

Int Poster J Dent Oral Med 2009, Vol 11 No 2, Poster 443

Der -94 ins/delATTG Promotor-polymorphismus im Transkriptionsfaktor NF- κ B bei Patienten mit aggressiver oder chronischer Parodontitis

Sprache: Deutsch

Autoren:

Lisa Hierse, Dr. Susanne Schulz, Dr. Jana Klapproth, Dr. Uta Zimmermann, Prof. Dr. Hans-Günter Schaller, Dr. Stefan Reichert, Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Dr. Christiane Gläser, Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Datum/Veranstaltung/Ort:

26.-27.09.2008
 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie
 Nürnberg

Einleitung

Bedeutung von genetischen Varianten im NF- κ B

Bei der Entstehung und dem Verlauf von Parodontitiden spielt die individuelle Regulation der Immunantwort eine wichtige Rolle. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert dabei u.a. die Expression inflammatorischer Kandidatengene. Es konnte gezeigt werden, dass genetische Varianten im NF- κ B, wie z.B. der Promotorpolymorphismus -94 ins/delATTG, die Expression des Transkriptionsfaktors beeinflussen können. Es ist zu vermuten, dass der genetischen Konstellation eine entscheidende Bedeutung bei der Regulation der Immunantwort auf parodontopathogene Keime zukommt.

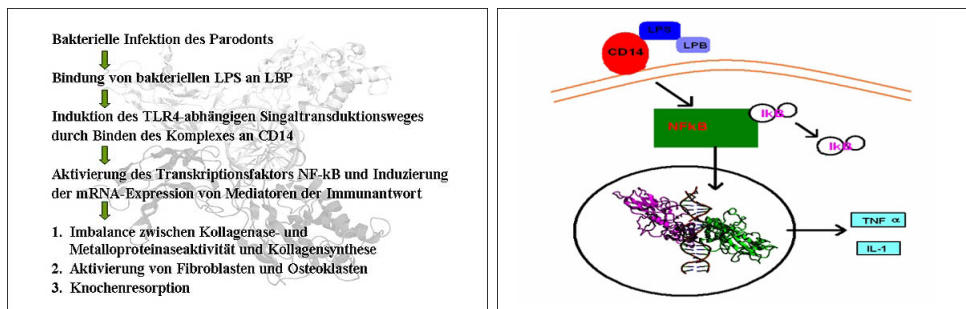


Abb. 1-2: NF- κ B und Parodontitis

Problemstellung

Ziel dieser klinischen Studie war es zu untersuchen, ob das Risiko für eine chronische und/oder aggressive Parodontitis sowie für die Besiedlung mit parodontopathogenen Markerkeimen durch den Promotorpolymorphismus -94 ins/delATTG beeinflusst wird.

Material und Methoden

Einschlusskriterien für Probanden:

Generalisierte aggressive Parodontitis (AP):

- Erkrankungsbeginn vor dem 35. Lebensjahr
- Attachmentverlust > 4mm an mindestens 30% der Zähne
- mindestens 3 betroffenen Zähne waren keine Inzisivi oder erste Molaren
- Missverhältnis zwischen Menge mineralisierter Plaque und Attachmentverlust

Generalisierte chronische Parodontitis (CP):

- Attachmentverlust > 4mm an mindestens 30% der Zähne
- Attachmentverlust konsistent zur Akkumulation mineralisierter Plaque

Kontrollprobanden ohne Parodontitis:

- Sondiertiefe < 3.5mm
- Kein Attachmentverlust durch Parodontitis (Ausnahmen: Pseudotaschen, überkonturierte Restaurationen)

Genomische Untersuchungen:

DNA-Isolation

Die DNA-Präparation der genomischen DNA aus humanem venösen EDTA-Blut erfolgte mittels "blood extraction kit" (Qiagen, Hilden). 200µl EDTA-Blut wurden zur Zellyse mit 20 µl Protease versetzt. Nach der Zugabe von 200 µl Lysispuffer AL wurde die Probe 15 sec gevortext und für 10 min bei 56°C inkubiert. 200 µl Ethanol wurde zugegeben, der Ansatz gevortext und auf eine Säule (QIAamp Spin Column) gegeben. Nach 2maligem Waschen (Puffer AW1 und AW2) der an die Säule gebundenen DNA wurde die DNA durch Zentrifugation getrocknet. Die DNA wurde mit 200µl aqua dest. 5min inkubiert und von der Säule gelöst.

PCR

PCR-Ansatz (25µl)		PCR-Programm (Eppendorf Mastercycler Gradient)	
12.5µl	Master-Mix (Promega)	95°C 2min	92°C 30sec I
0.3µl	Primer (5' tgg acc gca tga ctc tat ca 3')	92°C 30sec I	50°C 30sec I 31 Zyklen
0.3µl	Primer (5' gaa tcc caa ggg ctg ga 3')	55°C 30sec I 12 Zyklen	72°C 30sec I
0.25µl	Formamid	72°C 30sec I	72°C 5min
10.65µl	Wasser		10°C hold
+1µl genomische DNA			

Auftrennung der PCR-Produkte im 10% Polyacrylamidgel (19:1)

Gellauf: 80min, 900V, 50mA, 30W (PAA-Gelelektrophoresekammer, LKB Bromma)

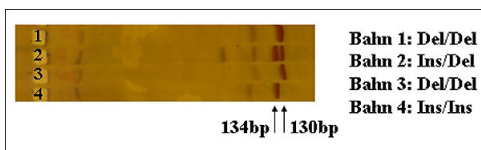


Abb. 3: Genotypisierung des NF-κB Polymorphismus -94ins/delATTG nach PAA-Gelaufreinigung

Silberfärbung des PAA-Gels

10min	Fixierlösung	50% Methanol, 10% Essigsäure
2x5min	Waschlösung	10% Ethanol, 0.5% Essigsäure
10min	Färbelösung	0.1% (w/v) Silbernitrat
5-20min	Entwicklerlösung	1,5 % NaOH, 0,01 % NaBH ₄ , 0,15 % Formaldehyd (je nach Schwärzung der Banden)
20min	Stopplösung	0,75% (w/v) Na ₂ CO ₃
20min	Glyzerinlösung	10% Glyzerin

mit einer speziellen, luftdurchlässigen Folie überzogen und getrocknet

Subgingivale Bestimmung von 5 Markerkeimen:

Die Plaqueproben wurden mit sterilen Papierspitzen aus der tiefsten Tasche jedes Quadranten entnommen

und gepoolt.

Die bakterielle DNA wurde mittels QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen, Hilden) isoliert.

Die Papierspitzen wurden mit 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K für 10min bei 70°C inkubiert.

200 µl Lysispuffer AI wurde hinzugegeben und 5min bei 95°C inkubiert.

Der Ansatz (ohne Filterspitzen) wurde auf eine Säule (QIAamp Spin Column) pipettiert und 2 mal mit Puffer AW 1 und AW 2 gewaschen.

Die DNA wurde in 400µl AE-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

PCR

Für die spezifische Amplifikation von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi), *Tannerella forsythensis* (Tf) und *Treponema denticola* (Td) wurde der micro-Ident® test von HAIN-Diagnostik (Lifesience, Nehren) benutzt. Mastermix (Puffer, biotinylierte Primer, DNA als Positivkontrolle), 2U Taq-Polymerase (Eppendorf, Hamburg), und 5 µl der isolierten bakteriellen DNA wurden gemixt.

PCR: 5 min 95°C; 10 Zyklen: 30 sec 95°C, 2 min 58°C; 20 Zyklen: 25 sec 95°C, 40 sec 53°C, 40 sec 70°C; 8 min 70°C

Die PCR-Produkte wurden im ethidiumbromidhaltigen 1%igen Agarosegel aufgetrennt.

Hybridisierung

20 µl des PCR-Produkts und 20 µl der Denaturierungslösung wurden für 5 min inkubiert.

1 ml Hybridisierungspuffer (vorgewärmt auf 45°C) wurde dazugegeben

Gabe dieser Lösung zur Membran, vorhybridisiert mit bakterieller DNA und Positivkontrollen.

Inkubation bei 45°C für 30 min im Schüttelwasserbad.

Membran wurde mit 1 ml "stringent wash solution" bei 45°C für 15 min gewaschen.

1 ml der Konjugatlösung wurde hinzugegeben (Raumtemp., 30 min).

Waschen der Membran und Inkubation mit 1 ml der Substratlösung.

Nachweis der Bakterien erfolgte visuell (Farbreaktion mittels Alkalischer Phosphatase).

2 Positivkontrollen [PCR (AC) und Hybridisierung (CC)] sind im Test enthalten.

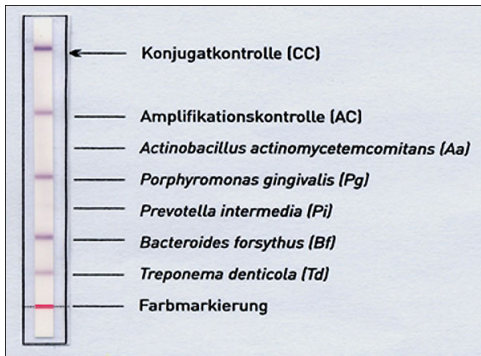


Abb 4: Subgingivale Bestimmung von 5 Leitkeimen

Ergebnisse

Klinische und demographische Charakterisierung der Probandengruppen:

	Chronische Parodontitis	Aggressive parodontitis	Gesunde Probanden	p-Werte vs. Gesunde	
	n=59	n=73	n=75	CP	AP
Alter (Jahre ± SD)	48.8 ± 9.8	41 ± 9.8	46.3 ± 10.6	n.s.	n.s.
Geschlecht (% Männer)	33.9	37	46.7	n.s.	n.s.
Raucher (%)	33.9	45.2	33.3	n.s.	n.s.
Approximaler Plaqueindex (%)	60.2 ± 25.8	53.1 ± 29	45.9 ± 20.2	0.001	n.s.
Blutung nach Sondierung (%)	69.5 ± 25	79.1 ± 22.4	45.8 ± 23.5	< 0.001	< 0.001
Mittelwert der Sondiertiefen (mm ± SD)	5.2 ± 1.2	5.7 ± 1.4	2.6 ± 0.8	< 0.001	< 0.001
Mittelwert der Sondiertiefen an den mikrobiologischen Teststellen (mm ± SD)	6.9 ± 1.5	7.4 ± 1.6	3.1 ± 0.4	< 0.001	< 0.001
Mittelwert Attachmentverlust (mm ± SD)	5.9 ± 1.4	6.5 ± 1.5	3 ± 0.9	< 0.001	< 0.001
Mittelwert Attachmentverlust an den mikrobiologischen Teststellen (mm ± SD)	7.6 ± 1.8	8.4 ± 1.8	3.3 ± 0.5	< 0.001	< 0.001

Tab. 3: Klinische und demographische Charakterisierung

Keine signifikanten Unterschiede bezüglich Geschlecht und Raucherstatus (Patienten vs. Gesunde). Gesunde Kontrollen waren signifikant älter als Patienten mit AP. Wie erwartet zeigen beide Patientengruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe schwerere klinische Symptome.

Mikrobiologische Untersuchung:

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (%)	30.5	39.7	21.3	n.s.	0.015
Porphyromonas gingivalis (%)	88.1	79.5	24	< 0.001	< 0.001
Prevotella intermedia (%)	62.7	65.8	30.7	< 0.001	< 0.001
Tannerella forsythensis (%)	96.6	87.7	68	< 0.001	0.004
Treponema denticola (%)	98.3	87.7	65	< 0.001	0.001

Tab. 4: Mikrobiologische Untersuchung

Wie erwartet besitzen Patienten mit Parodontitis eine höhere subgingivale Belastung mit parodontopathogenen Keimen. Aber: Nachweis von Tf und Td in über 50% der Kontrollprobanden + fehlende Signifikanz im Nachweis von Aa bei CP. Hinweis auf weitere regulierende, z.B. genetische Faktoren

Genetische Untersuchungen:

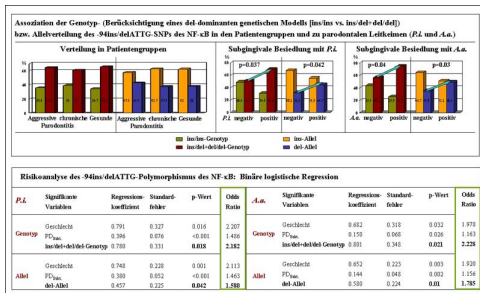


Abb 5: Genetische Untersuchungen

Assoziation der Genotyp- (Berücksichtigung eines del-dominanten genetischen Modells [ins/ins vs. ins/del+del/del]) bzw. Allelverteilung des -94ins/delATTG-SNPs des NF-κB in den Patientengruppen und zu parodontalen Leitkeimen (P.i. und A.a.)

Mittels binärer logistischer Regression konnte bei Berücksichtigung der Kofaktoren Alter, Geschlecht, Raucherstatus und Sondiertiefe an den mikrobiologischen Entnahmestellen sowohl die del-tragenden Genotypen als auch das del-Allel als unabhängige Risikofaktoren für die subgingivale Keimbesiedlung mit P.i. und A.a. bestätigt werden.

Schlußfolgerungen

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Träger der del-Genotypen bzw. des del-Allels ein höheres Risiko für eine subgingivale Keimbelastung mit P.i. und A.a. aufweisen. Ursache dafür könnte eine del-assoziierte verringerte Promotoraktivität sein, die die NF-κB regulierte Immunantwort beeinträchtigt.

Dieses Poster wurde übermittelt von [Lisa Hierse](#).

Korrespondenz-Adresse:

[Lisa Hierse](#)
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie
 Harz 42a
 06108 Halle

