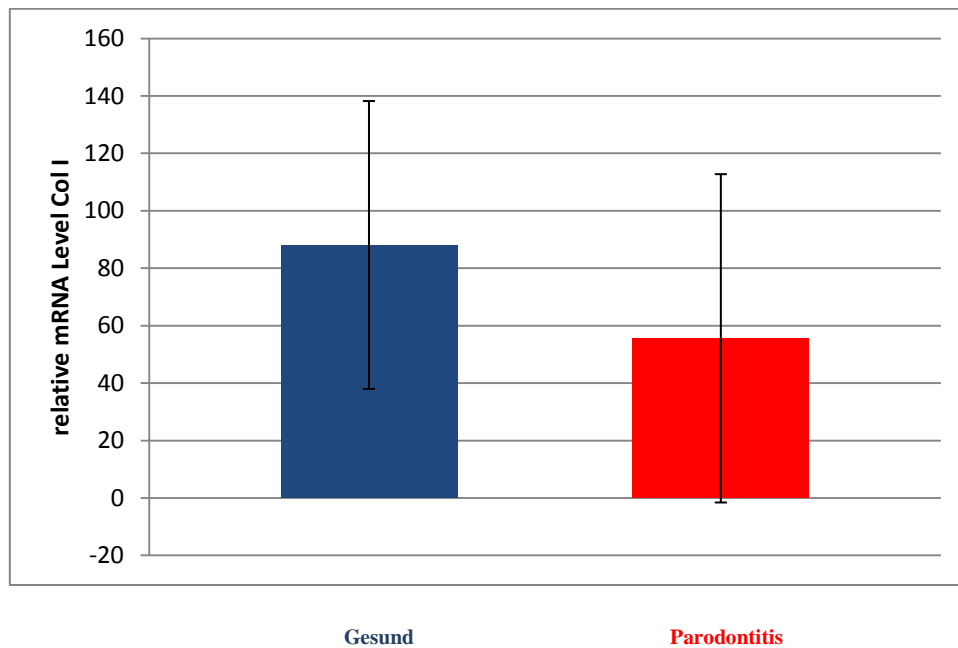


Abbildung 27: Expression von Kollagen Typ I beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst)
(real-time (RT)-PCR)



Bei Kollagen Typ I alpha 1 ist die Genexpression im parodontal erkrankten Gewebe gegenüber der im gesunden parodontalen Gewebe bei zwei Proben erniedrigt, bei einer Probe jedoch erhöht.

Ergebnisse

5.2.2 Ergebnisse der Kollagen-Typ-IV-Expression bei der real-time (RT)-PCR-Analyse

Abbildung 28: Expression von Kollagen Typ IV beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (real-time (RT)-PCR)
(G: Gesund; P: Parodontitis)

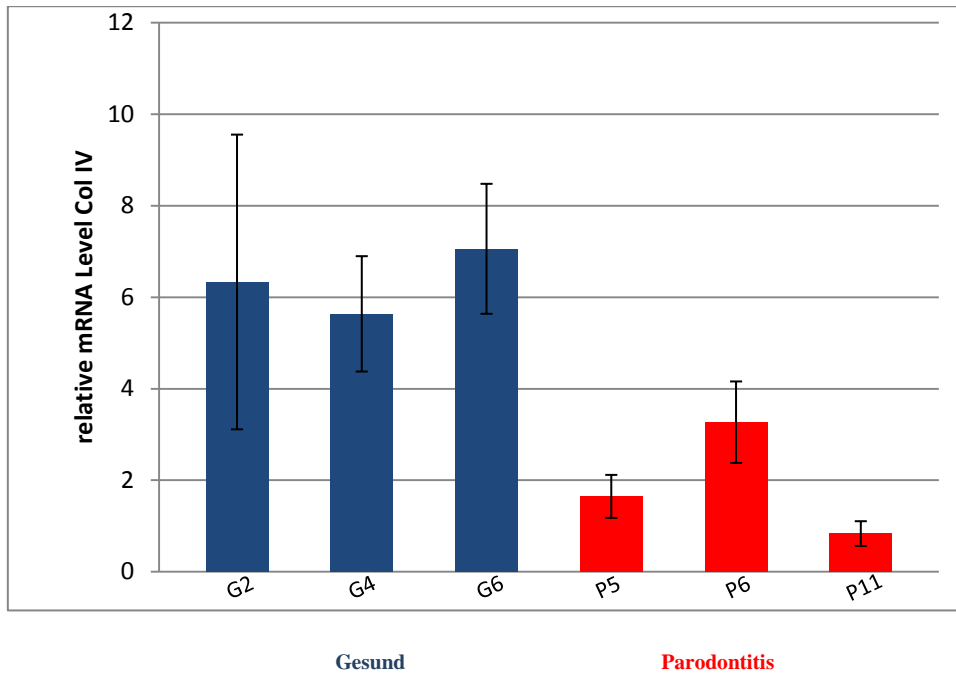
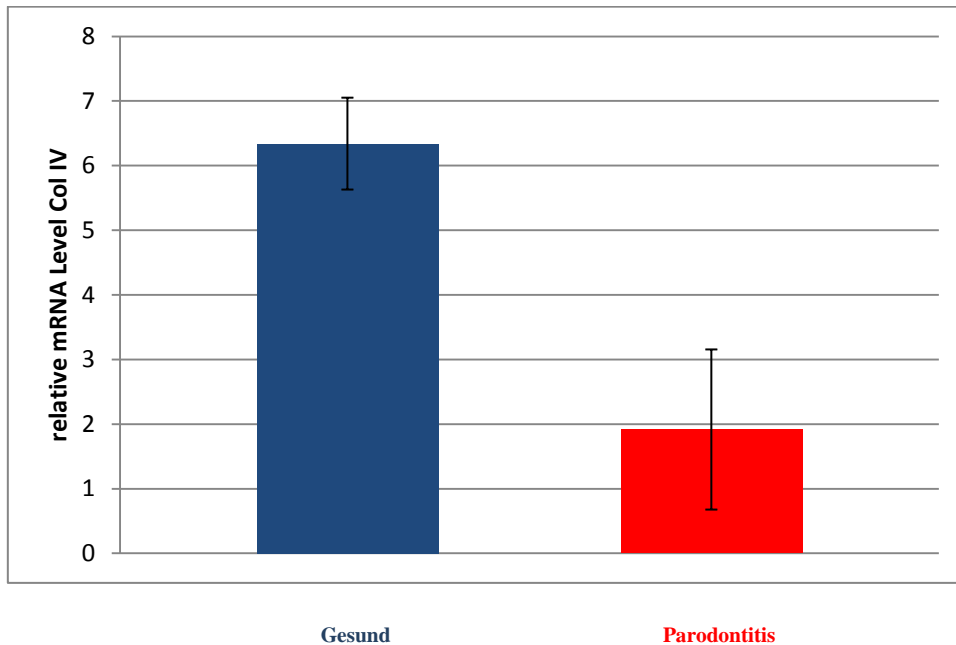


Abbildung 29: Expression von Kollagen Typ IV beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst)
(real-time (RT)-PCR)



Bei Kollagen Typ IV alpha 1 ist die Genexpression im parodontal erkrankten Gewebe gegenüber der im gesunden parodontalen Gewebe erniedrigt.

Ergebnisse

5.2.3 Ergebnisse der α -2-Macroglobulin-Expression bei der real-time (RT)-PCR-Analyse

Abbildung 30: Expression von α -2-Macroglobulin beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (real-time (RT)-PCR)

(G: Gesund; P: Parodontitis)

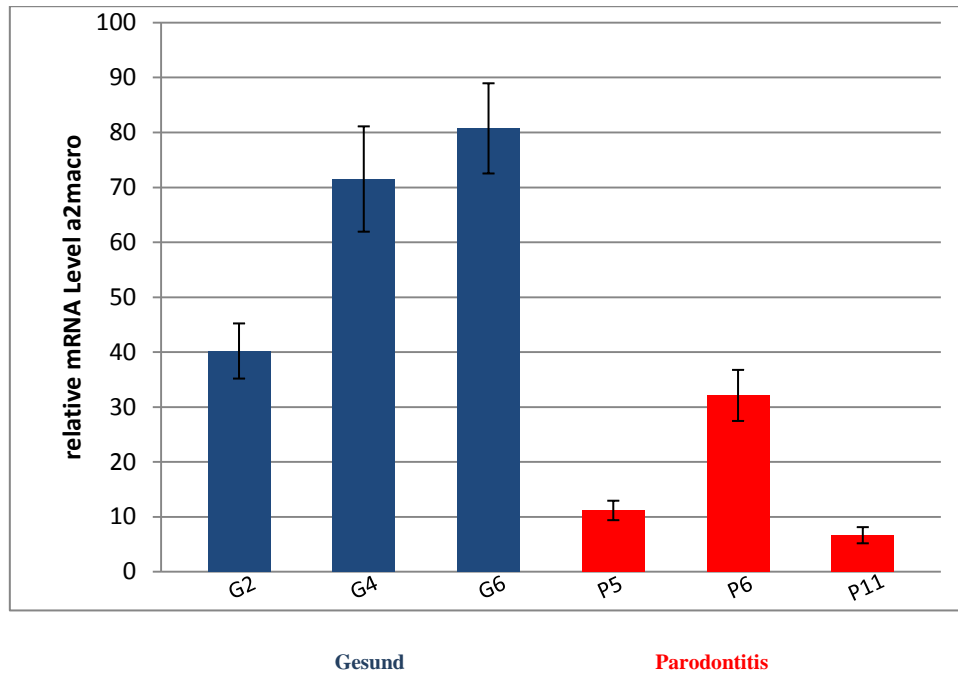
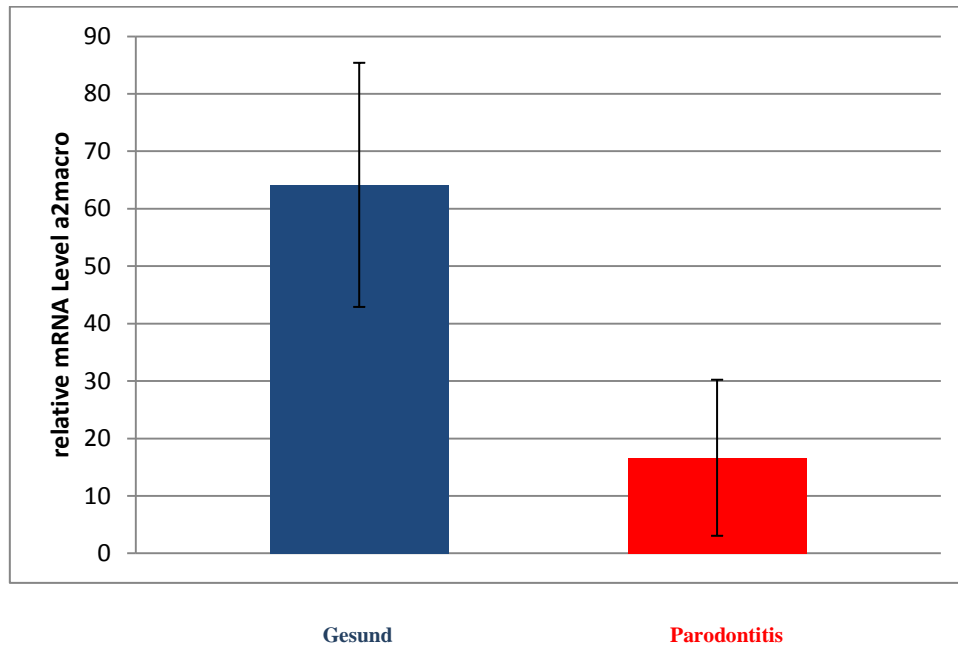


Abbildung 31: Expression von α -2-Macroglobulin beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (real-time (RT)-PCR)

(real-time (RT)-PCR)



Bei α -2-Macroglobulin ist die Genexpression im parodontal erkrankten Gewebe gegenüber der im gesunden parodontalen Gewebe erniedrigt.

Ergebnisse

5.2.4 Ergebnisse der CD27-Expression bei der real-time (RT)-PCR-Analyse

Abbildung 32: Expression von CD 27 beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (real-time (RT)-PCR)

(G: Gesund; P: Parodontitis)

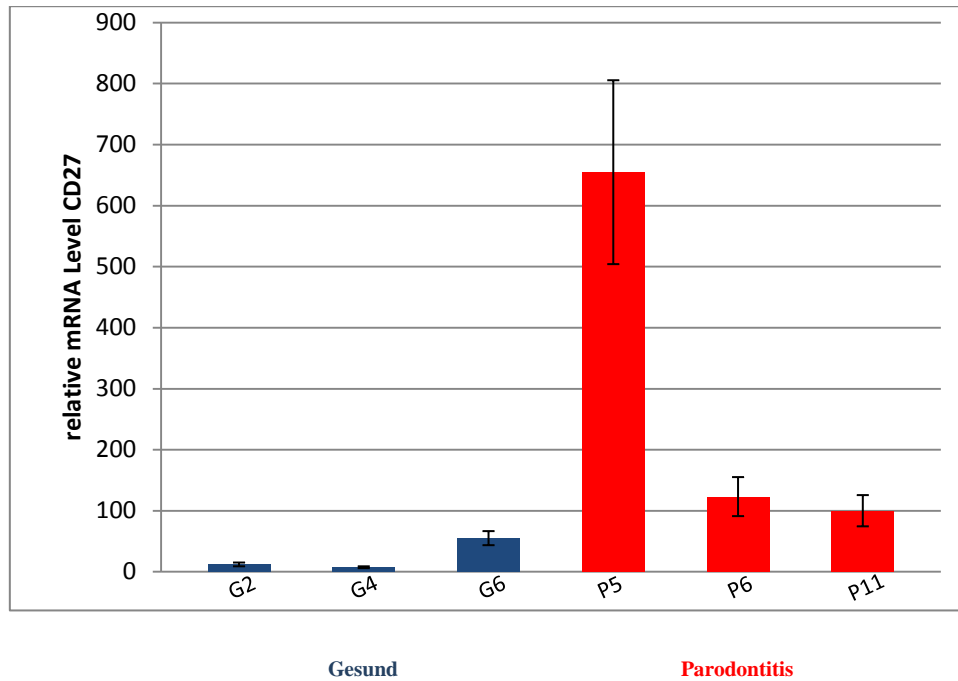
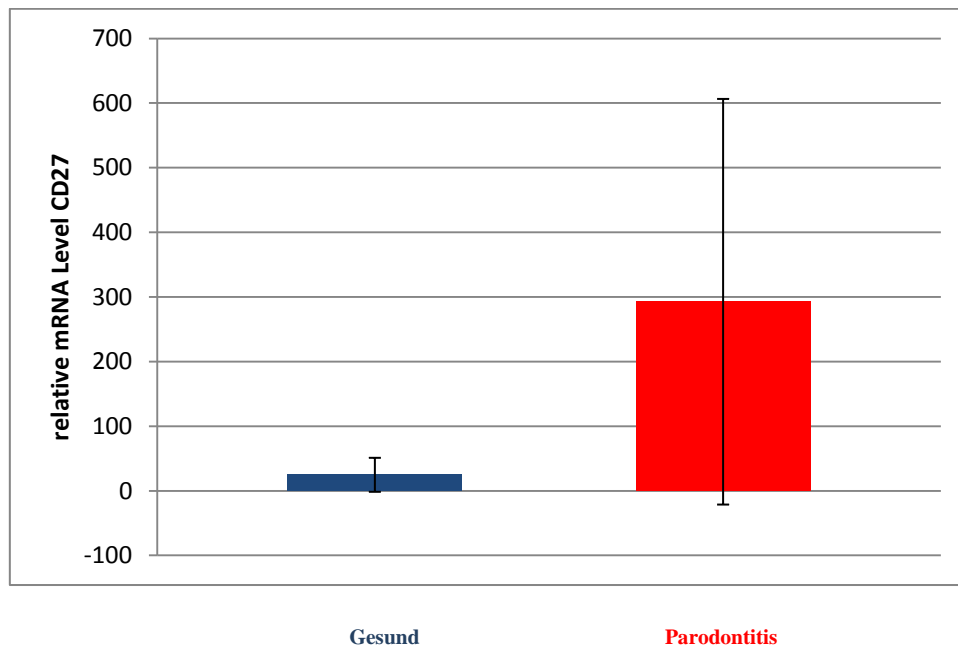


Abbildung 33: Expression von CD 27 beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst)

(real-time (RT)-PCR)



Bei CD 27 ist die Genexpression im parodontal erkrankten Gewebe gegenüber der im gesunden parodontalen Gewebe erhöht.

Ergebnisse

5.2.5 Ergebnisse der Hitzeschockprotein-90-kDa-alpha-class-A-member-1-Expression bei der real-time (RT)-PCR-Analyse

Abbildung 34: Expression von Hitzeschockprotein 90 kDa alpha class A member 1 beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (real-time (RT)-PCR) (G: Gesund; P: Parodontitis)

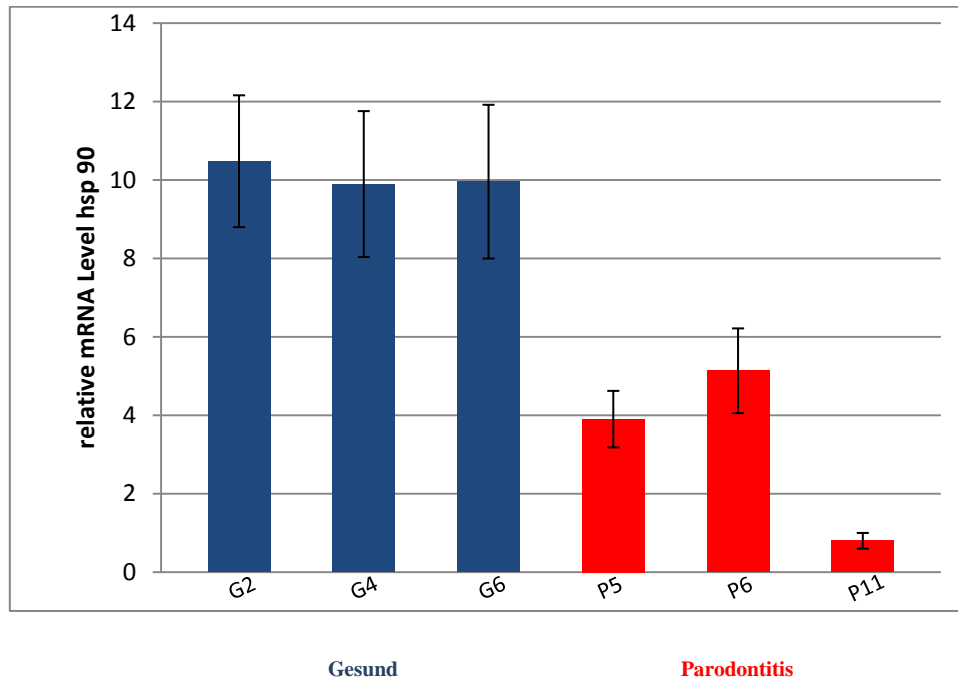
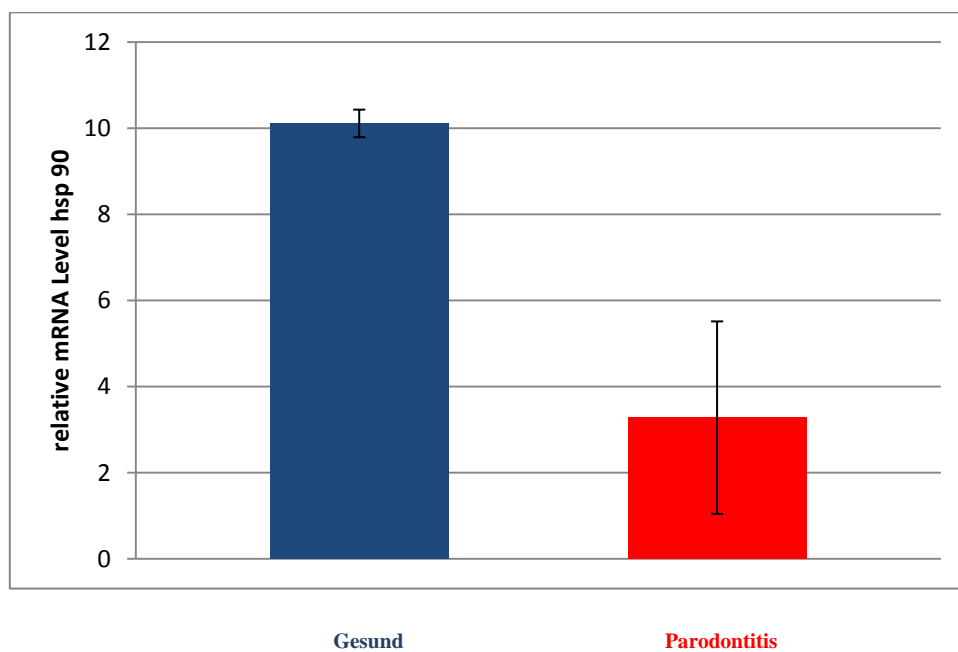


Abbildung 35: Expression von Hitzeschockprotein 90 kDa alpha class A member 1 beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (real-time (RT)-PCR)



Beim Hitzeschockprotein 90 kDa alpha class A member 1 ist die Genexpression im parodontal erkrankten Gewebe gegenüber der im gesunden parodontalen Gewebe erniedrigt.

Ergebnisse

5.2.6 Ergebnisse der Interleukin-28-Rezeptor-alpha-Expression bei der real-time (RT)-PCR-Analyse

Abbildung 36: Expression von Interleukin-28-Rezeptor alpha beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (real-time (RT)-PCR)
(G: Gesund; P: Parodontitis)

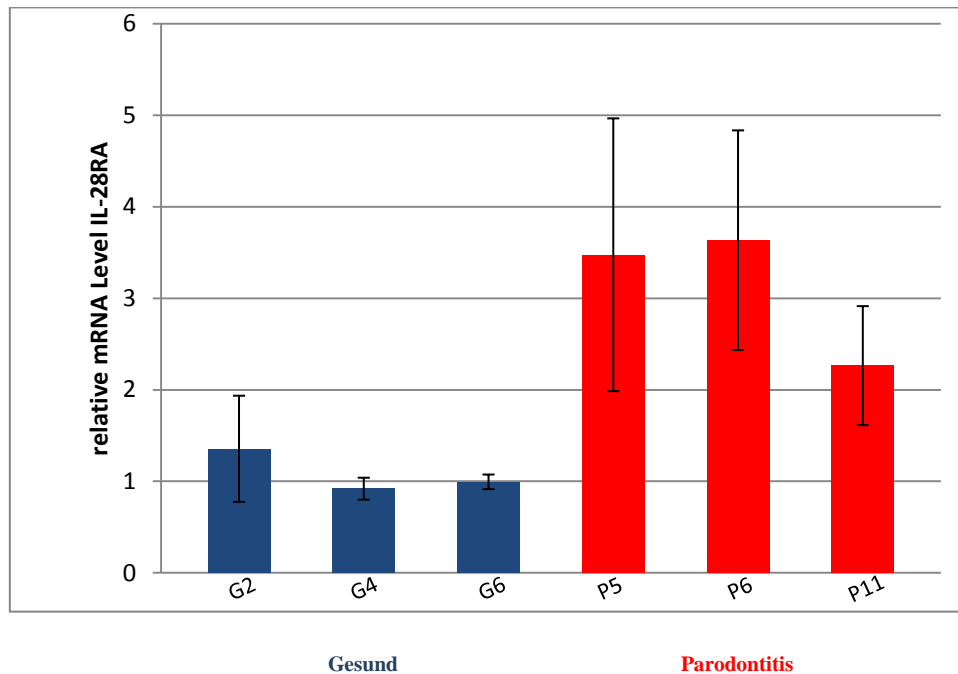
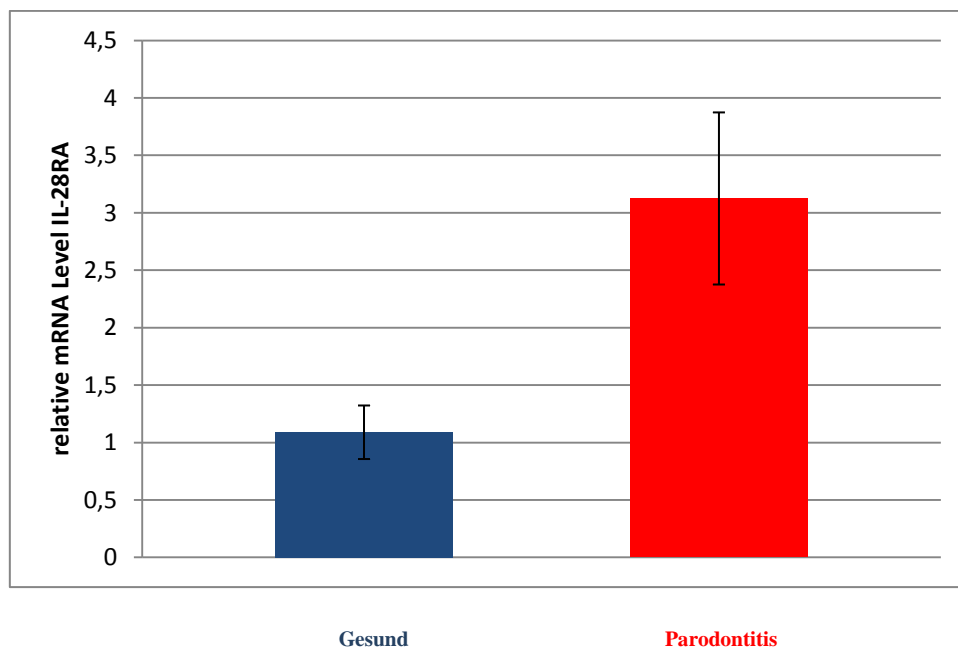


Abbildung 37: Expression von Interleukin-28-Rezeptor alpha beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (real-time (RT)-PCR)



Beim Interleukin-28-Rezeptor alpha ist die Genexpression im parodontal erkrankten Gewebe gegenüber der im gesunden parodontalen Gewebe erhöht.

Ergebnisse

5.2.7 Ergebnisse der Phosphat-regulierende-Endopeptidase-Expression bei der real-time (RT)-PCR-Analyse

Abbildung 38: Expression der Phosphat regulierenden Endopeptidase beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (real-time (RT)-PCR) (G: Gesund; P: Parodontitis)

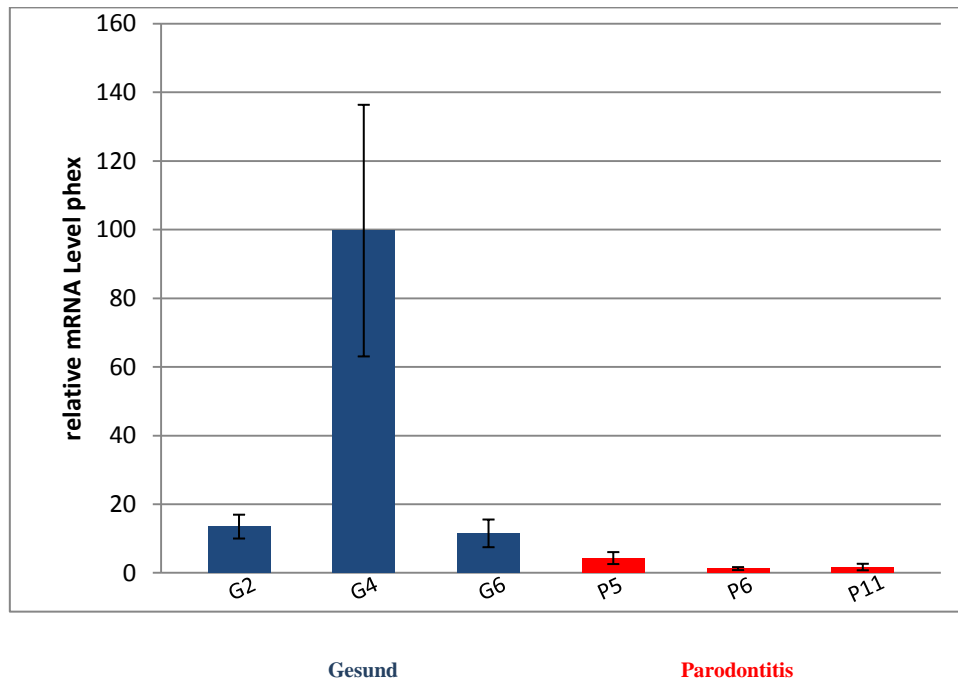
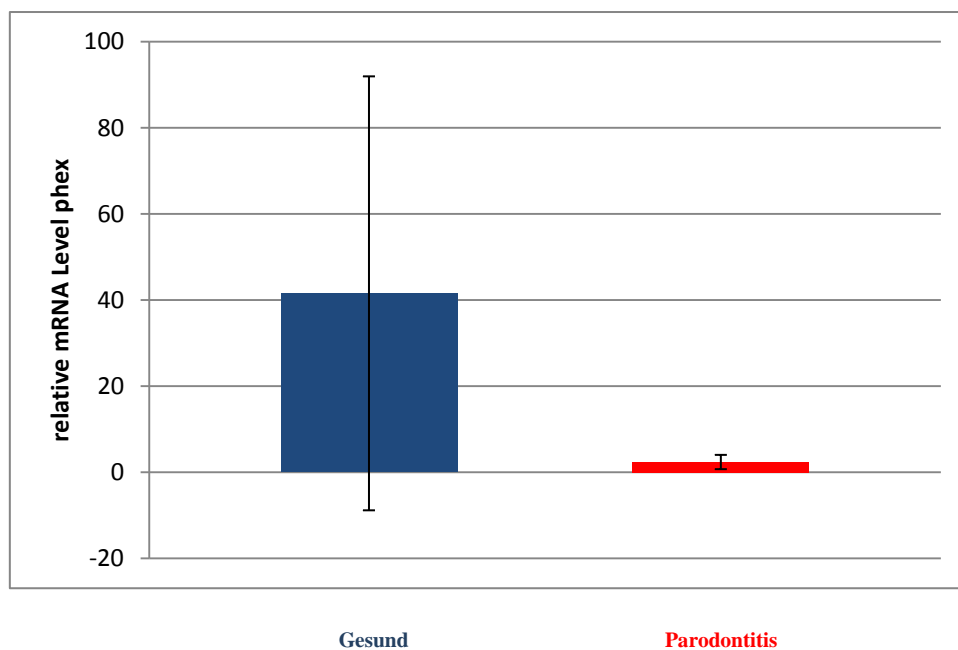


Abbildung 39: Expression der Phosphat regulierenden Endopeptidase beim gesunden Parodont im Vergleich zur Parodontitis (zu Gruppen zusammengefasst) (real-time (RT)-PCR)



Bei der Phosphat regulierenden Endopeptidase ist die Genexpression im parodontal erkrankten Gewebe gegenüber der im gesunden parodontalen Gewebe erniedrigt.

Ergebnisse

5.3 Übersicht der Ergebnisse

Bei der Gegenüberstellung der Microarray-Ergebnisse mit denen der real-time (RT)-PCR-Untersuchung ließen sich neben den selben Expressionstendenzen (Typ IV alpha 1, α -2-Macroglobulin, CD27, Hitzeschockprotein 90 kDa alpha class A member 1, Interleukin-28-Rezeptor alpha und Phosphat regulierende Endopeptidase) auch nicht komplett gleiche Ergebnisse feststellen (Kollagen Typ I alpha 1).

Diskussion

6. Diskussion

Laut Bundeszahnärztekammer ist die Parodontitis die häufigste Ursache für Zahnverlust nach dem 45. Lebensjahr. Ziel dieser Dissertation war die Untersuchung der Unterschiede zwischen dem gesunden Parodont und der chronischen Parodontitis auf molekularbiologischer Ebene.

6.1 Diskussion zur Methode

Bei den Probanden, deren PDL verwendet wurde, wurde die Diagnose „chronische Parodontitis“ durch eindeutige klinisch etablierte Parameter festgelegt. So konnten bei der parodontologischen Untersuchung der Probanden eine Blutung bei der Sondierung tiefer Zahnfleischtaschen über 3,5 mm, ein Attachmentverlust und erhöhte Zahnlockerungsgrade festgestellt werden. Die Tatsache, dass sich die Messergebnisse bei verschiedenen Behandlern unterscheiden (Armitage 2003) und es somit zu geringen Messabweichungen kommen kann, kann, da es sich um die Untersuchung der fortgeschrittenen chronischen Parodontitis mit der Indikation zur Extraktion handelt, vernachlässigt werden.

Auf molekularbiologischer Ebene konnte durch den Nachweis von CD27, durch das es zur Aktivierung von NF- κ B kommt, sowohl mittels Microarray als auch mittels real-time (RT)-PCR, eine chronische Entzündung nachgewiesen werden.

Bei den Probanden für die Proben mit gesundem Parodont konnte zum Zeitpunkt der Untersuchung das Parodont als klinisch eindeutig parodontal gesund klassifiziert werden.

In dieser Dissertation wurden die Expressionslevel der verschiedenen Gene bestimmt. Die mRNA-Mengen wurden mit den Protein-Mengen des PDLs korreliert, um die möglichen Funktionen der untersuchten Gene im Verlauf der Parodontitis diskutieren zu können.

Durch die erfolgreiche Verwendung etablierter Versuchsprotokolle im Bezug auf die Methoden (z.B. mRNA-Isolierung, mRNA-Gütebestimmung, Hybridisierung mit dem Microarray, Umschreiben der mRNA in cDNA, Genexpressionsanalyse mittels der real-time (RT)-PCR) sind die gemessenen Werte reproduzierbar.

Durch die Gewinnung der mRNA direkt aus dem PDL-Gewebe und nicht aus kultivierten PDL-Zellen können Angleichungen von gesundem und chronisch entzündetem Parodont und/oder Veränderungen der Genexpression einzelner Gene vermieden werden.

Diskussion

Die real-time (RT)-PCR stellt ein Standardverfahren bei der Genexpressionsanalyse dar, da bei dieser Methode aufgrund der hohen Analysesensitivität selbst kleinste DNA-Mengen dargestellt werden können. Des Weiteren sind die Ergebnisse dieser Methoden gut reproduzierbar, da es nur geringe Variationsbreiten gibt. Um eine relative Quantifizierung zu schaffen, wurden die real-time (RT)-PCR-Ergebnisse nach Pfaffl (2001) normalisiert.

Die Methode des Microarrays erfüllt durch ihre hohe Spezifität und Sensitivität weitere Erfolgskriterien für repräsentative Ergebnisse. So haben sich die Microarray-Methodik verschiedene Arbeitsgruppen zunutze gemacht, um verschieden oro-dentale Gewebe zu erforschen (Lallier und Spencer 2007; Han et al. 2002; Abiko et al. 2003; Bage et al. 2010). Bei dem für die Untersuchungen verwendeten GeneChip[®] Human Gene 1.0 ST Array handelt es sich um das neueste Produkt in der Familie von Affymetrix-Expressionsarrays.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Kollagen Typ I alpha 1

Bezüglich der Genexpression des Kollagen Typ I alpha 1 war bei der Microarray-Analyse die Expression beim chronisch erkrankten Parodont gegenüber dem gesunden Parodont erniedrigt. Auch bei der real-time (RT)-PCR war die Expression beim chronisch erkrankten Parodont gegenüber dem gesunden Parodont, bis auf eine Probe, erniedrigt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Proben verschiedenen Patienten entstammen und somit nicht immer die gleiche Expression der Gene bei allen Patienten zu finden ist. In der vorliegenden Untersuchung wurde nicht mit einbezogen, ob die Patienten Raucher oder Nichtraucher waren. Tabakprodukte hemmen das Attachement und das Wachstum von PDL-Fibroblasten (James et al. 1999).

Bisherige Studien zeigten einen Anstieg der MMPs bei der Parodontitis in der Gingiva (Ejeil et al. 2003). Kollagenasen, sowie eine Reihe von MMPs, spielen eine wichtige Rolle bei der Destruktion des Parodonts bei der Parodontitis (Sorsa et al. 2004). So wird Kollagen Typ I alpha 1 vor allem von den Kollagenasen und von den MT-MMPs abgebaut (Birkedal-Hansen et al. 1993; Nie et al. 2007)

Diskussion

6.2.2 Kollagen Typ IV alpha 1

Bei Kollagen Typ IV alpha 1 war der Expressionslevel sowohl bei der real-time (RT)-PCR, als auch beim Microarray bei allen Proben mit chronischer Parodontitis erniedrigt. Dies lässt sich durch die Erhöhung der MMPs bei der Parodontitis erklären (Müller 2006). So sind MMP-2 und MMP-9 erhöht, die Kollagen Typ IV alpha 1 abbauen (Birkedal-Hansen et al. 1993; Aimes und Quigley 1995).

6.2.3 alpha-2-Macroglobulin

Die Genexpression von alpha-2-Macroglobulin war sowohl bei den Untersuchungen mit der real-time (RT)-PCR als auch bei denen mittels Microarray bei den Proben mit chronischer Parodontitis gegenüber denen mit gesundem Parodont erniedrigt.

Bei alpha-2-Macroglobulin handelt es sich um einen Proteinaseinhibitor (Arnold et al. 2005), der die Aktivität von MT-MMPs inhibiert, welche die Kollagene der Typen I, II und III zersetzen, und proMMP-2 aktivieren (Visse und Nagase 2003; Nie et al. 2007). MMP-2 ist für den Abbau von Kollagen Typ IV verantwortlich (Aimes und Quigley 1995, Visse und Nagase 2003). Mangelt es an alpha-2-Macroglobulin kann es zu exzessiver parodontaler Destruktion kommen (Müller 2006). Die Veränderung der Expression von alpha-2-Macroglobulin decken sich mit den, in dieser Dissertation ermittelten, Verringerungen der Expression der Kollagene der Typen I und IV.

6.2.4 CD27

CD27 ist Teil der Tumor Necrosis Factor (TNF)-Rezeptor-Super-Familie und ist auf der Oberfläche von T-, B- und NK-Zellen exprimiert. Seine Signaltransduktion spielt eine entscheidene Rolle bei der T-Zell-T-Zell- und T-Zell-B-Zell-Interaktion. So fördert die Interaktion von CD27 mit seinem Liganden CD70 die Differenzierung von B-Gedächtniszellen zu Plasmazellen. Bei einer Überexpression von CD27 kommt es zur Aktivierung von NF-κB (Akiba et al. 1997; Nagumo et al. 1998; Clark et al. 2005). Die Signalübertragung der (TNF)-Rezeptor-Super-Familie erfolgt dabei über (TNF)-Rezeptor-assoziierte Faktoren (TRAF), welche verantwortlich für die Aktivierung von NF-κB sind (Nakano et al. 1996).

Die Genexpression von CD27 war sowohl bei der Microarray-Analyse als auch bei der real-

Diskussion

time (RT)-PCR beim chronisch erkrankten Parodont gegenüber dem gesunden Parodont erhöht. Durch diese verstärkte Expression von CD27 kommt es zur Aktivierung des ausschlaggebenden Regulators der Entzündungsdifferenzierung und der Immunantwort, dem nukleären Transkriptionsfaktor NF- κ B.

6.2.5 Hitzeschockprotein 90 kDa alpha class A member 1

In der inaktiven Form sind die Glukokortikoidrezeptoren an das Hitzeschockprotein 90 gebunden. Das Hitzeschockprotein 90 besteht aus zwei Proteinen ähnlicher Größe (dabei steht 90 für die Größe des Hitzeschockproteins von 90 kDa), welche einen Proteinkomplex bilden, der direkt an die Hormonbindungsdomäne des Glukokortikoidrezeptors bindet (Devlin 2006; Jakob und Buchner 1994; Segnitz und Gehring 1997). Die Dissoziation von Hitzeschockprotein 90 vom Glukortikoidrezeptor führt zu einem gleichzeitigen Verlust der zytosolischen Steroid-/ Glukokortikoid-Bindungs-Aktivität (Pratt und Toft 1997, Bresnick et al. 1989).

Glukokortikoide sind Steroidhormone, die anti-inflammatorisch wirken. So weisen Glukokortikoide zwei Mechanismen gegen Entzündungen auf. Erstens hemmen sie die Transkription von proinflammatorischen Genen, wie Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, durch Unterdrückung der transkriptionellen Aktivierung via NF- κ B. Zweitens induzieren sie Gene, wie z.B. I- κ B und Glukokortikoid-induzierten Leuzinzipper, die der entzündlichen Reaktion entgegenwirken (Luecke und Yamamoto 2005; Shipp et al. 2010).

Die Genexpression von Hitzeschockprotein 90 war sowohl bei der Microarray-Analyse als auch bei der real-time (RT)-PCR beim chronisch erkrankten Parodont gegenüber dem gesunden Parodont erniedrigt. Dieses Ergebnis bestätigt unsere erhöhte Messung von Entzündungsmarker-assoziierten Genen. Zu der Verringerung der Genexpression von Hitzeschockprotein 90 kann es gekommen sein, da im Rahmen der Parodontitisbehandlung lokale Glukokortikosteroide zur Schmerzlinderung bei der lokalen Taschenbehandlung angewendet werden (Müller 2006; Hellwig et al. 2009), die zu einer Dauerstimulation des Rezeptors geführt haben, wodurch, durch einen Rückgang der Hitzeschockprotein 90-Genexpression, das Ansprechverhalten des Glukokortikoidrezeptors herunterreguliert wurde.

Diskussion

6.2.6 Interleukin-28-Rezeptor alpha

Beim Interleukin-28-Rezeptor alpha war das Expressionslevel sowohl bei der real-time (RT)-PCR, als auch bei der Microarray-Analyse bei allen Proben mit chronischer Parodontitis erhöht.

Das Protein, das von diesem Gen kodiert wird, gehört zur Klasse II der Zytokin-Rezeptor-Familie und formt einen Komplex mit dem Interleukin-10-Rezeptor beta (Dumoutier et al. 2004; Uzé und Monneron 2007). Dieser Komplex interagiert mit Interleukin-28A, Interleukin-28B und Interleukin-29, welche bei viraler Infektion ausgeschüttet werden.

Die Expression von Interleukin-28-Rezeptor alpha ist bei den Zellen erhöht, die einem erhöhten Level von Interleukin-28A und Interleukin-29 ausgesetzt sind (Meager et al. 2005). Eine virale Infektion die mit der Parodontitis assoziiert ist, ist die Infektion mit Herpesviren (Imbronito et al. 2008). Herpesviren können durch ihr parodontopathogenes Potenzial Einfluss auf die Verringerung der körpereigenen Abwehrkräfte gegen subgingivale Kolonisation und Vermehrung von parodontalen Krankheitserregern nehmen (Contreras et al. 1999). So zeigt sich eine Beziehung zwischen *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, Epstein-Barr-Virus, Cytomegalovirus und chronischer Parodontitis. Diese Erreger spielen somit eine wichtige synergistische Rolle in der Pathogenese der chronischen Parodontitis (Chalabi et al. 2010; Kamma et al. 2001).

6.2.7 Phosphat regulierende Endopeptidase

Die Phosphat regulierende Endopeptidase gehört zur Familie der integralen zink-abhängigen Membran-Endopeptidasen (Campos et al. 2003). Die Hauptexpressionsgebiete der Phosphat regulierenden Endopeptidase sind die Knochen und die Zähne (Beck et al. 1997; Ruchon et al. 1998). *PheX* regelt die systemische Phosphathomöostase und Mineralisierung (Quarles 2003). TNF erniedrigt die Expression von *PheX*, dadurch dass NF- κ B mit zwei cis-Elementen des *PheX*-Promoters interagiert. Dies führt zusammen mit Osteoklasten zu einem Verlust an Knochenmasse und Dichte bei chronisch entzündlichen Erkrankungen (Majewski et al. 2010), wie es im Verlauf der chronischen Parodontitis zu beobachten ist (Müller 2006).

Bei der Phosphat regulierenden Endopeptidase war die Genexpression sowohl bei der Microarray-Analyse als auch bei der real-time (RT)-PCR beim chronisch erkrankten Parodont gegenüber dem gesunden Parodont erniedrigt.

Dies deckt sich mit der erhöhten Menge an CD27, wodurch es zu einer NF- κ B-Aktivierung kommt und dieser die Expression durch Interaktion mit dem *PheX*-Promoter erniedrigt.

Diskussion

6.3 Bezug zu vergleichbaren Dissertationen

Diese Dissertation kann bezüglich der Ergebnisse nur bedingt mit denen voriger Dissertationen verglichen werden. Bei den vorangegangenen, durch unsere Forschungsgruppe angefertigten Arbeiten zu diesem Thema (vom Orde 2008; vom Orde 2011; Szydlik 2009), diente der P-Wert nicht als Parameter zur Auswahl der Gene, wodurch eine größere Anzahl von falsch-positiven Messungen bei diesen Arbeiten möglich sein könnte. Desweiteren wurden bei dieser Dissertation die Gene zunächst anhand der einzelnen Proben untersucht und nicht zu Gruppenpools von parodontitischem PDL und gesundem PDL zusammengefasst. Dadurch konnten die einzelnen Varianzen zwischen den Patienten erfasst werden. Es handelt sich bei dieser Dissertation, wie auch bei den anderen beiden Arbeiten, um Experimente mit Patientenproben, die unterschiedliche Gene aufweisen, die von Patient zu Patient auch unterschiedlich stark reguliert sein können. Außerdem lag die Parodontitis bei den verschiedenen Patienten in unterschiedlich stark ausgeprägten Formen und Stadien vor, die zum Teil unterschiedlich behandelt wurden. Diese Parameter wurden aber in keiner Dissertation erfasst, sodass sich Vergleiche schlecht ziehen lassen können.

Die einzigen beiden Gene, die sowohl in der Dissertation „Vergleichende Genexpressionsanalysen von Komponenten der extrazellulären Matrix im parodontal gesunden Gewebe und bei chronischer Parodontitis in vivo“ (Szydlik 2009) als auch in dieser Dissertation untersucht worden sind, sind die Gene Kollagen Typ I alpha 1 und Kollagen Typ IV alpha 1. Hierbei stellten sich jedoch genau gegensätzliche Ergebnisse heraus. So sind Kollagen Typ I alpha 1 und Kollagen Typ IV alpha 1 in dieser Dissertation beide bei der Parodontitis herunterreguliert, während diese in der anderen Arbeit beide hochreguliert sind. Die hier beschriebene verringerte Genexpression von Kollagen Typ I alpha 1 und Kollagen Typ IV alpha 1 ist jedoch schlüssiger, da es bei der Parodontitis zu Zahnlockerungen aufgrund des Rückgangs des Faserapparates kommt.

Die in dem Binde- und Stützgewebe unter der Basalmembran vorkommenden Kollagenfasern sind vom Typ I und III (Everts et al. 1998). Sie setzen in der Basalmembran an (Hellwig et al. 2009). Eine der wichtigsten Komponenten der Basalmembran stellt Kollagen Typ IV dar (Leitinger und Hohenester 2007; van der Rest und Garrone 1991).

Diskussion

6.4 Ausblick

Die in dieser Dissertation gewonnenen Ergebnisse über die Genexpressionsschwankungen zwischen gesundem und entzündetem Parodont vermitteln einen Einblick, welche Gene an der Wechselbeziehung zwischen extrazellulären Matrix-Proteinen und Komponenten des Entzündungsgeschehens beteiligt sein könnten. Es wird ersichtlich, dass die Proteine der extrazellulären Matrix einen Einfluss auf die chronische Parodontitis haben, sowie von der chronischen Parodontitis beeinflusst werden. Dies könnte in Zukunft dazu führen, dass Therapiemittel entwickelt werden, die aus extrazellulären Matrix-Proteinen bestehen, welche die Destruktion des Parodonts reduzieren oder gar stoppen können.

6.5 alpha-2-Macroglobulin als möglicher Therapieansatz bei der Parodontitis

Das Ziel der Parodontaltherapie ist die Regeneration parodontaler Strukturen, welche durch die chronische Parodontitis zerstört wurden. Die systematische Parodontalbehandlung gliedert sich in mehrere Phasen, wobei die mechanische Reinigung der Zahn- und Wurzeloberfläche (Scaling) und die damit verbundene Plaqueentfernung die wichtigste ist (Hellwig et al. 2009). Neben der lokalen Glukokortikosteroidgabe zur Schmerzlinderung bei der lokalen Taschenbehandlung und der Gabe von Antibiotika gibt es noch keine Medikamente gegen die Parodontitis bzw. ihre Destruktion. Ein möglicher Therapieansatz wäre die Behandlung der Parodontitis mit alpha-2-Macroglobulin. So lässt sich im Bereich der Rotatorenmanschette bei Patienten, die mit alpha-2-Macroglobulin behandelt wurden, eine verbesserte Knochen- und Sehnenheilung feststellen (Bedi et al. 2010).

Die Regenerationswirkung bzw. die Destruktionshemmung von alpha-2-Macroglobulin auf das Parodont gilt es in weiteren Untersuchungen genauer zu erforschen.

Zusammenfassung

7. Zusammenfassung

Diese Dissertation befasst sich mit den verschiedenen Genexpressionsmustern von gesundem und chronisch erkranktem PDL mithilfe der Microarray-Analyse und der real-time (RT)-PCR. Die in dieser Dissertation untersuchten Gene wurden ausgewählt, da sie die am deutlichsten regulierten Gene des Microarrays waren, bei denen der P-Wert nicht über 0,05 lag.

Die Genexpressionsanalyse zeigte eine Hochregulation der Gene CD27 und Interleukin-28-Rezeptor alpha und eine Herunterregulation der Gene Kollagen Typ I alpha 1, Kollagen Typ IV alpha 1, alpha-2-Macroglobulin, Hitzeschockprotein 90 und Phosphat regulierende Endopeptidase beim chronisch erkrankten Parodont gegenüber dem gesunden Parodont. Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, dass die Proteine der extrazellulären Matrix einen Einfluss auf die chronische Parodontitis haben, sowie von der chronischen Parodontitis beeinflusst werden. Die in dieser Dissertation ermittelten Ergebnisse könnten einen Ansatzpunkt für weitere pathogenetische Erkenntnisse der chronischen Parodontitis liefern. Außerdem könnten die Ergebnisse auch die Diskussion um neue Medikamente zur Parodontitistherapie voranbringen.

Literaturverzeichnis

8. Literaturverzeichnis

Abiko Y, Hiratsuka K, Kiyama-Kishikawa M, Tsushima K, Ohta M, Sasahara H (2004): Profiling of differentially expressed genes in human gingival epithelial cells and fibroblasts by DNA microarray. *J Oral Sci* 46(1), 19-24

Aimes RT, Quigley JP (1995): Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem* 270(11), 5872-6

Akiba H, Nakano H, Nishinaka S, Shindo M, Kobata T, Atsuta M, Morimoto C, Ware CF, Malinin NL, Wallach D (1998): CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF-kappaB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kappaB-inducing kinase. *J Biol Chem* 273(21), 13353-8

Armitage GC (2003): Diagnosis of periodontal diseases. *J Periodontol* 74(8), 1237-47

Arnold JN, Wallis R, Willis AC, Harvey DJ, Royle L, Dwek RA, Rudd PM, Sim RB (2006): Interaction of mannan binding lectin with alpha2 macroglobulin via exposed oligomannose glycans: a conserved feature of the thiol ester protein family? *J Biol Chem* 281(11), 6955-63

Bage T, Lindberg J, Lundeberg J, Modeer T, Yucel-Lindberg T, 2010, Signal pathways JNK and NF-kappaB, identified by global gene expression profiling, are involved in regulation of TNFalpha-induced mPGES-1 and COX-2 expression in gingival fibroblasts. *BMC Genomics* 11, 241

Beck L, Soumounou Y, Martel J, Krishnamurthy G, Gauthier C, Goodyer CG, Tenenhouse HS (1997): Pex/PEX tissue distribution and evidence for a deletion in the 3' region of the Pex gene in X-linked hypophosphatemic mice. *J Clin Invest* 99(6), 1200-9

Literaturverzeichnis

Becktor KB, Nolting D, Becktor JP, Kjaer I (2007): Immunohistochemical localization of epithelial rests of Malassez in human periodontal membrane. *Eur J Orthod* 29(4), 350-3

Bedi A, Kovacevic D, Hettrich C, Gulotta LV, Ehteshami JR, Warren RF ,Rodeo SA The effect of matrix metalloproteinase inhibition on tendon-to-bone healing in a rotator cuff repair model. *J Shoulder Elbow Surg* 19(3), 384-91

Benjamini Y, Hochberg Y: Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society B* 1995, 57:289–300

Benninghoff, Drenckhahn D: Anatomie, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Band 1, 17. Auflage Urban & Fischer, München 2008

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A ,Engler JA (1993): Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4(2), 197-250

Bresnick EH, Dalman FC, Sanchez ER ,Pratt WB (1989): Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 264(9), 4992-7

Bundeszahnärztekammer, Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde: Patienteninformation 4.01. Parodontalbehandlung, Stand 3/2007, <http://www.bzaek.de/>

Butler WT, Birkedal-Hansen H, Beegle WF, Taylor RE, Chung E (1975): Proteins of the periodontium. Identification of collagens with the [alpha1(I)]2alpha2 and [alpha1(III)]3 structures in bovine periodontal ligament. *J Biol Chem* 250(23), 8907-12

Literaturverzeichnis

Campos M, Couture C, Hirata IY, Juliano MA, Loisel TP, Crine P, Juliano L, Boileau G, Carmona AK (2003): Human recombinant endopeptidase PHEX has a strict S1' specificity for acidic residues and cleaves peptides derived from fibroblast growth factor-23 and matrix extracellular phosphoglycoprotein. *Biochem J* 373(Pt 1), 271-9

Chalabi M, Rezaie F, Moghim S, Mogharehabet A, Rezaei M, Mehraban B Periodontopathic bacteria and herpesviruses in chronic periodontitis. *Mol Oral Microbiol* 25(3), 236-40

Clark J, Vagenas P, Panesar M, Cope AP (2005): What does tumour necrosis factor excess do to the immune system long term? *Ann Rheum Dis* 64 Suppl 4, iv70-6

Contreras A, Umeda M, Chen C, Bakker I, Morrison JL, Slots J (1999): Relationship between herpesviruses and adult periodontitis and periodontopathic bacteria. *J Periodontol* 70(5), 478-84

Devlin TM: Textbook of Biochemistry with clinical correlations, 6th Edition, Wiley-Liss., Hoboken, NJ 2006

Duan Y, Fisher E, Malamud D, Golub E, Demuth DR (1994): Calcium-binding properties of SSP-5, the *Streptococcus gordonii* M5 receptor for salivary agglutinin. *Infect Immun* 62(12), 5220-6

Dumoutier L, Tounsi A, Michiels T, Sommereyns C, Kotenko SV, Renauld JC (2004): Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling. *J Biol Chem* 279(31), 32269-74

Literaturverzeichnis

Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G, Gogly B (2003): Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva. *J Periodontol* 74(2), 188-95

Everts V, Niehof A, Jansen D, Beertsen W (1998): Type VI collagen is associated with microfibrils and oxytalan fibers in the extracellular matrix of periodontium, mesenterium and periosteum. *J Periodontal Res* 33(2), 118-25

Gautier L, Cope L, Milo Bolstad B, Irizarry RA. affy - an R package for the analysis of affymetrix genechip data at the probe level. *Bioinformatics*, 2003. In press

Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ (2002): Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med* 13(1), 17-34

Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J (2004): Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5(10), R80

Han X, Bolcato AL, Amar S (2002): Identification of genes differentially expressed in cultured human osteoblasts versus human fibroblasts by DNA microarray analysis. *Connect Tissue Res* 43(1), 63-75

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L (2007): The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 65(1), 1-13

Hellwig E, Klimek J, Attin T: Einführung in die Zahnerhaltung, 5. Überarbeitet und erweiterte Auflage Deutscher Zahnärzterverlag, Köln 2009

Literaturverzeichnis

Hintzen RQ, de Jong R, Lens SM, van Lier RA (1994): CD27: marker and mediator of T-cell activation? *Immunol Today* 15(7), 307-11

Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP (2003): Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4(2), 249-64

Imbronito AV, Okuda OS, Maria de Freitas N, Moreira Lotufo RF, Nunes FD (2008): Detection of herpesviruses and periodontal pathogens in subgingival plaque of patients with chronic periodontitis, generalized aggressive periodontitis, or gingivitis. *J Periodontol* 79(12), 2313-21

Jakob U, Buchner J (1994): Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends Biochem Sci* 19(5), 205-11

James JA, Sayers NM, Drucker DB, Hull PS (1999): Effects of tobacco products on the attachment and growth of periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 70(5), 518-25

Jensen PE, Humle Jorgensen S, Datta P, Sorensen PS (2004): Significantly increased fractions of transformed to total alpha2-macroglobulin concentrations in plasma from patients with multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1690(3), 203-7

Kamma JJ, Contreras A, Slots J (2001): Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 28(9), 879-85

Lallier TE, Spencer A (2007): Use of microarrays to find novel regulators of periodontal ligament fibroblast differentiation. *Cell Tissue Res* 327(1), 93-109

Literaturverzeichnis

Lehmann KM, Hellwig E: Zahnärztliche Propädeutik, 10. Auflage Urban & Fischer, München 2005

Leitinger B, Hohenester E (2007): Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol* 26(3), 146-55

Luecke HF, Yamamoto KR (2005): The glucocorticoid receptor blocks P-TEFb recruitment by NFkappaB to effect promoter-specific transcriptional repression. *Genes Dev* 19(9), 1116-27

Majewski PM, Thurston RD, Ramalingam R, Kiela PR, Ghishan FK Cooperative role of NF- κ B and poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in the TNF-induced inhibition of PHEX expression in osteoblasts. *J Biol Chem* 285(45), 34828-38

Meager A, Visvalingam K, Dilger P, Bryan D, Wadhwa M (2005): Biological activity of interleukins-28 and -29: comparison with type I interferons. *Cytokine* 31(2), 109-18

Melcher AH, Chan J (1981): Phagocytosis and digestion of collagen by gingival fibroblasts in vivo: a study of serial sections. *J Ultrastruct Res* 77(1), 1-36

Müller H: Parodontologie, 2. Aktualisierte und erweiterte Auflage Thieme Verlag, Stuttgart 2006

Nagumo H, Agematsu K, Shinozaki K, Hokibara S, Ito S, Takamoto M, Nikaido T, Yasui K, Uehara Y, Yachie A (1998): CD27/CD70 interaction augments IgE secretion by promoting the differentiation of memory B cells into plasma cells. *J Immunol* 161(12), 6496-502

Literaturverzeichnis

Nakano H, Oshima H, Chung W, Williams-Abbott L, Ware CF, Yagita H ,Okumura K (1996): TRAF5, an activator of NF-kappaB and putative signal transducer for the lymphotoxin-beta receptor. *J Biol Chem* 271(25), 14661-4

Nie J, Pei J, Blumenthal M ,Pei D (2007): Complete restoration of cell surface activity of transmembrane-truncated MT1-MMP by a glycosylphosphatidylinositol anchor. Implications for MT1-MMP-mediated prommp2 activation and collagenolysis in three-dimensions. *J Biol Chem* 282(9), 6438-43

Page RC, Schroeder HE (1976): Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* 34(3), 235-49

Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ ,Kornman KS (1997): Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000* 14, 216-48

Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9), e45

Preshaw PM, Seymour RA ,Heasman PA (2004): Current concepts in periodontal pathogenesis. *Dent Update* 31(10), 570-2, 574-8

Pratt WB ,Toft DO (1997): Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18(3), 306-60

Quarles LD (2003): FGF23, PHEX, and MEPE regulation of phosphate homeostasis and skeletal mineralization. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(1), E1-9

Literaturverzeichnis

Rateitschak KH, Rateitschak EM, Wolf HF: Parodontologie, 1. Auflage Thieme Verlag, Stuttgart 1984

Reynolds JJ, Meikle MC (1997): Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontol* 2000 14, 144-57

Ruchon AF, Marcinkiewicz M, Siegfried G, Tenenhouse HS, DesGroseillers L, Crine P, Boileau G (1998): Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts. *J Histochem Cytochem* 46(4), 459-68

Schuerer-Maly CC, Eckmann L, Kagnoff MF, Falco MT, Maly FE (1994): Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Immunology* 81(1), 85-91

Schünke M, Schult E, Schumacher U, Voll M, Wesker K: Prometheus LernAtlas der Anatomie, 1. Auflage Thieme Verlag, Stuttgart 2006

Segnitz B, Gehring U (1997): The function of steroid hormone receptors is inhibited by the hsp90-specific compound geldanamycin. *J Biol Chem* 272(30), 18694-701

Shipp LE, Lee JV, Yu CY, Pufall M, Zhang P, Scott DK, Wang JC: Transcriptional regulation of human dual specificity protein phosphatase 1 (DUSP1) gene by glucocorticoids. *PLoS One* 5(10), e13754

Smyth GK (2004): Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3, Article3

Literaturverzeichnis

Sorsa T, Tjaderhane L ,Salo T (2004): Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. Oral Dis 10(6), 311-8

Szydlík S (2009): Vergleichende Genexpressionsanalysen von Komponenten der extrazellulären Matrix im parodontal gesunden Gewebe und bei der chronischen Parodontitis in vivo.

Uze G, Monneron D (2007): IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family. Biochimie 89(6-7), 729-34

van der Rest M ,Garrone R (1991): Collagen family of proteins. FASEB J 5(13), 2814-23

Visse R, Nagase H (2003): Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res 92(8), 827-39

vom Orde F (2008): Vergleichende Genexpressionsanalysen von Komponenten der extrazellulären Matrix bei der Periimplantitis und Parodontitis in vivo.

vom Orde F (2011): Vergleichende Genexpressionsanalysen von Komponenten der extrazellulären Matrix bei der Periimplantitis und Parodontitis in vivo. Deutscher Ärzte-Verlag zzi Z Zahnärztl Impl 2011; 27 (1)

Welsch U: Lehrbuch Histologie, 1. Auflage Urban & Fischer, München 2003

Whittaker CJ, Klier CM ,Kolenbrander PE (1996): Mechanisms of adhesion by oral bacteria. Annu Rev Microbiol 50, 513-52

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Universitätsklinikum Göttingen in der Abteilung Prothetik in der AG orale Biologie und Geweberegeneration unter der Leitung von Prof. Dr. Nicolai Miosge angefertigt. Ihm gilt auch mein besonderer und herzlicher Dank für seine stete Unterstützung in den letzten Jahren. Außerdem möchte ich mich dafür bedanken, die Möglichkeit bekommen zu haben, an diesem interessanten Thema forschen zu dürfen.

Herrn Boris Schminke danke ich ganz besonders für seine Hilfsbereitschaft und seine Unterstützung bei der Anfertigung der Dissertation.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich außerdem den wissenschaftlichen Mitarbeitern und Mitdoktoranden der Forschungsgruppe AG orale Biologie und Geweberegeneration sagen.

Desweiteren gilt mein Dank dem Transkriptomanalyselabor des Zentrums Biochemie & Molekulare Zellbiologie der Universität Göttingen und seinen Mitarbeitern für die Durchführung des Microarrays.

Curriculum vitae

Ich wurde am 16. Mai 1986 als ältester Sohn meiner Eltern Sabine Goosmann-Stein und Dr. Hans-Ulrich Stein in Lüneburg geboren. Meine Eltern sind beide Zahnärzte. Von 1992 bis 1996 besuchte ich die Grundschule Deutsch Evern. Während der fünften und sechsten Klasse besuchte ich von 1996 bis 1998 die Orientierungsstufe Embsen. Ab der siebten Klasse besuchte ich das Gymnasium Oedeme in Lüneburg, wo ich am 1. Juli 2005 mit dem Abitur die allgemeine Hochschulreife erwarb.

Nach einem Semester Zahnmedizin 2005 an der Medizinischen Universität Graz nahm ich 2006 mein Studium der Zahnmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen auf. Dort legte ich am 9. Februar 2007 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 30. März 2009 die zahnärztliche Vorprüfung ab.

Die experimentellen Arbeiten zu dieser Promotion fertigte ich in der Zeit vom August 2008 bis Oktober 2010 in der Abteilung Prothetik der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen an.