

Immunregulation bei aggressiver Parodontitis im Vergleich mit moderater chronischer Parodontitis und gesundem Parodontium

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med. dent.
an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von:
Jana Schmidt
geboren am 26.09.1985 in Magdeburg

angefertigt am Institut für Klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät der
Universität Leipzig

Betreuer: Herr Professor Dr. med. Ulrich Sack

Mitbetreuer: Herr Professor Dr. med. Dr. h. c. Holger Jentsch
Leiter des Funktionsbereiches Parodontologie der Poliklinik für
Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 26.03.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Bibliografische Beschreibung	3
Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
1. Einführung	7
1.1. Parodontitis	8
1.1.1. Klinische Differenzierung zwischen Aggressiver und Chronischer Parodontitis	8
1.1.2. Bakterielle Mikroorganismen und Parodontalerkrankungen	10
1.2. Die Rolle des Immunsystems	13
1.2.1. Allgemeine Aspekte der angeborenen Immunität	14
1.2.2. Allgemeine Aspekte der adaptiven Immunität	17
1.2.3. Immunpathogenese der Parodontitis	21
1.2.4. Immunologische Unterschiede zwischen aggressiven und chronischen Parodontitiden	24
2. Ziel der Untersuchung	30
3. Material und Methoden	31
3.1. Patienten	31
3.2. Materialien und Geräte	33
3.2.1. Blutentnahmen	33
3.2.2. Lymphozytenpräparation	33
3.2.3. Einfrieren und Auftauen der PBMCs	34
3.2.4. Durchflusszytometrie	34
3.2.4.1. <i>Bestimmung der intrazellulären Zytokine</i>	34
3.2.4.2. <i>CVID-Panel</i>	35
3.2.5. ELISpot-Assay	36
3.2.6. Mikrobiologische Diagnostik	37
3.2.6.1. <i>Kultur</i>	37
3.2.6.2. <i>Sequenzierung mit eubakteriellen Primern</i>	38
3.3. Methoden	39

3.3.1. Zellbearbeitung	39
3.3.1.1. <i>Lymphozytenpräparation</i>	39
3.3.1.2. <i>Kryokonservierung</i>	39
3.3.1.3. <i>Auftauen der kryokonservierten PBMCs</i>	40
3.3.2. Durchflusszytometrie.....	40
3.3.2.1. <i>Bestimmung der intrazellulären Zytokine</i>	41
3.3.2.2. <i>CVID-Panel</i>	41
3.3.3. ELISpot-Assay	43
3.3.4. Mikrobiologische Diagnostik.....	45
3.3.4.1. <i>Kultur</i>	46
3.3.4.2. <i>Sequenzierung mit eubakteriellen Primern</i>	47
3.4. Auswertung und Statistik.....	48
4. Ergebnisse	49
4.1. Deskriptive Statistik der klinischen Charakteristika	49
4.2. Immunologische Befunde in Bezug zur klinischen Zuordnung.....	51
4.2.1. <i>Intrazelluläre Zytokinproduktion in PBMCs (IL-4, IL-17, IFN-γ)</i>	51
4.2.2. <i>CVID-Panel</i>	53
4.2.3. <i>ELISpot-Assay</i>	55
4.3. Mikrobiologische Befunde in Bezug zur klinischen Zuordnung	58
4.4. Bezug mikrobiologische und immunologische Befunde	61
5. Diskussion	65
5.1. Angeborene Immunität und Parodontitis (IL-1 β und IL-8)	66
5.2. Adaptive Immunität und Parodontitis	71
5.3. Mikrobiologie und Parodontitis	74
5.4. Methodenkritik.....	77
5.5. Weiterführende Überlegungen	80
6. Zusammenfassung	83
7. Literaturverzeichnis	86
Anlagenverzeichnis	100
Anlagen	101
Selbstständigkeitserklärung	110
Lebenslauf	111
Danksagung	112

Bibliografische Beschreibung

Schmidt, Jana

Immunregulation bei aggressiver Parodontitis im Vergleich mit moderater chronischer Parodontitis und gesundem Parodontium

Universität Leipzig, Dissertation

112 Seiten, 197 Literaturangaben, 6 Tabellen, 11 Abbildungen, 7 Anlagen

Referat:

Es ist davon auszugehen, dass Fehlfunktionen im Immunsystem mit der Ausprägung des Krankheitsbildes der aggressiven Parodontitis im Zusammenhang stehen. In dieser Arbeit sollen anhand klinischer, immunologischer und mikrobiologischer Untersuchungen ein immunologisches Risikoprofil bei Patienten mit aggressiver Parodontitis erschlossen, gegebenenfalls Unterschiede zur moderaten chronischen Parodontitis beleuchtet und explorativ Zusammenhänge zwischen immunologischen und mikrobiologischen Befunden eruiert werden. Es wurden geeignete Patienten und gesunde Probanden laut Ethikvotum rekrutiert. Die immunologischen Untersuchungen erfolgten an PBMCs unter Verwendung durchflusszytometrischer Methoden und mittels ELISpot-Assay. Mikrobiologische Untersuchungen subgingivaler Plaque wurden als klassische Kultur und 16S rRNA-Sequenzierung durchgeführt.

Immundefekterkrankungen konnten bei allen Individuen ausgeschlossen werden. Im Gruppenvergleich wurde eine erhöhte Stimulierbarkeit der PBMCs von Patienten mit moderater chronischer Parodontitis bezüglich ihrer IL-1 β -Freisetzung bei Inkubation mit LPS festgestellt. Des Weiteren wies diese Patientengruppe einen vergleichsweise höheren Anteil an Gedächtnis-B-Zellen auf. In der mikrobiologischen Untersuchung konnten bekannte parodontopathogene Spezies nachgewiesen und *Prevotella denticola* als bislang nicht explizit erwähntes Pathogen mit aggressiver Parodontitis assoziiert werden. Unsere Untersuchung weisen auf Zusammenhänge zwischen immunologischen und mikrobiologischen Befunde bezüglich einiger parodontopathogener Bakterien, wie *Prevotella oralis*, und Stimulierbarkeit der IL-1 β -Freisetzung, B-Zelldifferenzierung und T-Zellverhältnis hin.

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Activator protein-1
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAL	Clinical attachment level: klinisches Befestigungslevel
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELISpot	Enzyme-linked Immunospot
EMAP-II	Endotheliales Monozyten-aktivierendes-Polypeptid-II
ERK	Extracellular signal regulated kinase
GF	Gingivafibroblasten
JNK	c-Jun N-terminal kinase
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IKK	I κ B kinases
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen activated protein kinases
MCP	Monocyte chemoattractant protein
MIP	Macrophage inflammatory protein
MMP	Matrix-Metalloprotease
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PMN	Polymorphonuclear leukocyte/neutrophil granulocyte
PRR	Pattern Recognition Receptor
<i>P.g.</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PD	Pocket depth – Taschentiefe
PDLF	Parodontalligamentfibroblasten
PG	Prostaglandin
PI-3-K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PK-C	Proteinkinase C
RANTES	Regulated on activation normally T-cell expressed and secreted
TLR	Toll-like receptor
TSBV	Tryptic-Soy-Bacitracin-Vancomycin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klinisches Bild der generalisierten aggressiven Parodontitis.....	9
Abbildung 2: Interaktionen der angeborenen und adaptiven Immunität.....	15
Abbildung 3: Leukozytenwanderung und –diapedese	17
Abbildung 4: Schema fortgeschrittene parodontale Läsion	23
Abbildung 5: CVID-Klassifikationen nach Warnatz und Schlesier....	42
Abbildung 6: Zytokinproduktion durch CD4+ Th-Zellen	51
Abbildung 7: Darstellung des Verhältnisses von Th1- zu Th2-Zellen	52
Abbildung 8: Anteil Gedächtnis-B-Zellen (CD19+CD27+IgM+) an B-Zellen	55
Abbildungen 9 und 10: Grafische Darstellung der Stimulationsindizes.....	56
Abbildung 11: Stimulierbarkeit IL-8-Freisetzung der PBMCs durch <i>P.g.</i> LPS.....	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Definition der Probandengruppen	32
Tabelle 2: Klinische Charakteristika der Studienteilnehmer.....	50
Tabelle 3: Stimulationsindizes und Rangverteilung nach Kruskal-Wallis.....	57
Tabelle 4: Kultivierte Spezies in den Probandengruppen.....	60
Tabelle 5: Bezug zwischen immunologischen und mikrobiologischen Befunden .	63
Tabelle 6: Klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen bei Nachweis von <i>Prevotella oralis</i>	64

1. Einführung

Die Parodontitis ist als entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates definiert, deren Resultate die Destruktion von Faserapparat und Alveolarknochen darstellen. Dies kann zu starker Lockerung einzelner Zähne und Zahngruppen bis hin zu deren Verlust führen. Für Betroffene resultieren zum Teil erhebliche Einschränkungen der Lebensqualität sowie psychische Beeinträchtigungen. Häufig sind aufwendige prothetische Folgetherapien notwendig, um die Funktionsfähigkeit des orofazialen Systems wieder herzustellen.

Neben Einschränkungen der Funktionsfähigkeit des orofazialen Systems werden auch bei Parodontalerkrankungen auftretende Beeinträchtigungen des allgemeinen Gesundheitszustandes beschrieben. Viele Arbeitsgruppen untersuchen Zusammenhänge von Parodontitiden, vorrangig schwerer Ausprägung, mit rheumatoider Arthritis und Endokarditis (Persson & Persson 2008; Mattila et al. 2005). Es wurde gezeigt, dass Parodontitis und mit ihr assoziierte Bakterien Zusammenhänge mit einer Anzahl systemischer Erkrankungen, wie kardiovaskulären Erkrankungen, Schlaganfall, Frühgeburt, Diabetes mellitus und Pneumonie (Brown et al. 2002; Salvi et al. 2008; Dewhirst et al. 2010), aufweisen.

Die Ätiologie der Parodontitis lässt sich als Infektionserkrankung verstehen, die aus der Besiedlung der Mundhöhle mit parodontopathogenen Keimen hervorgeht (Berezow & Darveau 2011). Der Immunantwort wird pathogenetisch eine entscheidende Rolle zugeschrieben (Armitage et al. 2010; Berezow & Darveau 2011). Die Bedeutung von Parodontalpathogenen bei der Entwicklung und Reifung der angeborenen und adaptiven Immunantwort wird vermutet (Armitage 2010), da viele parodontal gesunde Individuen Parodontalpathogene in ihrer normalen supra- und subgingivalen Mikroflora aufweisen (Li et al. 2004; Papaioannou et al. 2009; van Winkelhoff et al. 2002).

Vor diesem Hintergrund sollen in der vorliegenden Untersuchung anhand klinischer, immunologischer und mikrobiologischer Untersuchungen ein immunologisches Risikoprofil bei Patienten mit aggressiver Parodontitis erschlossen und gegebenenfalls Unterschiede zur chronischen Parodontitis beleuchtet werden. Aufgrund des interdisziplinären Ansatzes dieser Arbeit wird im Einführungsteil aus-

fürlicher auf Zusammenhänge zwischen den unterschiedlichen Fachgebieten eingegangen. In der Diskussion wird der Schwerpunkt hingegen hauptsächlich auf die gewonnenen Ergebnisse gelegt.

1.1. Parodontitis

Parodontitis ist eine komplexe Erkrankung und wird durch Risikofaktoren/-indikatoren, wie Rauchen, Alter, Diabetes mellitus (Chi et al. 2010), Stress (Depressionen, Angstzustände, berufliche oder finanzielle Sorgen), Geschlecht (Timmerman & van der Weijden 2006), Bildungsniveau (van der Weijden & Slot 2011) und HIV-Infektion (Imai & Ochiai 2011) modifiziert (Corbet & Leung 2011).

Hier soll im Speziellen auf die Krankheitsbilder der aggressiven und chronischen Parodontitis Bezug genommen werden, welche viele Eigenschaften teilen, sich aber in spezifischen Details unterscheiden (Armitage & Cullinan 2010). Bei beiden Erkrankungsformen liegen keine systemischen Bedingungen vor, welche die Entstehung einer Parodontitis begünstigen (Meng et al. 2007), da sonst von der „Parodontitis als Manifestation einer systemischen Erkrankung“ gesprochen werden müsste, laut der in dieser Arbeit verwendeten Nomenklatur nach Armitage, 1999.

1.1.1. Klinische Differenzierung zwischen Aggressiver und Chronischer Parodontitis

Der Parodontitis, ob chronisch oder aggressiv, geht immer eine Gingivitis voraus (van der Weijden & Slot 2011; Gjermo & Grytten 2009). Diese betrifft als mildeste Form der Parodontalerkrankungen ausschließlich die Gingiva und ist vollständig reversibel. Parodontitis hingegen führt zum Verlust von parodontalem Halteapparat und ist der häufigste Grund für Zahnverlust beim Erwachsenen (Pihlstrom et al. 2005).

Die chronische Parodontitis stellt, verglichen mit der aggressiven Parodontitis, die häufigere Krankheitsentität dar und kann inzwischen als Volkserkrankung angesehen werden (Meng et al. 2007; Levin et al. 2006; Micheelis et al. 2006; Holtfreter et al. 2009; Albandar 2011). Vor 1999 wurde sie als „adulte Parodontitis“ bezeichnet, da ihre höchste Prävalenz bei Erwachsenen vorliegt; sie tritt jedoch auch bei Kindern und Jugendlichen auf. Daher erschien dieser Terminus ungeeignet und

wurde durch die Begrifflichkeit „chronische Parodontitis“ ausgetauscht (Armitage 1999). Die chronische Parodontitis ist durch Taschenbildung und/oder Rezessionen gekennzeichnet, die mit progressivem Verlust von parodontalem Halteapparat einhergehen, der langsam oder mäßig, phasenweise auch rasch, verläuft (Lindhe et al. 1999). Die parodontale Destruktion entspricht der Menge lokaler ätiologischer Faktoren, zu denen bakterielle Beläge sowie eine variierende Mikroflora gehören (Schulz et al. 2008; Smith et al. 2010). Subgingivaler Zahnstein ist häufig vorhanden, ebenso lokale prädisponierende Faktoren, die zahnbezogen oder iatrogener Natur sein können (Lindhe et al. 1999).

„Aggressive Parodontitis“ ist die Bezeichnung für eine Gruppe verschiedener destruktiver parodontaler Erkrankungen, die junge Patienten befallen (Lang et al. 1999). Die mittelwertig festgelegte Altersgrenze von 35 Jahren bei Diagnosestellung wird kritisch gesehen, da Erscheinungen dieser Erkrankung in jedem Alter auftreten können (Armitage & Cullinan 2010). In einigen Fällen sind Voranschreiten des Verlustes von parodontalem Halteapparat und Knochenresorption selbstlimitiert, dann liegt meist eine lokalisierte aggressive Parodontitis vor (Lang et al. 1999). Lokalisierte und generalisierte aggressive Parodontitis werden aufgrund unterschiedlicher klinischer, immunologischer und mikrobiologischer Befunde von einigen Autoren als unterschiedliche Erkrankungen angesehen (Armitage & Cullinan 2010). Die Diagnosestellung sollte anhand aller Informationen, die bezüglich der allgemeinen und speziellen Anamnese eines Patienten gewonnen werden können, und genauer klinischer Untersuchung erfolgen (Armitage & Cullinan 2010).



Abbildung 1: Klinischer Zustand eines 39-jährigen Patienten mit generalisierter aggressiver Parodontitis

Charakteristische Eigenschaften aggressiver Parodontitiden sind schnell voranschreitender Verlust von Zahnhalteapparat und Knochendestruktion (Lang et al. 1999). Sie sind durch frühen Beginn (Armitage & Cullinan 2010) und familiäre Häufung (Lang et al. 1999; Marazita et al. 1994) charakterisiert. Die Patienten weisen definitionsgemäß keine modifizierenden Allgemeinerkrankungen auf (Lang et al. 1999). Meist sind Diskrepanzen zwischen der Menge ätiologischer Faktoren und Schwere des klinischen Befundes feststellbar (Lang et al. 1999; Schulz et al. 2008; Smith et al. 2010). Abbildung 1 zeigt den klinischen Befund bei einem Patienten aus der Gruppe mit aggressiver Parodontitis, bei dem die Erkrankung generalisiert vorliegt. Der Patient weist trotz guter Mundhygiene starke Entzündungszeichen des Zahnhalteapparates auf, ganze Zahngruppen sind gelockert. Der Patient war vom Hauszahnarzt in die Poliklinik für Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie des Universitätsklinikums Leipzig überwiesen worden, nachdem die Erkrankung trotz erfolgter Parodontitistherapie weiterhin rasch progredient verlief.

1.1.2. Bakterielle Mikroorganismen und Parodontalerkrankungen

Bakterien sind in der Lage, an vielen verschiedenen Oberflächen der Mundhöhle zu binden und in die residente Mikroflora integriert zu werden, was die Voraussetzung der Biofilm-Bildung darstellt (Nobbs et al. 2011). Zell-Zell-Interaktionen, horizontaler Gentransfer und reduzierte Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Stoffen und Wirtsabwehr stellen für Bakterien die Vorteile des Biofilms dar und erleichtern Wachstum und Überleben (Marsh 2005).

Die Anfälligkeit eines Patienten für Parodontalerkrankungen ergibt sich aus komplexen Interaktionen zwischen Individuum, Bakterien, Umweltfaktoren und unterschiedlicher Genexpression (Ohlrich et al. 2009). Die Schädigung des Parodonts resultiert hauptsächlich aus der Immunantwort des Individuums auf bakterielle Antigene (Gemmell et al. 2002; Gemmell et al. 2007; Gemmell & Seymour 2004).

Das orale Mikrobiom besteht aus über 600 Spezies (Dewhirst et al. 2010). Von diesen scheinen nur wenige in der Parodontitis-Pathogenese eine Rolle zu spielen. Das Definieren der „gesunden“ oralen Mikroflora gestaltet sich als kompliziert (Berezow & Darveau 2011), da die Hälfte der nachweisbaren Spezies noch nie

kultiviert wurde (Aas et al. 2005; Faveri et al., 2008) und interindividuelle sowie intraindividuelle Unterschiede bezüglich der oralen Mikroflora bestehen (Nasidze et al. 2009; Aas et al. 2005). Ernährungsumstellungen kombiniert mit schlechter Mundhygiene können eine Verschiebung in der Zusammensetzung der oralen Mikroflora hervorrufen (Al-Ahmad et al. 2010). Weiterhin liegen Hinweise vor, dass Veränderungen der oralen Mikroflora mit dem Alter des Menschen auftreten können (Kang et al. 2006).

Es wurde eine positive Assoziation zwischen gesunden parodontalen Zuständen und dem Vorhandensein von *Veillonella* (Kumar et al. 2006; Stingu et al. 2012) sowie *Capnocytophaga ochracea* (Riep et al. 2009) beobachtet. Eine andere Arbeitsgruppe konnte *Capnocytophaga* im Komplex mit *Actinomyces oris*, *Eikenella corrodens*, *Streptococcus intermedius*, *Selenomonas noxia*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis* und *Veillonella parvula* als Risikofaktoren mit der Entstehung von Parodontitis assoziieren (López et al. 2011). Weitere Untersuchungen wiesen nach, dass *Streptococcus mitis*, *Gemella haemolysans* und *Granulicatella adiacens* bei gesunden Patienten üblicherweise vorkommen (Aas et al. 2005; Berezow & Darveau 2011).

Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass potentiell parodontopathogene Bakterien zur kommensalen oralen Mikroflora gehören (Li et al. 2004; Papaioannou et al. 2009; van Winkelhoff et al. 2002) und eine essentielle Bedeutung für die Entwicklung und Reifung der Immunantwort haben (Darveau 2009; Slack et al. 2009).

Durch Dysbiose, auch als „Microbial Shift“ bezeichnet, kann es zur Parodontitis kommen (Berezow & Darveau 2011). Dabei verändert sich die symbiotische Bakterien-Wirts-Interaktion und es entsteht ein pathogenes Verhältnis, in dem es zur Schädigung des Wirtes kommt. Es treten unterscheidbare mikrobiologische Komplexe auf. Der sogenannte „orange Komplex“ besteht aus gramnegativen anaeroben Spezies wie *Prevotella intermedia* und *Fusobacterium nucleatum*. Schreitet die Erkrankung voran, verschiebt sich die Flora zum „roten Komplex“, der die Parodontalpathogene *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola* zusammenfasst (Socransky & Haffajee 2005; Berezow & Darveau 2011).

Parodontalpathogene haben unterschiedliche Mechanismen entwickelt, die Wirtsabwehr zu umgehen und den Wirt zu schädigen. Socransky formulierte bereits 1979 fünf Kriterien, welche die ätiologische Rolle eines Bakteriums in der Initiation und/oder Pathogenese der Parodontitis belegen (Socransky 1979). Aufgrund der guten Kultivierbarkeit von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* liegen viele Untersuchungen der Parodontopathogenität dieser Bakterien vor (Armitage 2010). Virulenzfaktoren ermöglichen es parodontalpathogenen Spezies, Gewebe zu schädigen. *A. actinomycetemcomitans* ist durch Leukotoxin in der Lage, die Zellmembran von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten zu zerstören und die Lyse dieser Zellen auszulösen. Des Weiteren führt es durch Chaperonin 60 zur Leukozytenaktivierung und Knochenresorption (Henderson et al. 2003). Die Bakterien des roten Komplexes (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*) spielen eine große Rolle bei der Gewebeschädigung durch die von Ihnen freigesetzten Proteasen (Holt & Ebersole 2005). Des Weiteren sind die von *P. gingivalis* sezernierten Gingipaine, welche dem Eindringen der Bakterien in das parodontale Gewebe dienen, in der Lage, die IL-8-Aktivität zu verstärken. Sie modulieren somit die Immunantwort des Wirtes und wirken proinflammatorisch (Gairola et al. 1999; Guo et al. 2010).

P. gingivalis und *A. actinomycetemcomitans* sind wichtige Pathogene im subgingivalen Biofilm. Es sollte jedoch beachtet werden, dass sich die 1996 aufgestellte „Consensus List“ der Parodontalpathogene (van Genco 1996) bis heute deutlich verlängert hat und nicht nur auf gram-negative anaerobe Stämme beschränkt ist (Armitage 2010).

Einige Mikroorganismen scheinen für die Entstehung einer Parodontitis wichtiger zu sein als andere. Weder chronische noch aggressive Parodontitiden sind Monoinfektionen (Armitage 2010) und viele parodontal gesunde Probanden beherbergen laut Studienlage niedrige Mengen parodontaler Pathogene als Teil ihrer endogenen subgingivalen Plaqueflora (Papaioannou et al. 2009; Riep et al. 2009).

Wahrscheinlich ist, dass die oralen mikrobiologischen Gemeinschaften, die in klinisch gesunden und erkrankten Geweben gefunden werden, sowohl zu organisierter Expression von Mediatoren führen, die an gesunden Situs beobachtet wurde,

als auch zur Expression destruktiver Mediatoren, wie sie in erkrankten Geweben vorliegt (Darveau et al. 1997).

Rescala et. al stellten bei Patienten mit generalisierter chronischer und generalisierter aggressiver Parodontitis signifikant höhere Zahlen an Spezies des roten Komplexes fest als bei Gingivitispatienten. Zwischen chronischer und aggressiver Erkrankungsform konnten, das mikrobielle Profil betreffend, keine Unterschiede festgestellt werden (Rescala et al. 2010). Die meisten parodontopathogenen Bakterienspezies, wie *P. gingivalis*, scheinen stärker mit erhöhten Taschentiefen assoziiert zu sein als mit der Diagnose „aggressive oder chronische Parodontitis“ (Riep et al. 2009). In anderen Arbeiten wurden verschiedene Parodontalpathogene (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*) mit chronischer Parodontitis assoziiert. Es wird vermutet, dass Co-Infektionen mit bestimmten Spezies die Immunantwort durch Genregulation modulieren könnten. *P. gingivalis* steht im Verdacht, die Entwicklung der Th1- zur Th2-Antwort (Ohlrich et al. 2009) und damit die Progression parodontaler Läsionen zu induzieren.

Verschiedene Studien konnten eine verstärkte Assoziation des hochtoxischen *A. actinomycetemcomitans* JP2-Klons vom Serotyp B mit aggressiver Parodontitis beim Erwachsenen nachweisen (Haubek 2010). Es wurde weiterhin festgestellt, dass dieser Klon hauptsächlich bei Patienten mit nordafrikanischer Herkunft auftritt und im kaukasischen Kulturkreis wenig verbreitet zu sein scheint (Jentsch et al. 2012). Lokalisierte und generalisierte Erscheinungsform der aggressiven Parodontitis gehen vermutlich mit unterschiedlicher bakterieller Zusammensetzung des subgingivalen Biofilms einher (Armitage 2010).

In diese Studie wurde die mikrobiologische Diagnostik eingeschlossen, um Vergleichbarkeit mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen herzustellen und mögliche Assoziationen zwischen dem Vorhandensein einzelner Bakterien und immunologischen Befunden explorativ zu untersuchen.

1.2. Die Rolle des Immunsystems

Die erste Reaktion auf Pathogene geht von der angeborenen Immunantwort aus, welche die meisten Infektionen abwehrt. Sie wird sofort oder innerhalb einiger

Stunden nach Keiminvasion wirksam. Es gibt kein immunologisches Gedächtnis; ein Pathogen kann in der Zukunft nicht besser erkannt werden, sollte der Körper noch einmal von ihm befallen werden (Warrington et al. 2011).

Die adaptive Immunantwort entwickelt sich, wenn es der angeborenen Immunität nicht gelingt, die Infektion abzuwehren. Primäre Funktionen sind Antigenerkennung fremder Antigene, die Generation Pathogen-spezifischer immunologischer Reaktionen und die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses (Warrington et al. 2011).

1.2.1. Allgemeine Aspekte der angeborenen Immunität

Die angeborene Immunantwort dient in erster Linie der Rekrutierung von Immunzellen an den Ort der Entzündung durch die Produktion von Zytokinen. Die Zytokinproduktion führt weiterhin zur Stimulation von Plasmazellen zur Synthese von Antikörpern und zur Freisetzung anderer Proteine, die das Komplementsystem aktivieren. Auf diese Weise wird die Identifizierung und Opsonierung körperfremder Antigene realisiert, was diese der Phagozytose zugänglich macht. Eine weitere Aufgabe ist es, tote Zellen, Antikörperkomplexe und körperfremde Substanzen aus Organen, Geweben, Blut und Lymphe zu entfernen. (Akira 2011; Warrington et al. 2011).

Die angeborene Immunität wird durch Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen vermittelt, die unter der Überschrift „Phagozyten“ zusammengefasst werden (Akira 2011). Diese Zellen nehmen Mikroben auf, vernichten sie und können zusätzlich bei der Antigenpräsentation eine Rolle spielen (Rossol et al. 2011). Makrophagen und dendritische Zellen haben ihren Ursprung in den Monozyten (CD14+), die als ihre Vorläuferzellen angesehen werden (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Wie schematisch in Abbildung 2 dargestellt, kann durch Antigenpräsentation die adaptive Immunantwort aktiviert und somit eingeleitet werden.

Die Erregererkennung ist unabdingbare Voraussetzung für die Funktion der angeborenen Immunantwort. Pathogene exprimieren verschiedene Identifikationsmoleküle, sogenannte „Pathogen-associated molecular patterns“ (PAMP), die für ihr Überleben und ihre Pathogenität essentiell sind. Dies können Bestandteile aus

Hüllstrukturen, wie LPS bei gramnegativen Bakterien (Poltorak 1998), aber auch doppelsträngige RNA von Viren sein (Akira 2011). Die Erkennung erfolgt durch spezielle Rezeptoren (PRR), evolutionär hochkonservierte, angeborene Rezeptoren, welche Strukturen fast aller Erregertypen erkennen können (Kumar et al. 2011). PRR werden auf Zellmembranen dendritischer Zellen, Makrophagen und Neutrophiler exprimiert (Kawai & Akira 2010).

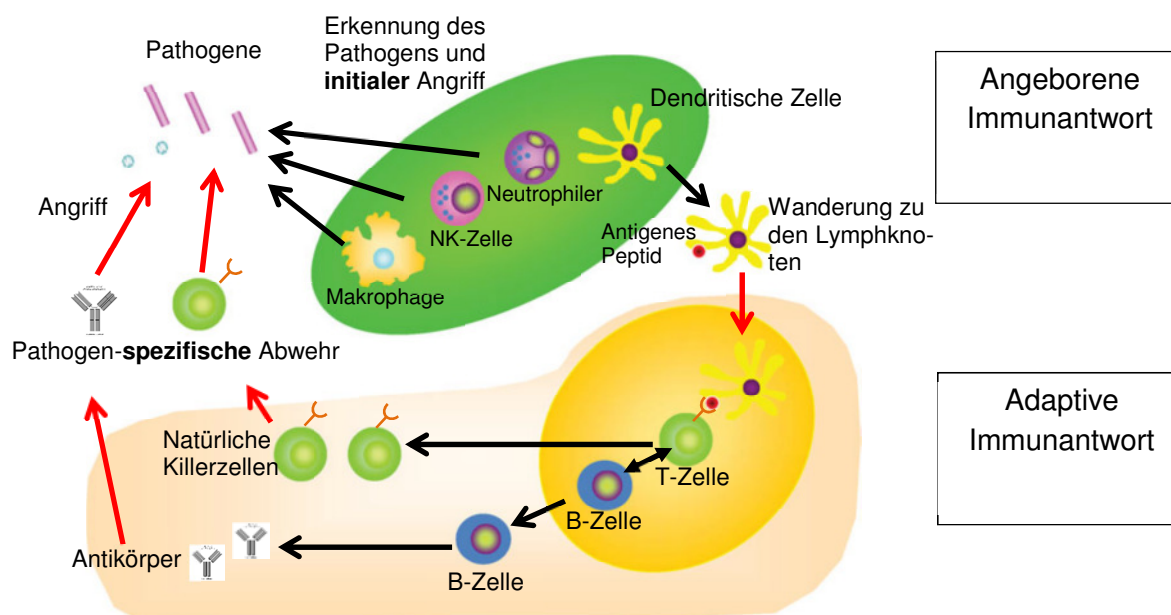


Abbildung 2: Interaktionen der angeborenen und adaptiven Immunität, adaptierte Übersicht (Akira 2011)

Zu den PRR gehören unter anderem die Toll-like-Rezeptoren (TLR). TLR sind entscheidend für die Verteidigung des Wirtes, können allerdings bei fehlender Regulierung der TLR-Signalkaskaden wie auch bei Erkennung körpereigener Moleküle mit der Pathogenese entzündlicher und autoimmunologischer Erkrankungen assoziiert sein (Kawai & Akira 2010). Sie sind nach „außen“ gerichtete Rezeptoren, die mikrobielle Substanzen im extrazellulären Milieu oder im Lumen endozytischer Vesikel erkennen (Turvey & Broide 2010). Durch die Aktivierung von TLR werden Signalkaskaden in Monozyten, den typischen Trägern von CD14-Proteinen, in Gang gesetzt (Warrington et al. 2011). Es kommt zur Transkription von Zytokinen und Chemokinen wie $\text{TNF}\alpha$, Vertretern der IL-1-, IL-10-, IL-12-Familien, IL-6, IL-8, IL-15, $\text{TGF}\beta$ (Akira 2010; Kumar et al. 2009) und zur Produktion dieser Chemo- und Zytokine sowie Typ-I-Interferone, welche zur Reifung dendritischer Zellen notwendig und damit auch an der Einleitung der adaptiven Immun-

antwort beteiligt sind (Turvey & Broide 2010). Des Weiteren werden Mikroorganismen, nachdem sie phagozytiert worden sind, durch Neutrophile und Makrophagen intrazellulär abgebaut oder durch Abgabe lysosomaler Bestandteile extrazellulär eliminiert. Beide Vorgänge sind mit dem sogenannten „Respiratory Burst“ assoziiert, der zur Freisetzung von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen führt (Hendler et al. 2010). Mutationen und Polymorphismen in vielen der Gene, die für diese Abläufe wichtig sind, scheinen die Anfälligkeit für infektiöse und entzündliche Erkrankungen zu determinieren (Turvey & Broide 2010).

Neben der Erregererkennung spielen Leukozytenchemotaxis und –diapedese bei der Immunantwort eine große Rolle. In Abbildung 3 wird die Einwanderung von Leukozyten in infiziertes Gewebe schematisch illustriert. Sie ist in der Pathogenese der Parodontitis von essentieller Bedeutung. Auf den Endothelzellen lokaler Blutgefäße können Zelladhäsionsmoleküle (ICAM) induziert werden. Phagozyten im Blutstrom binden im ersten Schritt durch auf ihrer Oberfläche exprimierte Glykoproteine an Selektine der Endothelzellmembranen (Springer 1994). Die schwachen Bindungskräfte reichen aus, um Leukozyten im Blutstrom abzubremsen, sodass sie auf der Endotheloberfläche „entlangrollen“ (Sage & Carman 2009). Dies ermöglicht die Interaktion der ICAM auf Endothelzellen mit den α -Ketten der Integrine auf Leukozyten. LFA-1 und CR3 stellen häufig exprimierte Integrine dar, die an ICAM-1 und ICAM-2 binden können. Eine „feste“ Bindung kommt nur zustande, wenn das Integrin in seiner aktiven Form vorliegt (Murphy 2012). Die Aktivierung von Integrinen kann durch Chemokine, wie zum Beispiel IL-8, ausgelöst werden. Wenn IL-8 an seinen Rezeptor (z.B. CXCR8) auf der Leukozytenoberfläche bindet, kommt es durch intrazelluläre Signalkaskaden zu Veränderungen im Zytoskelett des Leukozyten. Über die stabile β -Einheit des Integrins, welche durch das Strukturprotein Talin mit dem Zytoskelett der Zelle verbunden ist, wird das Integrin in seine aktive Konformation versetzt, in der es eine höhere Avidität für die Adhäsionsmoleküle der Endotheloberfläche aufweist (Carman & Springer 2003). Ist der Leukozyt gebunden, verändert er seine Morphologie durch Aktinaktivität, er wird breiter, polarisiert sich und führt Integrin-abhängig die laterale Migration durch das Endothel (Diapedese) durch. Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass dies

sowohl para- als auch transzellulär erfolgen kann (Engelhardt & Wolburg 2004; Sage & Carman 2009).

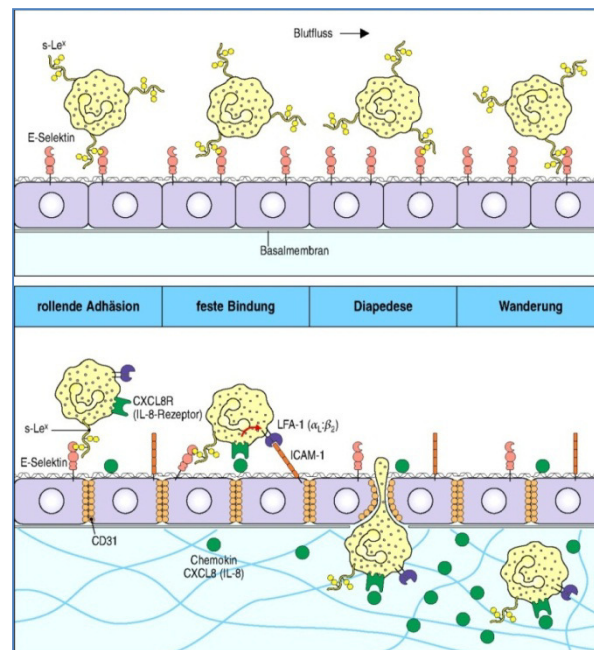


Abbildung 3: Leukozytenwanderung und -diapedese (Murphy 2012)

1.2.2. Allgemeine Aspekte der adaptiven Immunität

Es wird zwischen humoraler und zellulärer adaptiver Immunität unterschieden, wobei ersterer die Abwehr von Bakterien in Blut oder Körperflüssigkeiten durch die B-Zell-vermittelte Antikörper-Produktion zugeschrieben wird, während die zelluläre Komponente, welche durch zytotoxische T-Zellen (Killerzellen) vermittelt wird, für die Vernichtung von Tumorzellen und Zellparasiten verantwortlich ist (Akira 2011).

Um diese Funktionen zu erfüllen, ist die adaptive Immunantwort von der Interaktion verschiedener immunologischer Netzwerke abhängig. Diese werden hauptsächlich von T-Zellen reguliert, wobei das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen T-Helferzellpopulationen von entscheidender Bedeutung zu sein scheint (Ford et al. 2010; Smith et al. 2010).

Zu den zellulären Bestandteilen der adaptiven Immunantwort zählen T- und B-Zellen sowie die nach Abschluss einer Infektion gebildeten Gedächtniszellen (Akira 2011).

T-Zellen entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und reifen nach ihrer Migration im Thymus. Sie exprimieren einen ubiquitären antigenbindenden Rezeptor (TCR) und benötigen die Interaktion mit Antigenpräsentierenden Zellen (APC), normalerweise dendritische Zellen, für die Antigenerkennung.

Dendritische Zellen werden als unreife Zellen in der Epidermis von Haut und Schleimhaut (meist im Stratum spinosum) als Langerhans-Zellen bezeichnet. Ihre Fortsätze reichen durch die Tight junctions zwischen den Epithelzellen bis an die Körperoberfläche und können so auch ohne offene Infektion oder Entzündung bakterielle Antigene aufnehmen (Randolph et al. 2005). Die dendritischen Zellen nehmen eingedrungene Pathogene auf (Phagozytose), verdauen sie in kleine Peptide und präsentieren die Peptidantigene auf ihrer Zelloberfläche. So sind sie in der Lage, natürliche Killerzellen zu stimulieren (Tew et al. 2012); sie migrieren aber auch in die regionären Lymphknoten (sekundäre lymphatische Organe), wo sie die Antigene naiven T-Zellen mit ihrem korrespondierenden Rezeptor präsentieren (Steinman & Hemmi 2006) und die adaptive Phase der Immunantwort einleiten (Jotwani & Cutler 2003). B-Zellen, Makrophagen, Fibroblasten und Epithelzellen sind ebenfalls in der Lage, Antigene auf ihren Oberflächen zu präsentieren. Antigenpräsentierende Zellen (APC) exprimieren MHC-Proteine auf ihren Oberflächen. Diese werden in Klasse I MHC-Moleküle (auch HLA A, B, C), die auf allen Zellen mit Zellkern zu finden sind, und Klasse II MHC-Moleküle (auch HLA, DP, DQ, DR), die nur auf bestimmten Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen, vertreten sind, unterteilt (Murphy 2012).

Trifft eine passende T-Zelle auf eine APC, die ein Antigen prozessiert hat und die Antigenfragmente, auf ihren MHC-Molekülen gebunden, präsentiert, wird sie aktiviert. Der MHC-Antigen-Komplex aktiviert den TCR, was bei CD4⁺ T-Helferzellen zur Produktion von Zytokinen, welche die Immunantwort stimulieren, oder zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (CD8⁺) führt (Warrington et al. 2011).

T-Helferzellen (CD4⁺) tragen Rezeptoren, die nur an MHC Klasse II gebundene Antigene erkennen (Murphy 2012). Sie spielen eine große Rolle beim Aufbau und der Verstärkung der Immunantwort, haben keine phagozytierenden und nur wenig zytotoxische Eigenschaften. Sie organisieren die Immunantwort, indem sie andere

Zellen anleiten, infizierte Zellen zu eliminieren oder Pathogene zu beseitigen. Einige T-Helferzellen werden nach Beendigung der Infektion zu Th-Gedächtniszellen (Warrington et al. 2011).

Th1-Zellen setzen IL-2 und IFN- γ frei und aktivieren die Zell-vermittelte Immunität (Modlin & Nutman 1993), eine Reaktion, die auch bei der DTH (delayed type hypersensitivity) abläuft. IFN- γ aktiviert Makrophagen, natürliche Killerzellen und CD8⁺ T-Zellen. IL-2 spielt für Generierung und Sekretion opsonierender Antikörper-Isotypen durch B-Zellen eine entscheidende Rolle. Th2-Zellen induzieren vor allem die humorale B-Zellantwort, indem sie IL-4, IL-5 und IL-10 freisetzen, während ihre zweite Funktion in der Suppression T-Zell-vermittelter Immunantworten besteht (Modlin & Nutman 1993).

Die Entdeckung der Th17-Zellen löste einige Kontroversen des Th1/Th2-Schemas und warf gleichzeitig neue Fragen auf (Gaffen & Hajishengallis 2008). IL-17 ist das Standardzytokin der Th17-Zellen. Die Th17-Zelle spielt bei entzündlichen Reaktionen, Autoimmunität und antimikrobieller Abwehr eine Rolle. Ihre Entwicklung ist abhängig vom Vorhandensein der Interleukine 23 und 6 sowie TGF- β (Laurence & O'Shea 2007). IL-17 führt zur Produktion von MMP und verstärkter Expression des RANKL auf Osteoblasten, was in Osteoklastendifferenzierung und Knochenabbau resultiert. Es fördert die Expansion und Rekrutierung von Zellen der angeborenen Immunantwort und kooperiert mit Liganden von TLRen, IL-1 β und TNF- α , was zu verstärkten Entzündungsantworten, der Stimulierung der β -Defensin-Produktion sowie der Generierung anderer antimikrobieller Peptiden führt (Weaver et al. 2006; Yu & Gaffen 2008). Diese Prozesse spielen im Abbau von Befestigungsgebe und der Progression parodontaler Läsionen eine große Rolle.

Auch die Differenzierung von Th1-Zellen aus Th17-Zellen unter dem Einfluss von IL-12, respektive die Bildung von Th2-Zellen durch IL-4-Stimulation, konnte nachgewiesen werden – allerdings nur bei Th17-Zellen, die *in vitro* generiert wurden. *In vivo* generierte Th17-Zellen zeigten ein stabileres Zytokingedächtnis, das nicht durch IL-12 und IL-4 beeinflusst wurde (Lexberg et al. 2008).

Eine weitere T-Helferzellart, bekannt als regulatorische T-Zelle, reguliert und limitiert das Immunsystem (Nakajima et al. 2005). Sie könnte bei der Verhinderung

überschießender Immunantworten auf körpereigene Antigene und der Entwicklung von Autoimmunreaktionen wichtig sein (Laurence & O'Shea 2007; Warrington et al. 2011).

In Mäusen führte die Inkubation von naiven T-Zellen mit TGF- β und IL-2 zu einer verstärkten Translation des Transkriptionsfaktors FoxP3 und der Entwicklung von regulatorischen T-Zellen. Wenn CD4⁺ T-Zellen hingegen mit TGF- β und IL-6 inkubiert werden, exprimieren sie den Transkriptionsfaktor ROR γ t und werden zu Th17-Zellen (Laurence & O'Shea 2007). Diese Ergebnisse bestätigen die Erkenntnis, dass die Regulation des Verhältnisses zwischen Th17- und regulatorischen T-Zellen stark von IL-6 abhängig ist (Ohlrich et al. 2009).

Zytotoxische T-Zellen (CD8⁺) sind für die Zerstörung von Zellen, die wirtsfremde Substanzen enthalten, zuständig. Sie werden durch die Interaktion ihres TCR mit MHC Klasse I Molekülen aktiviert. Daraufhin findet die klonale Expansion der zytotoxischen T-Zellen statt, bei der Effektorzellen produziert werden, die Perforin und Granzyme (Lyse der Zielzellen wird eingeleitet) sowie Granulysin (Apoptose der Zielzelle wird eingeleitet) freisetzen. Nachdem die Infektion erfolgreich bekämpft wurde, werden die meisten Effektorzellen apoptotisch und durch Phagozytose beseitigt. Überlebende Zellen werden zu Gedächtniszellen. Diese können schnell zu Effektorzellen differenzieren, sollten sie erneut auf das Antigen treffen (Warrington et al. 2011).

B-Zellen entstammen, wie auch T-Zellen, hämatopoetischen Stammzellen und reifen im Knochenmark zu unreifen B-Zellen, die in die peripheren lymphatischen Organe entlassen werden, wo durch DNA-Rekombination die Generierung der Gene für die B-Zell-Rezeptorbildung erfolgt (Akira 2011), normalerweise ein Immunglobulin der Klasse M oder D. B-Zellen sind in der Lage, ungebundene Antigene direkt zu erkennen. Die Antigenerkennung führt zur Aufnahme des Antigens in die B-Zelle, wo es proteolytisch aufgespaltet (prozessiert) wird und seine Peptide durch MHC II-Moleküle auf der Oberfläche der B-Zelle exprimiert werden. Spezifische T-Helferzellen, die sich bereits durch den Kontakt mit demselben Antigen differenziert haben, erkennen den MHC II-Antigen-Komplex durch ihren spezifischen T-Zellrezeptor. Die T-Zellen setzen Zytokine frei, welche die B-Zell-Proliferation stimulieren. Die B-Zelle vermehrt sich (klonale Expansion), aus ihr

entwickeln sich Antikörper-produzierende Zellen und Gedächtniszellen. Die Affinitätsreifung der Antigen-Bindungsstellen findet in sekundären lymphatischen Organen durch somatische Hypermutation der variablen Region des Antikörpers statt. Weiterhin findet während der B-Zellreifung ein Klassenwechsel der Antikörper (Expression der Gene in der konstanten Region wechselt) in den Lymphknoten statt. Der Klassenwechsel ist von spezifischen Zytokinen abhängig, die aus T-Helferzellen und anderen, im Lymphknoten ansässigen Zellen, stammen, abhängig. Einige mikrobielle Antigene, zum Beispiel Polysaccharide, können B-Zellen auch direkt und ohne die Hilfe von T-Helferzellen aktivieren, was zur Entstehung weniger spezifischer Antikörper führt (Murphy 2012). Solche Antigene sind auch als "Thymus-unabhängige-Antigene" bekannt und führen nur zu einem limitierten Klassenwechsel der B-Zellen ohne Bildung von Memory B-Zellen (Murphy 2012).

Die Bildung von Antikörpern ist Hauptaufgabe der B-Zellen. Antikörper tragen auf drei Arten zur Immunität bei: Neutralisierung, Opsonierung und Aktivierung von Komplement. Durch die Neutralisation verhindern Antikörper eine Adhärenz von Bakterien an körpereigenen Zellen; Opsonierung fördert die Phagozytose. Durch Aktivierung von Komplement wird die Opsonierung verstärkt und die Lyse einiger Bakterien ausgelöst (Meng et al. 2007; Murphy 2012).

Memory B-Zellen tragen CD27 auf ihrer Oberfläche, ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie, das auch durch naive T-Zellen exprimiert wird. CD27 bindet CD70, das auch auf dendritischen Zellen vorkommt und vermittelt so die Interaktion zwischen dendritischen Zellen und B-Zellen (Murphy 2012).

1.2.3. Immunpathogenese der Parodontitis

1976 fundierte die Parodontopathogenese auf histologischen Untersuchungen (Page & Schroeder 1976). 1997 wurde sie anhand neuer molekularbiologischer und genetischer Erkenntnisse erweitert (Kornmann 1997). Im Jahr 2010 fassten Smith et al. die Pathogenese der Parodontitis – basierend auf neuesten Erkenntnissen – erneut zusammen (Smith et al. 2010).

Wie bei jeder Infektion wird auch bei der Parodontitis zunächst die angeborene und im Verlauf der Erkrankung, bei Bedarf, die adaptive Immunantwort aktiviert. Bakterielle Metabolite wie Fettsäuren, fMLP und LPS aus gram-negativen Bakte-

rien regen Zellen des Verbindungsepithels zur Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren, unter anderem IL-8, IL-1 α , PGE₂, MMP und TNF- α , an und verursachen zusätzlich direkte Schäden an Epithelzellen. Die Permeabilität des Verbindungsepithels steigt infolge dessen an, Bestandteile von Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte können in das subepitheliale Bindegewebe diffundieren. Gleichzeitig kommt es zum Ausstrom von Sulkusflüssigkeit – einem Serumderivat, welches alle Komplementfaktoren enthält.

Die Aktivierung des Komplementsystems führt zur Produktion der Anaphylatoxine C3a und C5a (Komplementfaktoren), welche zur Ausschüttung vasoaktiver Amine aus Mastzellen führen (Hajishengallis 2010). Die Gefäßpermeabilität steigt, es kommt zur Ödembildung. Ebenfalls aus Mastzellen freigesetztes TNF α induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1) auf Endothelzellen. Gemeinsam mit dem IL-8-Gradienten führt dies zu Adhäsion und Migration der PMNs in das gingivale Gewebe und den gingivalen Sulkus (Ford et al. 2010). Die durch PMNs beim „respiratory burst“ freigesetzten Sauerstoff- und Stickstoffradikale (Hendler et al. 2010) führen zur Destruktion des parodontalen Halteapparates (Dias et al. 2011). Neutrophile, die von Patienten mit Parodontitis isoliert werden, zeigen ohne Stimulation eine starke Produktion von reaktiven oxidativen Sauerstoffverbindungen (ROS), weshalb sie auch als hyperaktiv bezeichnet werden (Matthews et al. 2007a; Matthews et al. 2007b). Durch erhöhte Freisetzung von Elastase und ROS bei Stimulation neutrophiler Fc γ - und Toll-like-Rezeptoren können sie außerdem als hyperreaktiv bezeichnet werden (Matthews et al. 2007b). IL-8, GM-CSF und IFN- α spielen eine Rolle bei der Induktion des hyperaktiven Neutrophilenphänotyp (Dias et al. 2011). Erhöhung des IFN- α -Spiegels im Plasma scheint ursächlicher Faktor der Hyperresponsivität von PMNs bei Parodontitis-Patienten zu sein (Wright et al. 2008).

Neben der Freisetzung von Zytokinen und proteolytischen Enzymen kommt es zur Antigenpräsentation durch Makrophagen und dendritische Zellen der Gingiva (Ford et al. 2010). Aktivierte Makrophagen produzieren Mediatoren der Immun- und Entzündungsantwort und chemotaktische Substanzen, wie MCP, MIP und RANTES (Kornmann 1997; Taylor 2010). RANTES spielt eine bedeutende Rolle in

der Makrophagenmigration (Taylor 2010). Diese Interaktionen sind schematisch in Abbildung 4 dargestellt.

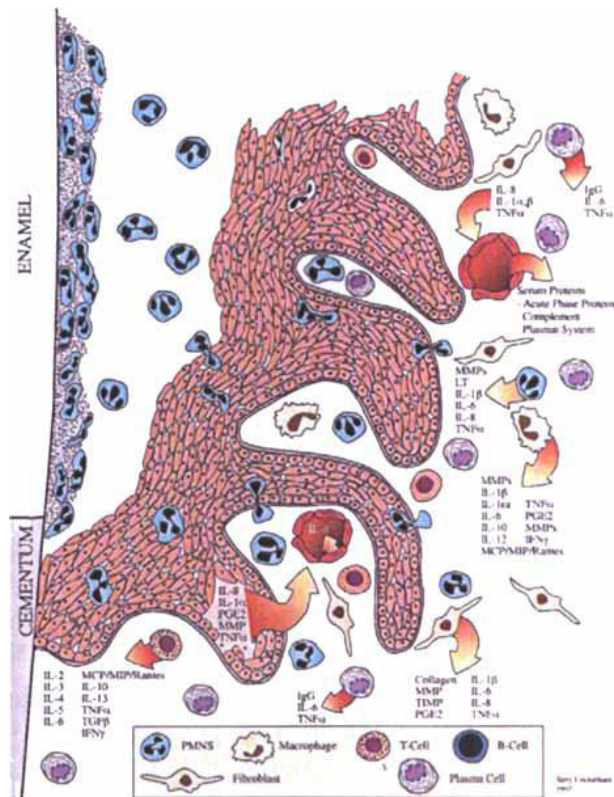


Abbildung 4: schematische Darstellung einer fortgeschrittenen parodontalen Läsion (Kornmann 1997)

Schreitet der entzündliche Prozess voran, dominieren mononukleäre Zellen das Exsudat. Aktivierte T-Zellen produzieren Zytokine, die bei der Modulierung der Immunantwort mitwirken. Das Verbindungsepithel migriert nach apikal und es kommt zur Bildung der „gingivalen Tasche“. Fibroblasten und Makrophagen werden durch IL-1, TNFα und PGE₂ zur Produktion von Matrix-Metalloproteasen angeregt. Diese Proteasen degradieren extrazelluläre Matrix. Schreitet die Läsion voran, kommt es zu Knochenverlust (Ohlrich et al. 2009). Plasma- und B-Zellen dominieren die Läsion, der

relative Anteil an PMNs nimmt ab (Berglundh & Donati 2005; Berglundh et al. 2007). Aus bislang ungeklärten Gründen entwickelt sich bei einigen Patienten nach unterschiedlich langer Zeit aus einer Gingivitis Parodontitis, welche durch Verlust von parodontalem Halteapparat aufgrund von progressivem Abbau extrazellulären Bindegewebes, Knochenresorption und Verschiebung des Saumepithels nach apikal beschrieben ist.

Verschiedene T-Zell-Populationen wurden in diesem Zusammenhang untersucht. Th2-Zellen werden mit nicht-protektiven Antikörper-Antworten und aggressiver Parodontitis beziehungsweise Progression der parodontalen Läsionen assoziiert, wohingegen Th1-Zellen mit stabilen Läsionen in Verbindung gebracht werden (Ford et al. 2010; Garlet 2010). Es wird angenommen, dass die Th1-Antwort durch IL-12/IFN-γ stimulierte zellulär vermittelte Immunität (Taylor 2010) und Inhibition der Osteoklastogenese zu erklären ist (Gaffen & Hajshengallis 2008). Neben den

Th1- und Th2-Zellen spielen die Th17-Zellen eine entscheidende Rolle in der Immunpathogenese der Parodontitis. IL-17 induziert die Freisetzung von IL-6, IL-8 sowie PGE₂ und wird außerdem mit der Osteoklastenaktivierung und damit einhergehender Knochenresorption in Verbindung gebracht (Lerner 2006; Ohlrich et al. 2009). Schenkein et al. zeigten, dass IL-17-Konzentrationen mit parodontalem Attachmentlevel assoziiert sind, nicht aber mit ständigem Rauchen. Somit könnten Th17-Zell-vermittelte Immunantworten für das Krankheitsbild der aggressiven Parodontitis charakteristisch sein und IL-17 bei der Pathogenese der aggressiven Parodontitis eine Rolle spielen (Schenkein et al. 2010). Unterstützt werden diese Annahmen durch Untersuchungsergebnisse von Ito et al., die zeigten, dass 51 % der gingivalen T-Zellklone IL-17 exprimierten im Vergleich zu nur 11 % der aus dem peripheren Blut stammenden T-Zellklone (Ito et al. 2005). Oda et al. wiesen nach, dass sogenannte „outer-membrane-proteins“ von *P. gingivalis* PBMCs zur IL-17-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene anregen (Oda et al. 2003). Entscheidend ist jedoch das Gleichgewicht zwischen IL-17 und der Expression seines Rezeptors. Zytokine können demnach nicht isoliert betrachtet werden, sondern beeinflussen durch ihr Zusammenspiel die Expression der Erkrankung.

In parodontalen Läsionen konnte mit zunehmendem B-Zell-Anteil das verstärkte Aufkommen von regulatorischen T-Zellen (CD4+CD25+) nachgewiesen werden, von denen antiinflammatorische und protektive Effekte ausgehen (Nakajima et al. 2005). So existieren Hinweise auf eine mögliche Rolle regulatorischer T-Zellen bei der Regulierung gingivaler Entzündung und alveolären Knochenabbaus (Kobayashi et al. 2011).

1.2.4. Immunologische Unterschiede zwischen aggressiven und chronischen Parodontitiden

Es existiert eine Vielzahl von Untersuchungen bezüglich immunologischer Unterschiede der angeborenen und adaptiven Immunantwort bei aggressiven und chronischen Parodontitiden, die in aktuellen Review-Artikeln diskutiert werden (Armitage et al. 2010; Ford et al. 2010; Ryder 2010).

Erwiesen ist, dass Patienten mit zu geringer Anzahl zirkulierender neutrophiler Granulozyten aufgrund seltener Umstände, wie zyklischer Neutropenie, das gleiche Progressionsmuster bezüglich parodontalem Attachmentlevel aufweisen wie Patienten mit aggressiver Parodontitis (Deas et al. 2003). Weder bei aggressiver noch bei chronischer Parodontitis kann generell von erniedrigten Neutrophilenzahlen gesprochen werden, da widersprüchliche Untersuchungsergebnisse vorliegen (Ryder 2010).

In älterer Literatur wurde vermutet, bei Patienten mit aggressiver Parodontitis sei verringerte Neutrophilen-Chemotaxis (Page et al. 1985), Phagozytose und intrazelluläre Abtötung von Bakterien genetisch determiniert (Ryder 2010). Aktuell wird eine Kombination erworbener und angeborener Eigenschaften als Ursache der unterschiedlichen Funktionen von Neutrophilen bei aggressiven Formen der Parodontitis angenommen (Armitage et al. 2010). Bei progressiven parodontalen Infektionen scheinen Neutrophile in einen erhöhten Aktivitätszustand versetzt zu werden, um effektiver gegen bakterielle Angriffe zu sein. Dieser als Priming bezeichnete Aktivierungsprozess führt zu erhöhter Neutrophilenadhäsion, Enzymfreisetzung und verstärkter Produktion reaktiver Sauerstoffradikale, sowohl aus stimulierten als auch aus ruhenden Zellen (Ryder 2010). Johnstone et al. wiesen die stärkere Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale und höhere phagozytotische Aktivität bei Neutrophilen von Patienten mit generalisierter aggressiver Parodontitis im Vergleich mit Neutrophilen von Patienten mit chronischer Parodontitis und gesunden Probanden nach. Eine verstärkte Aktivität des intrazellulären Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (ADP)-Oxidase-Systems wird als mögliche Ursache für die kontinuierliche parodontale Destruktion diskutiert (Johnstone et al. 2007). Vergleichbare Sensibilisierungsvorgänge wurden allerdings auch bei Patienten mit chronischer Parodontitis beobachtet (Guentsch et al. 2009). Takahashi et al. konnten hingegen keinerlei Unterschiede bezüglich Chemotaxis, Phagozytose oder ROS-Produktion von Neutrophilen zwischen Patientengruppen und gesunden Individuen feststellen (Takahashi et al. 2001). Veränderungen im Calcium-Stoffwechsel wurden ebenfalls als Ursache für gestörte Neutrophilenfunktionen untersucht. Hierbei wird bei Patienten mit aggressiver Parodontitis ein Defekt im Einstrom von Calcium-Ionen in das Zellinnere, der für die Alkalisierung notwendig

ist, vermutet (Herrmann et al. 2005; Shibata et al. 2000). Diacylglycerol fungiert als endogener Aktivator der Proteinkinase C. Eine erhöhte oder verlängerte DAG-Produktion, wie sie bei lokalisierter aggressiver Parodontitis beobachtet wurde (Oyaizu et al. 2003), könnte zu einem abnormalen Aktivierungsmuster der PK-C, die verschiedene Funktionen der der Neutrophilen reguliert, führen und so zur Erklärung der parallel auftretenden Hypo- und Hyperaktivität der Neutrophilen beitragen (Leino & Hurttia 1999).

Es konnte nachgewiesen werden, dass Makrophagen-ähnliche Zellen im Zahnhalteapparat an Stellen mit chronischer Parodontitis eine höhere Expression von TLR-2 und TLR-4 aufweisen als an gesunden Stellen (Ren et al. 2005). Verschiedene Studien untersuchen Mutationen in den Genen für TLR-4 (Asp299Gly und Thr99Ile) und TLR-2 (Arg677Trp und Arg753Gly), die mit herabgesetzter Immunantwort bei parodontalen Erkrankungen assoziiert werden. Die Ergebnisse sind widersprüchlich (Brett et al. 2005). Bei Patienten mit lokalisierter aggressiver Parodontitis konnte eine signifikant höhere Expression des TLR-2-Gens nachgewiesen werden als bei gesunden Kontrollen. Für die generalisierte aggressive Parodontitis konnte jedoch kein Zusammenhang mit Polymorphismen im TLR-2-Gen nachgewiesen werden (Sørensen et al. 2008).

Wiederholte in-vitro Stimulation von PMNs mit LPS erzeugte Endotoxintoleranz und reduzierte Fähigkeit der Zytokinfreisetzung bei diesen Zellen, was auf eine reduzierte Expression von TLR-2 und TLR-4 mRNA zurückgeführt wurde. In situ Versuche an erkrankter und gesunder Gingiva ließen vermuten, dass eine ähnliche Form von Endotoxintoleranz in der oralen Mukosa bei Patienten mit chronischer Parodontitis vorliegt (Muthukuru et al. 2005). In einer Folgeuntersuchung konnte nachgewiesen werden, dass PMNs von Patienten mit chronischer Parodontitis eine verringerte Kapazität der Heraufregulierung von TLR-2, TLR-4 sowie IL-1 β im Vergleich mit gesunden Probanden aufweisen (Muthukuru & Cutler 2006). Sowohl TLR-Polymorphismen als auch die Möglichkeit, Toleranz gegenüber LPS auszubilden könnten demnach immunologische Unterschiede zwischen chronischer und aggressiver Parodontitis darstellen.

Dendritische Zellen werden ebenfalls in ihrer Bedeutung für die Ausprägung verschiedener parodontaler Erkrankungen diskutiert. Es wurde gezeigt, dass bei

chronischer Parodontitis die Anzahl von Langerhans-Zellen entsprechend der Schwere der parodontalen Erkrankung abnimmt (Séguier et al. 2000). In Infiltraten parodontaler Läsionen waren CD83+ B-Zellen die entscheidenden antigenpräsentierenden Zellen (Gemmell et al. 2002). Jotwani et al. beobachteten bei chronischer Parodontitis einen Anstieg der Anzahl unreifer CD1a+ dendritischer Zellen in der Epidermis erkrankten Epithels, wohingegen die Anzahl CD83+ gereifter dendritischer Zellen (antigenpräsentierend) in der Lamina propria zunahm (Jotwani et al. 2001). Bei Patienten mit aggressiver Parodontitis scheint die Aktivität dendritischer Zellen erhöht zu sein, was IgG2-vermittelte Immunantworten fördert (Tew et al. 2012). So ist die Reifung von Monozyten bei Individuen mit lokalisierter aggressiver Parodontitis zugunsten der Entwicklung dendritischer Zellen verschoben und geht mit erhöhter IgG2-Antwort einher, die als spezifisch für das stimulierende Pathogen, z.B. *P. gingivalis* (Kikuchi et al. 2005), nachgewiesen wurde. Dendritische Zellen regen außerdem die IFN- γ -Produktion durch natürliche Killerzellen an, was wiederum die IL-12-Freisetzung aus dendritischen Zellen stimuliert. IL-12 initiiert und unterhält die Th1-vermittelte Immunantwort, die mit der Generierung spezifischer Antikörper assoziiert wird (Ohlrich et al. 2009). Die Interaktion zwischen *P. gingivalis*, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen führt folglich zu reziproker Stimulation der Immunzellen und erhöhter Typ-I-Zytokinproduktion.

Es wurde festgestellt, dass Patienten mit generalisierter aggressiver Parodontitis bei größeren Mengen parodontopathogener Bakterien reduzierte IgG- und IL-10-Mengen in der gingivalen Sulkusflüssigkeit im Vergleich zu Patienten mit chronischer Parodontitis aufweisen (Casarin et al. 2010). Dies deutet auf ein Ungleichgewicht der Immunantwort bei Patienten mit generalisierter aggressiver Parodontitis hin und könnte Hinweis auf Funktionsstörungen oder einen Mangel gereifter dendritischer Zellen bei Patienten mit generalisierter aggressiver Parodontitis sein.

Regulatorische T-Zellen scheinen in chronischen Phasen der Parodontitis für die Regulation der gingivalen Entzündung und des parodontalen Knochenabbaus von Bedeutung zu sein (Kobayashi et al. 2011). Das Auftreten von CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen zusammen mit der erhöhten Expression von FoxP3 wurde in Gingivabiopsien aus Geweben mit chronischer Parodontitis häufiger gefunden als aus Geweben mit Gingivitis (Nakajima et al. 2005). Des Weiteren war die Expres-

sion von FoxP3- und CD25-mRNA in aktiven parodontalen Läsionen höher als in inaktiven Läsionen (Ito et al. 2005). Zhao et al. konnten bei Patienten mit generalisierter aggressiver Parodontitis herabgesetzte Anzahl und verringerte Funktion von regulatorischen T-Zellen (CD4+, CD25+) im peripheren Blut nachweisen als bei Patienten mit chronischer Parodontitis und gesunden Kontrollen (Zhao et al. 2009). Ergebnisse von Dutzan et al. führen zur Annahme, dass FoxP3-positive Zellen ohne regulatorische Funktion eine Rolle in der Pathogenese von aktiven Parodontalläsionen spielen, indem sie die Synthese von TGF- β und IL-10 reduzieren, was wiederum zur Überexpression der Zytokine IL-17 und RANKL durch Th17-Zellen führt (Dutzan et al. 2009). FoxP3-positive regulatorische T-Zellen wurden hingegen mit reduzierter RANKL-Expression in parodontal erkrankten Geweben assoziiert (Ernst et al. 2007).

In der Sulkusflüssigkeit von Patienten mit aggressiver Parodontitis konnten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe signifikant höhere Konzentrationen von MCP-1 und RANTES festgestellt werden, die positiv mit Taschentiefen und klinischem Attachmentlevel korrelierten. Dies könnte eventuell Hinweis auf die Bedeutung dieser Chemokine in der Pathogenese der generalisierten aggressiven Parodontitis sein (Emingil et al. 2004; Ford et al. 2010). MCP-1 ist ein Chemokin, das chemotaktisch auf Monozyten und Makrophagen wirkt, dabei aber relativ spezifisch für Monozyten ist. Es wird durch Fibroblasten, Endothelzellen und mononukleäre Phagozyten gebildet. Mit steigender Entzündung nehmen Ausmaß der MCP-1-Produktion und Anzahl mononukleärer Phagozyten zu (Yu & Graves 1995). MCP-1 kann die IL-4-Produktion induzieren und scheint in die Th2-Polarisation involviert zu sein (Gu et al. 2000). RANTES wird von gingivalen Keratinozyten exprimiert, allerdings in geringerer Menge als andere Chemokine. Die Expression verringert sich bei erhöhter Entzündungsreaktion, was eventuell auf eine Rolle des Chemokins in frühen wie auch in späten Entzündungsstadien hindeutet. RANTES stellt einen wirksamen Chemoattraktor für eosinophile Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen und Th1-Zellen dar; es hat keine Wirkung auf Th2-Zellen (Siveke & Hamann 1998). Bei der Untersuchung von Gingivabiopsien und Sulkusflüssigkeit gesunder Probanden und von Patienten mit moderater bis fortgeschrittener Parodontitis konnten ausschließlich bei Parodontitis-Patienten

CCR5/RANTES-Rezeptor-positive Zellen in den Gingivabiopsien und RANTES in gingivaler Sulkusflüssigkeit nachgewiesen werden. Nach Parodontistherapie wurden reduzierte Zellzahlen mit CCR5-Expression und erniedrigte RANTES-Spiegel in der Sulkusflüssigkeit festgestellt. Dies lässt auf einen Zusammenhang zwischen dem Chemokin und der Schwere der parodontalen Entzündung schließen (Gamonal et al. 2001).

Die Untersuchung von CRP-, Zytokin- (IL-1 β , IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , IP-10, TNF- α) und Chemokin-Konzentrationen (IL-8, VEGF, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β) im Blut von Patienten mit chronischer und aggressiver Parodontitis zeigte bislang keine Unterschiede im entzündlichen Profil für die beiden Erkrankungsformen (Cairo et al. 2010).

EMAP-II ist ein Zytokin-ähnliches Molekül mit starker biologischer Wirkung auf Aktivität und Funktion von mononukleären und polymorphkernigen Phagozyten (Tas & Murray 1996). Die Stimulation von Monozyten in Kultur mit EMAP-II führte zur Produktion von IL-8, TNF- α und Tissue factor (Kornmann 1997). EMAP-II-Spiegel waren, verglichen mit gesunden Probanden und Patienten, die unter Gingivitis litten, bei Patienten mit generalisierter aggressiver Parodontitis in der Sulkusflüssigkeit signifikant erhöht. Es zeichnete sich ein Trend der höheren Expression von EMAP-II im Sulkusfluid von Patienten mit generalisierter aggressiver Parodontitis im Vergleich zu Patienten mit chronischer Parodontitis ab (Emingil et al. 2005). Die Produktion von EMAP-II durch Monozyten im Parodontium steigert möglicherweise die rasche und schwere parodontale Destruktion bei generalisierter aggressiver Parodontitis (Ford et al. 2010).

Ätiologie und Pathogenese der aggressiven Parodontitis sind nicht endgültig geklärt. Aggressive und chronische Parodontitis scheinen von Plasmazellen dominiert und Th2-Zell-vermittelt zu sein (Smith et al. 2010; Ford et al. 2010). Die Regulierung des Knochenverlustes scheint sich in ihren biochemischen Abläufen bei aggressiven und chronischen Parodontitiden lediglich bezüglich der Progressionsgeschwindigkeit zu unterscheiden (Bartold et al. 2010). Dem Aspekt der Selbstlimitierung bei Parodontitiden kommt eine besondere Bedeutung aus immunologischer Sicht zu.

2. Ziel der Untersuchung

In dieser Arbeit geht es darum, Fehlfunktionen des Immunsystems, die mit der Ausprägung des Krankheitsbildes der aggressiven Parodontitis im Zusammenhang stehen könnten, zu identifizieren. Die mikrobiologische Untersuchung soll der Herstellung einer Vergleichbarkeit mit bisherigen Publikationen, welche die Pathogenese der aggressiven Parodontitis vor allem in Verbindung mit dem Vorhandensein spezifischer parodontopathogener Keime untersucht haben, dienen. Weiterhin soll explorativ der Zusammenhang einzelner Parodontopathogene mit immunologischen Befunden untersucht werden.

Die Zielsetzung besteht darin, einen Konzeptvorschlag für das Risikoprofil von Patienten, die an aggressiver Parodontitis erkrankt sind, zu entwerfen.

Zu diesem Zweck sollte die immunologische Charakterisierung von Patienten mit aggressiver Parodontitis, Patienten mit moderater chronischer Parodontitis sowie gesunden Kontrollprobanden durchgeführt werden mit der Fragestellung, ob diese sich in Beziehung zum parodontalen Gesundheitszustand und mikrobiologischen Befund bringen lässt.

Die Diagnosestellung erfolgte anhand klinischer und radiografischer Befunde, orientiert an der Parodontitisklassifikation nach Armitage, 1999.

Folgende Hypothesen werden untersucht:

1. Im Anteil der IL-4-produzierenden T-Zellen lassen sich Unterschiede zwischen Patienten mit aggressiver Parodontitis gegenüber Patienten mit chronischer Parodontitis und gesunden Probanden nachweisen.
2. Das Th1/Th2-Zellverhältnis ist bei Patienten mit aggressiver Parodontitis erniedrigt im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.
3. Die Stimulierbarkeit der IL-1 β - und IL-8-Expression der PBMCs durch bakterielle und virale Antigene unterscheidet sich zwischen den Probandengruppen.
4. Die mikrobielle Besiedelung unterscheidet sich zwischen den Patientengruppen nicht. Es lassen sich Unterschiede zwischen Patientengruppen und der gesunden Kontrollgruppe nachweisen, insbesondere bezüglich des Nachweises gramnegativer anaerober parodontopathogener Spezies.

3. Material und Methoden

3.1. Patienten

Die Patientenakkreditierung erfolgte aus dem Patientenstamm des Funktionsbereiches Parodontologie der Poliklinik für Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie des Universitätsklinikums Leipzig. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Universität Leipzig genehmigt. Alle Studienteilnehmer gaben die schriftliche Einverständnis- und Datenschutzerklärung ab und füllten vor Untersuchungsbeginn einen Fragebogen aus, durch den Informationen zu allgemeinem Gesundheitszustand, familiärer Anamnese und Mundhygienegewohnheiten gewonnen wurden.

Die Unterteilung der teilnehmenden Probanden erfolgte gemäß der Fragestellung in drei Gruppen: Patienten mit **lokalisierter oder generalisierter aggressiver Parodontitis**, Patienten mit **lokalisierter oder generalisierter moderater chronischer Parodontitis** und **gesunde Probanden**. Alle Studienteilnehmer sind kaukasischer Ethnizität und Nichtraucher oder Gelegenheitsraucher mit einem Zigarettenkonsum von maximal 10 Zigaretten pro Woche (Gonzales et al. 2007). Bei ehemaligen Rauchern wurde eine Zeitspanne von mindestens fünf Jahren seit dem Einstellen des Rauchens als Einschlusskriterium vorausgesetzt. Bei weiblichen Studienteilnehmern galten Schwangerschaft oder Stillen als Ausschlusskriterien. Des Weiteren führten systemische Erkrankungen, welche den Verlauf einer Parodontitis beeinflussen könnten, zum Ausschluss aus der Studie. Die untersuchten Patienten durchliefen in den letzten sechs Monaten vor dem Untersuchungszeitpunkt keine Antibiotikatherapie oder Behandlung mit Immunsuppressiva. Ein- und Ausschlusskriterien für die einzelnen Gruppen sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Die Diagnosestellung erfolgte unter Berücksichtigung der allgemeinmedizinischen sowie speziellen Anamnese der Probanden und anhand der Ergebnisse einer sorgfältigen klinischen Untersuchung.

Tabelle 1: Definition der Probandengruppen

Probandengruppe	Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<i>Gesund oder leichte Gingivitis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Alter: 21 bis 35 Jahre • TT < 4mm an allen Zähnen mit Ausnahme distaler Pseudotaschen an den 8ern • AL < 2mm 	<ul style="list-style-type: none"> • in der Vorgeschichte parodontale Erkrankungen
<i>aggressive Parodontitis (lokalisiert oder generalisiert)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Diagnosestellung erfolgte vor dem 35. Lebensjahr, auch nachträglich anhand von Röntgenbildern, die vor dem 35. Lebensjahr entstanden sind (Gonzales et al. 2007) • rasch fortschreitender Haltegewebsabbau nachgewiesen (Lang et al. 1999) • wenn möglich familiäre Aggregation • mindestens 20 verbliebene Zähne • PD, AL \geq 5mm an mindestens zwei verbliebenen Zähnen • Knochenverlust im Röntgenbild \geq 50 % an mindestens zwei verschiedenen Zähnen (Guentsch et al. 2009) 	<ul style="list-style-type: none"> • lokale Risikofaktoren wie insuffiziente Restaurationen oder schlechte Mundhygiene, die als Ursache für die Parodontitis in Frage kommen (Lang et al. 1999)
<i>moderate chronische Parodontitis (lokalisiert oder generalisiert)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 30 bis 60 Jahre bei Diagnosestellung • Ausmaß der parodontalen Destruktion entspricht den lokalen Risikofaktoren (Lindhe et al. 1999) • TT \geq 4mm, AL = 3-4 mm an mindestens drei Zähnen in mindestens zwei verschiedenen Quadranten 	<ul style="list-style-type: none"> • schnelle Progression (Lindhe et al. 1999)

TT: Taschentiefe; AL: Attachmentlevel

Die Diagnosestellung erfolgte anhand klinischer und röntgenografischer Befunde. Bei jedem Studienteilnehmer wurden folgende klinische Parameter anhand von Sechspunktmessung erhoben: Taschentiefe (TT), klinisches Attachmentlevel (CAL: Abstand zwischen Schmelz-Zement-Grenze bis zum Boden der parodontalen Tasche) und Sondierungsblutung (BOP: Ja/Nein-Entscheidung und als Prozentsatz der Gesamtzahl an Messpunkten angegeben). Zur Bewertung der Mundhygiene wurde der Approximal-Plaque-Index (API, Lange et al. 1977) nach Anfär-

ben der Beläge mittels „Mira 2 Ton“ (Hager und Werken, Düsseldorf, Deutschland) erhoben. Die Entzündung der Gingiva wurde mit dem modifizierten Sulkus-Blutungsindex (SBI) beurteilt. Beide Indizes arbeiten mit einer Untersuchung des Approximalraum-/Papillenbereiches und werden in Form von „Ja-Nein-Entscheidungen“ erhoben. Sondierung und Messung erfolgte mittels Parodontometer UNC#UNC15 (Hu-Friedy, Leimen, Deutschland).

3.2. Materialien und Geräte

3.2.1. Blutentnahmen

Die Blutentnahme erfolgte mittels Vacutainer Systems Safety-Lok™ Blood Collection System (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA). Es wurden 18 ml Heparin-Blut in CPT™ Cell Preparation Tubes und 6 ml EDTA-Blut in Vacutainer®-EDTA-Röhrchen (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) entnommen. Die Entnahme wurde in der Ellenbeuge, meist aus der Vena mediana cubiti oder einer anderen zugänglichen Vene, durchgeführt. Nach der Entnahme wurden die Proben innerhalb von drei Stunden in das Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin zur Weiterverarbeitung überführt. Bis zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Lagerung bei Raumtemperatur. Das EDTA-Blut jedes Patienten diente der Bestimmung eines allgemeinen Immunstatus nachdem 0,5 ml EDTA-Blut eingefroren worden waren. Das heparinisierte Blut wurde, wie in Abschnitt 3.3.1. beschrieben, weiterverarbeitet.

3.2.2. Lymphozytenpräparation

Reagenzien:		
Bezeichnung	Lagertemperatur	Hersteller
<i>Fötales Kälberserum</i>	2-8 °C	PAA, Pasching, Österreich
<i>PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung), steril</i>	Raumtemperatur	Eigene Herstellung nach Protokoll SOP 4-401

Verbrauchsmaterial:	
Bezeichnung	Hersteller
<i>Serologische Pipetten 10 ml, steril</i>	Sarstedt, Nümbrecht, D
<i>Pipettenspitzen, steril</i>	Sarstedt, Nümbrecht, D
<i>Serumpipette/ Pasteurpipette, steril</i>	Greiner, Frickenhausen, D
<i>Polypropylen Einwegröhrchen 15/50 ml, steril</i>	Sarstedt, Nümbrecht, D

Geräte:	
Bezeichnung	Hersteller
<i>Variable Pipette für den Bereich 100-1000 µl</i>	Eppendorf, Hamburg, D
<i>Kühlzentrifuge Rotana 46RS</i>	Hettich, Tuttlingen, D
<i>Sterilbank Clean Air</i>	Clean Air Technik B.V., Woerden, Niederlande

3.2.3. Einfrieren und Auftauen der PBMCs

Reagenzien:		
Bezeichnung	Lagertemperatur	Hersteller
<i>Fötales Kälberserum (FKS)</i>	2–8 °C	PAA, Pasching, Österreich
<i>Zellzuchtmedium RPMI 1640 mit L-Glutamin und HEPES, Cat. No: E-15-842</i>	2–8 °C	PAA, Pasching, Österreich
<i>DMSO</i>	Raumtemperatur	AppliChem, Darmstadt, D
<i>PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung), steril</i>	Raumtemperatur	Eigene Herstellung nach Protokoll SOP 4-401
<i>Trypanblau-Lösung (0,4 %)</i>	Raumtemperatur	Sigma Aldrich, St. Gallen, CH

Verbrauchsmaterial:	
Bezeichnung	Hersteller
<i>Serologische Pipetten 5/10 ml, steril</i>	Sarstedt, Nümbrecht, D
<i>Pipettenspitzen, steril</i>	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, D
<i>CryoTube™ Vials (1,0 ml)</i>	Nunc, Roskild, DK
<i>Polypropylen Einwegröhrchen 15/50 ml, steril</i>	Sarstedt, Nümbrecht, D

Geräte:	
Bezeichnung	Hersteller
<i>Variable Pipette für den Bereich 100–1000 µl</i>	Eppendorf, Hamburg, D
<i>Kühlzentrifuge Rotana 46RS</i>	Hettich, Tuttlingen, D
<i>Sterilbank Clean Air</i>	Clean Air Technik B.V. Woerden, NL

3.2.4. Durchflusszytometrie

3.2.4.1. Bestimmung der intrazellulären Zytokine

Reagenzien:		
Bezeichnung	Lagertemperatur	Hersteller
<i>Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)</i>	-10 bis -30 °C	Sigma Aldrich, St. Gallen, CH
<i>Ionomycin</i>	-10 bis -30 °C	Calbiochem/Millipore, Illinois, USA
<i>Monensin</i>	-10 bis -30 °C	Sigma Aldrich, St. Gallen, CH

<i>Fixierpuffer für ICS</i>	2–8 °C	Eigene Herstellung nach Protokoll SOP 4-401
<i>Permeabilisierungspufferkonzentrat</i>	2–8 °C	Eigene Herstellung nach Protokoll SOP 4-401
<i>Fötales Kälberserum (FKS), hitzeinaktiviert</i>	2–8 °C	PAA, Pasching, Österreich
<i>Zellzuchtmedium RPMI 1640 mit L-Glutamin und HEPES, Cat. No: E-15-842 gemischt mit 10% FKS und Penicillin/ Streptomycin</i>	2–8 °C	PAA, Pasching, Österreich
<i>PBS mit 1 % FKS (Waschpuffer)</i>	2–8 °C	Biochrom, Tutzing, D
<i>Fixierpuffer (PBS mit 1 % Formaldehyd)</i>	Raumtemperatur	Eigene Herstellung nach Protokoll SOP 4-401

Verbrauchsmaterial:

Bezeichnung	Hersteller
<i>FACS-Röhrchen</i>	Falcon, BD Bioscience
<i>Pipettenspitzen, kristall, gelb, blau</i>	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, D

Geräte:

Bezeichnung	Hersteller
<i>Blutprobenmischer</i>	Karl Hecht
<i>Vortex Genie 2</i>	Heraeus, Ohio, USA
<i>Variable Pipette für die Bereiche 1–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl</i>	Eppendorf, Hamburg, D
<i>Dispensierpipette mit Spitzen</i>	Eppendorf, Hamburg, D
<i>CO₂-Inkubator</i>	Heraeus, Ohio, USA
<i>Kühlzentrifuge Rotana 46RS</i>	Hettich, Tuttlingen, D
<i>FACS Canto II</i>	BD Biosciences

3.2.4.2. CVID-Panel**Reagenzien:**

Bezeichnung	Lagertemperatur	Hersteller	
<i>IgD FITC</i>	2–8 °C	BD Pharmingen	5 µl
<i>CD21 PE</i>		BD Pharmingen	5 µl
<i>CD5 Per-Cy5.5</i>		BD Biosciences	10 µl
<i>CD38 PE-Cy7</i>		BD Biosciences	2,5 µl
<i>IgM APC</i>		BD Pharmingen	10 µl
<i>CD27 APC-H7</i>		BD Pharmingen	2,5 µl
<i>CD24 Pacific Blue</i>		EXBIO Praha	2 µl
<i>CD19 AmCyan</i>	BD Biosciences	2,5 µl	
Antikörper für gebrauchsfertige Lösung mischen			
<i>Maus Normalserum</i>	2–8 °C	Dako	
<i>Ziege Normalserum</i>		Dako	10µl
Beide Seren für gebrauchsfertige Lösung mischen			10µl
<i>BD-Lyse</i>	Raumtemperatur	BD Biosciences	
<i>PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)</i>	Raumtemperatur	Eigene Herstellung nach Protokoll SOP 4-401	

<i>PBS mit 1% Formaldehyd (Fixierpuffer)</i>	Raumtemperatur	Eigene Herstellung nach Protokoll SOP 4-401
--	----------------	---

Verbrauchsmaterial:

Bezeichnung	Hersteller
<i>FACS-Röhrchen</i>	Falcon, BD Bioscience

Geräte:

Bezeichnung	Hersteller
<i>Blutprobenmischer</i>	Karl Hecht, Sondheim, D
<i>Vortex Genie</i>	Heraeus, Ohio, USA
<i>Variable Pipette für die Bereiche 1–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl</i>	Eppendorf, Hamburg, D
<i>Dispensierpipette mit Spitzen</i>	Eppendorf, Hamburg, D
<i>Kühlzentrifuge Rotana 46RS</i>	Hettich, Tuttlingen, D
<i>FACS Canto II</i>	BD Biosciences, San José, USA

3.2.5. ELISpot-Assay**Reagenzien:**

Bezeichnung	Lagertemperatur	Hersteller
<i>Fötales Kälberserum (FKS), hitzeinaktiviert</i>	2–8 °C	PAA, Pasching, A
<i>Zellzuchtmedium RPMI 1640 with L-Glutamin, HEPES, Cat. No: E-15-842, gemischt mit 10% FKS</i>	2–8 °C	PAA, Pasching, A
<i>PBS (Phosphat- gepufferte Salzlösung), steril</i>	Raumtemperatur	Eigene Herstellung nach Protokoll SOP 4-401
<i>Streptavidin-Alkaline Phosphatase (3310-10)</i>	4 °C	MABTECH AB, Hamburg, D
<i>gefiltertes (0,45µm) BCIP/NBT-Substrat</i>	Raumtemperatur	Sigma Aldrich, St. Gallen, CH
<i>Leaf™ Purified anti-human IL-1β (JK1B-1)</i>	4 °C	BioLegend/Biozol, Eching, D
<i>Biotin anti-human IL-1 β (JK1B-2)</i>	4 °C	BioLegend/Biozol, Eching, D
<i>Leaf™ Purified anti-human IL-1β (JK1B-1)</i>	4 °C	BioLegend/Biozol, Eching, D
<i>Biotin anti-human IL-1 β (JK1B-2)</i>	4 °C	BioLegend/Biozol, Eching, D
<i>Human CCL5/RANTES Development Module Catalog Number: SEL278</i>	4 °C	R&D Systems, Minneapolis, USA
<i>ELISpot Blue Color Module</i>	2–8 °C	R&D Systems, Minneapolis, USA
<i>Tween 20® pure</i>	Raumtemperatur	Serva, Heidelberg, D
<i>Sucrose</i>	Raumtemperatur	Sigma Aldrich, St. Gallen, CH
<i>Probumin (Bovines Serumalbumin), Code 82-045-1</i>	2–8 °C	Millipore, Illinois, USA
<i>Ethanol absolut</i>	Raumtemperatur	J. T. Baker, Deventer, NL
<i>Porphyromonas gingivalis LPS (Catalog # tlrpglps)</i>	-20 °C	Invivo Gen, San Diego, USA

<i>Lipopolysaccharid (L 2654)</i>	-20 °C	Sigma-Aldrich, St. Gallen, CH
<i>Pneumococcal cell wall polysaccharide mixture (CWPS multi) (Bestellnr.: 68866)</i>	-20 °C	Statens Serum Institute, Kopenhagen, DK
<i>CEF Peptide pool</i>	-20 °C	Gen ID GmbH, Straßberg, D
<i>Steriles destilliertes Wasser</i>	Raumtemperatur	Eigene Herstellung nach Protokoll SOP 4-401

Verbrauchsmaterial:

Bezeichnung	Hersteller
<i>96-Well Filtration Plate MultiScreen; 0,45 µm Hydrophobic High Protein</i>	Millipore, Dublin, Irland
<i>BD™ ELISPOT Plates, Cat. No.: 51-2447KC</i>	BD Biosciences, San Diego, USA
<i>Pipettenspitzen, steril</i>	Karl Roth GmbH, Karlsruhe, D
<i>Gewebekulturschalen</i>	Eppendorf, Hamburg, D

Geräte:

Bezeichnung	Hersteller
<i>Sterilbank Clean Air</i>	Clean Air Technik B.V. Woerden, Niederlande
<i>Variable Pipette für den Bereich 1–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl</i>	Eppendorf, Hamburg, D
<i>Multichannel-Pipette (100–300 µl)</i>	Eppendorf, Hamburg, D
<i>Vortex-Genie 2</i>	Heraeus, Ohio, USA
<i>CO₂-Inkubator</i>	Heraeus, Ohio, USA
<i>ELISpot-Reader</i>	AID, Straßberg, D

3.2.6. Mikrobiologische Diagnostik

Die Entnahme des Probenmaterials erfolgte an den 4 Stellen mit den höchsten Taschentiefen, möglichst aus vier unterschiedlichen Quadranten, mittels steriler Papierspitzen der Iso-Größe 50. Es wurde eine Papierspitze per Situs verwendet. Die vier Papierspitzen wurden in ein Eppendorf-Gefäß mit 1 ml BHI-Bouillon gegeben. Weiterverarbeitung und Analyse erfolgten unverzüglich im Anschluss an die Probeentnahme im Institut für Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie der Universität Leipzig durch Frau Dr. Stingu. Stämme für die Sequenzierung wurden bei -80 °C eingefroren.

3.2.6.1. Kultur**Reagenzien:**

Bezeichnung	Lagertemperatur	Hersteller
<i>BHI-Bouillon (als Pulver, lt. Packungsbeilage)</i>	2–8 °C	Oxoid, Wesel, D
<i>Columbia-Blut-Agar</i>	2–8 °C	Oxoid, Wesel, D

<i>Tryptic Soy Bacitracin Vancomycin</i>	2–8 °C	Oxoid, Wesel, D
<i>API-Suspensionsmedium</i>	Raumtemperatur	BioMérieux, Lyon, F
<i>Schafsblut, Hemin</i>	2–8 °C	Sigma-Aldrich, St. Gallen, CH
<i>Vitamin K</i>	2–8 °C	Oxoid, Wesel, D
<i>Gentamycin</i>	2–8 °C	Oxoid, Wesel, D
<i>McFarland-Standard 4</i>	Raumtemperatur	BioMérieux, Lyon, F

Verbrauchsmaterial:

Bezeichnung	Hersteller
<i>Pipettenspitzen, steril</i>	Sarstedt, Nümbrecht, D
<i>Drigalski-Spatel</i>	TechLab, Waville, F
<i>Safe-Lock. Tubes</i>	Eppendorf, Hamburg, D
<i>Gewebekulturschalen</i>	Eppendorf, Hamburg, D
<i>Rapid ID 32A Teststreifen (2–8 °C)</i>	BioMérieux, Lyon, F
<i>AnIdent-Testringe (2–8 °C)</i>	Oxoid, Wesel, D
<i>Ösen</i>	Sarstedt, Nümbrecht, D
<i>Invisorb® Spin PCRapid Kit</i>	Invitek, Berlin, D

Geräte:

Bezeichnung	Hersteller
<i>Variable Pipette für den Bereich 10–100 µl</i>	Eppendorf, Hamburg, D
<i>Anaerobier Box</i>	WHITLEY MG1000 anaerobic work station, Lähden-Holte, D
<i>Vortex-Mischer VF2</i>	IKA-Labortechnik, Staufen, D
<i>CO₂-Inkubator</i>	Heraeus, Ohio, USA
<i>Mini-API-Reader</i>	BioMérieux, Lyon, F

3.2.6.2. Sequenzierung mit eubakteriellen Primern**Reagenzien:**

Bezeichnung	Lagertemperatur	Hersteller
<i>Aqua dest. (DNAse und RNAse frei)</i>	Raumtemperatur	Quiagen, Hilden, D
<i>DNeasy® Blood and Tissue Kit</i>	Raumtemperatur	Qiagen, Hilden, D
<i>Gene Amp® PCR Buffer II & MgCl₂-Lösung</i>	-20 °C	Roche, Branchburg, USA
<i>dNTP's</i>	-20 °C	Roche, Branchburg, USA
<i>10 µM BAK</i>	-20 °C	Biometra, Göttingen, D
<i>10 µM PC3mod</i>	-20 °C	Biometra, Göttingen, D
<i>Invisorb® Spin PCRapid Kit</i>	Raumtemperatur	Invitek, Berlin, D
<i>Ethanol absolut</i>	Raumtemperatur	J. T. Baker, Deventer, NL
<i>Natrium-Acetat</i>	4 °C	Sigma-Aldrich, St. Gallen, CH

Verbrauchsmaterialien:

Bezeichnung	Hersteller
<i>Eppendorf-Tubes</i>	Eppendorf, Hamburg, D
<i>Filter tip FT 1000 (E)</i>	Greiner, Frickenhausen, D
<i>Polypropylen Einwegröhrchen 50 ml</i>	Sarstedt, Nümbrecht, D
<i>Agarose-Gel</i>	Oxoid, Wesel, D

Geräte:

Bezeichnung	Hersteller
<i>Biofuge fresco</i>	Heraeus, Hanau, D
<i>Thermomixer 5437</i>	Eppendorf, Hamburg, D
<i>T-Gradient (PCR-Block)</i>	Biometra, Göttingen, D

3.3. Methoden

3.3.1. Zellbearbeitung

Alle Abschnitte der Zellbearbeitung außer Zentrifugation und Zellzählung erfolgten unter sterilen Bedingungen.

3.3.1.1. Lymphozytenpräparation

Nach der Blutentnahme mittels zwei Vacutainerröhrchen (CPT™ Cell Preparation Tube) á 9 ml erfolgte die Zentrifugation für 20 Minuten bei 1718 x g, Bremse 9/Anlauf 9 und Raumtemperatur. Der entstandene Lymphozytenring wurde mittels Serumpipette abgesaugt und in PBS im 50 ml Einwegröhrchen aufgenommen. Anschließend erfolgten das Auffüllen des Einwegröhrchens auf 50 ml mit PBS und erneute Zentrifugation für zehn Minuten bei 430 x g, Bremse 6/Anlauf 6 und Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in PBS resuspendiert. Nach dem Auffüllen des Röhrchens auf 50 ml mit PBS folgte erneut die Zentrifugation für zehn Minuten bei 430 x g, Bremse 6/Anlauf 6 und Raumtemperatur. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 1500 µl FKS resuspendiert und in 3 Aliquoten kryokonserviert.

3.3.1.2. Kryokonservierung

Die Kryokonservierung erfolgte in 3 Aliquoten. Nach der Beschriftung der Kryoröhrchen mit der patientenspezifischen Identifikationsnummer wurden in den Kryoröhrchen auf Eis 100 µl DMSO und 400 µl FKS vorgelegt und jeweils 500 µl der

Zellsuspension zugegeben. Die Kryoröhrchen wurden unverzüglich in einer Nalgene-Einfrierbox (Isopropanol-Füllung und bei 2 bis 8 °C im Kühlschrank gelagert) in einen -80 °C Kühlschrank überführt. Die Umsetzung aus der Nalgene-Box in die Probenbox im -80 °C Kühlschrank erfolgte am nächsten Tag. Alle Kryoröhrchen wurden spätestens zwei Wochen nach Kryokonservierung in Stickstoff überführt.

3.3.1.3. Auftauen der kryokonservierten PBMCs

Zellkulturmedium (RPMI + 10 % FKS) wurde auf 37 °C vorgewärmt und pro aufzetauender Probe wurden 8 ml Medium in einem 15 ml Einwegröhrchen vorgelegt. Die aus dem Stickstoff entnommenen Kryoröhrchen wurden im Wasserbad bei 37 °C zu 50 % aufgetaut und anschließend in die vorbereiteten Einwegröhrchen tröpfchenweise überführt; es erfolgte eine Rückpipettierung. Anschließend wurde das Röhrchen auf 15 ml mit 37 °C warmem Medium aufgefüllt und für zehn Minuten bei 342 x g, Bremse 9/Anlauf 9 und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Zellüberstand wurde verworfen, die Zellen in 1 ml Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Dazu wurden 50 µl Zellsuspension entnommen und mit 50 µl Trypanblau angefärbt, um die Zellen sichtbar zu machen und ihre Vitalität zu prüfen. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer mikroskopisch bestimmt. Für die Durchführung der durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgte keine exakte Einstellung der Zellzahl, die Mindestkonzentration betrug hier $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml, welche bei allen aufgetauten Proben erreicht wurde. Die Proben für das ELISpot-Assay wurden nach Auftauen und Zählen mittels oben genanntem Medium auf die benötigte Zellkonzentration von $3,5 \times 10^4$ Zellen/ml eingestellt.

3.3.2. Durchflusszytometrie

In diesem Verfahren zur Zellvermessung wird die Zellsuspension (Probenstrahl) an einem optischen Messstrahl vorbei geführt. Der Probenstrahl wird durch das Anlegen eines Hüllstromes so verändert, dass die Zellen einzeln den Messpunkt passieren. Durch unterschiedliche Morphologie (Zellgröße und -granularität) wird das Licht verschieden stark gestreut und gleichzeitig wird durch den Einsatz fluoreszierender Marker die Untersuchung molekularer Eigenschaften ermöglicht (Colombo et al. 2008; Sack et al. 2007). Die Durchflusszytometrie dient hauptsächlich der Diagnostik und Verlaufskontrolle zellulärer Immundefekte (Colombo

et al. 2008), der Analyse des DNA-Gehaltes in Tumorzellen und der Bestimmung des Aktivierungsgrades von Immunzellen oder gestörter Zellreifung bei Leukämien (Sack et al. 2007).

3.3.2.1. Bestimmung der intrazellulären Zytokine

Um die Lymphozyten zu stimulieren, werden Kalzium-Ionen, Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (10 ng/ml) und Ionomycin (1 μ M) zu der Zellsuspension (Auftauen der Zellen erfolgte wie oben beschrieben) hinzugegeben mit dem Ziel, die Proteinkinase C zu aktivieren. Die Hemmung des intrazellulären Proteintransportes wird mittels Monensin in der Konzentration 2,5 μ M durchgeführt. Die Inkubation erfolgt für fünf Stunden bei 37 °C im CO₂-Inkubator, anschließend werden die Zellen gewaschen und für 10 Minuten bei 4 °C fixiert. Daran schließen sich die Permeabilisierung und das Anfärben der Zellen an, wobei Oberflächenantigene zur Identifikation der verschiedenen T-Zellpopulationen (CD3, CD4, CD8) und produzierte Zytokine gleichzeitig angefärbt werden. Versuchsdurchführung und Messung mittels Durchflusszytometrie erfolgten im Institut für Klinische Immunologie/Immundiagnostik durch Frau Heike Knaack im Rahmen der Routinediagnostik und gemäß der Standardarbeitsanleitung SOP 4-410 am Facs Canto II. Unter Verwendung der Auswertungssoftware Facs Diva wurden die Messergebnisse in selbständiger Arbeit ausgewertet.

3.3.2.2. CVID-Panel

Die durchflusszytometrische Untersuchung ist ein Teil der Standarddiagnostik bei Patienten mit Verdacht auf CVID geworden. Die Phänotypisierung von B-Zellen identifiziert Patienten mit schweren Defekten der reifungszentrumsabhängigen B-Gedächtniszellbildung, frühen Defekten der B-Zelldifferenzierung und möglichen entzündlichen Veränderungen (Warnatz & Schlesier 2008). Die Einteilung der peripheren B-Zellen kann entsprechend der Freiburger Klassifikation nach Warnatz et al. oder der aktuellen Euro-Klassifikation durchgeführt werden und erfolgt anhand der Identifizierung der Antigenexpression auf Lymphozytensubpopulationen (Abbildung 5). Die verwendeten Antikörper sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert, die so ausgewählt sind, dass sie nach Anregung Signale aussenden, die im Zytometer getrennt ausgewertet werden können.

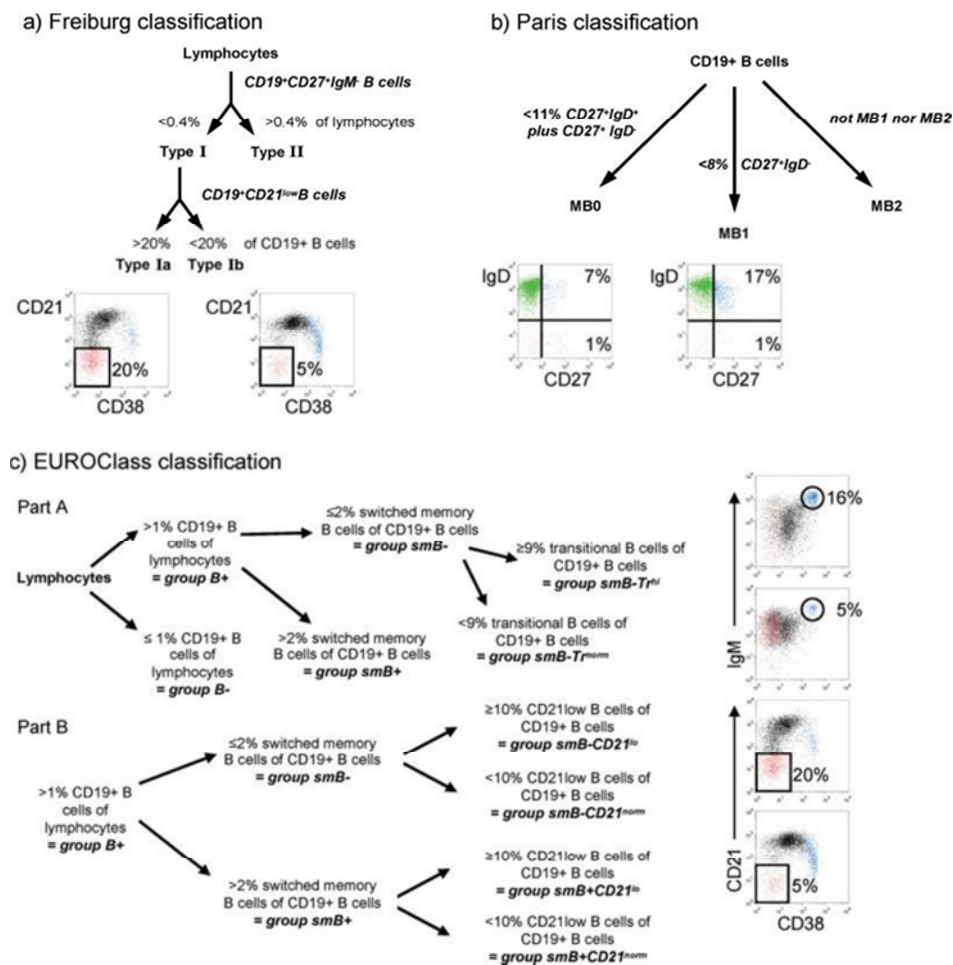


Abbildung 5: B-Zellphänotyp basierte CVID-Klassifikationen; EuroClass-Klassifikation (Warnatz & Schlesier 2008)

Die Versuchsdurchführung erfolgte gemäß der Standardarbeitsanleitung SOP-4-441 durch Frau Heike Knaack.

Es werden je 20 µl des Normalserumgemisches in die FACS-Röhrchen mit der Zellsuspension pipettiert und gut gemischt. Anschließend erfolgt für zehn Minuten die Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Es werden 39,5 µl des Antikörpergemisches in die FACS-Röhrchen gegeben und erneut gut gemischt. Danach schließt sich wiederum eine 15-minütige Inkubation unter den oben genannten Bedingungen an. Nach der Zugabe des Lysepuffers wird erneut für 10 Minuten (gleiche Bedingungen) inkubiert und im Anschluss bei 250 x g fünf Minuten zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abgießen des Überstandes werden die Zellen in 3 ml PBS aufgenommen und gemischt. Es schließt sich ein weiterer Zentrifugations-

schritt an (250 x g, fünf Minuten), nach dem der Überstand wieder abgegossen und die das Zellpellet aufgelockert wird. Im Anschluss an die Fixierung mit 250 µl Fixierlösung kann die Messung erfolgen, welche innerhalb von 24 Stunden bei Lagerung der Zellen im Kühlschrank erfolgen sollte.

Die anschließende Messung erfolgte im FACS Canto II und wurde mit der Software BD FACS-Diva ausgewertet.

3.3.3. ELISpot-Assay

Das Enzyme-Linked-Immunosorbent-Spot-Assay (ELISpot) stellt eine Möglichkeit dar, Zytokinfreisetzung von Immunzellen exakt zu quantifizieren. Die Besonderheit hierbei ist, dass die Zytokinseznierung auf Einzelzellniveau dargestellt wird. Smedman et al. formulierten anhand ihrer Ergebnisse, dass die ELISpot-Technik unter funktionellen Gesichtspunkten eine sinnvolle Methode zur Untersuchung von Zellen der angeborenen Immunität auf Einzelzellniveau darstellen könnte (Smedman et al. 2009).

Die Erstellung des Protokolls für Untersuchung der IL-8- und IL-1 β -Freisetzung mittels ELISpot-Assay ist an der Arbeit von Smedman et al. aus dem Jahr 2009 orientiert, in der mittels ELISpot die Zytokinsekretion bei LPS-Stimulation in PMNs und PBMCs auf Einzelzellniveau untersucht wurde. Die in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden mit *E. coli* LPS, *Porphyromonas gingivalis* LPS, CWPS und CEF-Peptidpool als stimulierende Antigene durchgeführt.

LPS enthalten große, variable Polysaccharid- und Oligosaccharideinheiten sowie eine relativ stark konservierte Lipidregion (Lipid A), die endotoxisch ist und die biologische Aktivität des LPS determiniert (Berezow et al. 2009). Verschiedene gram-negative Pathogene exprimieren unterschiedliche LPS auf ihren Oberflächen und sind somit in der Lage, unterschiedliche PRR zu aktivieren. LPS von Enteropathogenen, wie *Escherichia coli*, stimuliert TLR-2, während das LPS des Oralpathogenes *Porphyromonas gingivalis* sowohl TLR-2 als auch TLR-4 aktivieren kann (Darveau et al. 2004). Die hier durchgeführten Untersuchungen wurden mit hochgereinigtem *P. gingivalis* LPS und *E.coli* LPS vorgenommen. Beide Antigene wurden in

der Arbeitslösung mit einer Konzentration von 200 ng/ml in RPMI-Medium, das mit 10 % FKS angereichert wurde, eingesetzt.

Des Weiteren sollte die Wirkung von Polysacchariden, die in der Zellwand von Pneumokokken vorkommen (CWPS), auf die Freisetzung von IL-8 und IL-1 β untersucht werden. Dabei wurde eine 1:1 Mischung von zwei gereinigten Polysaccharid-Antigenen, die in allen Pneumokokken-Serotypen vorkommen, verwendet. Auch dieses Antigen wurde mit einer Konzentration von 200 ng/ml eingesetzt, was einer Stimulation mit 20 ng CWPS auf 3500 PBMCs entspricht.

Der CEF-Peptidpool besteht aus 23 verschiedenen Peptiden aus Zytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr Virus (EBV) and Influenza Virus (Flu), die gängige Epitope von CD8+ T-Zellen darstellen und durch elf Klasse I HLA-A and HLA-B Allele präsentiert werden (Currier et al. 2002). Der CEF-Peptidpool hat sich als Positivkontrolle bei der Optimierung von ELISpot-Assays zur Untersuchung der IFN- γ Produktion durch Antigen-spezifische menschliche CD8+ T-Zellen bewährt (Currier et al. 2002). In den hier durchgeführten Untersuchungen wird CEF zur Evaluierung der Stimulierbarkeit von IL-8 und IL-1 β -Freisetzung aus PBMCs durch virale Antigene eingesetzt.

Die Versuchsdurchführung des Assays ist im Folgenden dargestellt:

1. Prewetten der Platten mit jeweils 50 μ l 35 % Ethanol/well für 2 Minuten und fünfmal Waschen mit 200 μ l sterilem destillierten Wasser
2. Capture-Antibodies auf Arbeitskonzentration von 7,5 μ g/ml in sterilem PBS lösen und 100 μ l pro Well zugeben; Inkubation über Nacht bei 4 °C
3. Coated Wells fünfmal mit 200 μ l/well sterilem PBS waschen und anschließend die Membran blocken mit 200 μ l Zellkulturmedium/ well für 30 Minuten
4. Es befinden sich je 3500 Zellen in einem Volumen von 200 μ l Medium pro Well einer 96-Well-Platte. Die Zellen werden mit *E. coli* LPS, *Porphyromonas gingivalis* LPS und CWPS (Konzentration der Arbeitslösungen von 200 ng/ml) stimuliert. Als Negativkontrolle werden für jeden Probanden unstimulierte Zellen mitgeführt. Des Weiteren werden Zellen mit CEF (in vorgegebener Lösung) stimuliert.

Die bislang erörterten Arbeitsschritte erfolgten durchweg in steriler Arbeitsweise. Folgende Schritte können unsteril durchgeführt werden.

5. Die stimulierten Zellen in den 5 %-CO₂-inkubator geben und 5 Stunden (IL-8) bzw. 21 Stunden (IL-1 β) bei 37 °C inkubieren.
6. Zellen dann entfernen, indem fünfmal mit 200 μ l/well sterilem PBS gewaschen wird.
7. Biotinylierte Antikörper in PBS mit 0,5 % FKS auf Konzentration von 1 μ g/ml verdünnen und Zugabe von 100 μ l/well
8. Inkubation über Nacht bei 4 °C für IL-8 bzw. für 2 Stunden bei Raumtemperatur für IL-1 β
9. Platten wie oben beschrieben waschen
10. Streptavidin-ALP, gelöst 1:1000 in PBS mit 0,5 % FKS zugeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren
11. erneutes Waschen
12. Platten entwickeln indem 100 μ l/well gefiltertes (0,45 μ m) BCIP/NBT-Substrat zugegeben wird; nach 10 Minuten die Reaktion durch extensives Waschen mit destilliertem Wasser unterbrechen und die Platten bei Raumtemperatur trocknen lassen

Plattendesign: Verteilung der Wells auf den Versuchsplatten: pro Proband 10 wells, Doppelbestimmungen, 9 Patienten pro Platte

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LW	LW	LPS	LPS	CWPS	CWPS	Pg LPS	Pg LPS	CEF	CEF	LW	CEF
B	LW	LW	LPS	LPS	CWPS	CWPS	Pg LPS	Pg LPS	CEF	CEF	LW	CEF
C	LW	LW	LPS	LPS	CWPS	CWPS	Pg LPS	Pg LPS	CEF	CEF	LPS	
D	LW	LW	LPS	LPS	CWPS	CWPS	Pg LPS	Pg LPS	CEF	CEF	LPS	
E	LW	LW	LPS	LPS	CWPS	CWPS	Pg LPS	Pg LPS	CEF	CEF	Pg LPS	
F	LW	LW	LPS	LPS	CWPS	CWPS	Pg LPS	Pg LPS	CEF	CEF	Pg LPS	
G	LW	LW	LPS	LPS	CWPS	CWPS	Pg LPS	Pg LPS	CEF	CEF	CWPS	
H	LW	LW	LPS	LPS	CWPS	CWPS	Pg LPS	Pg LPS	CEF	CEF	CWPS	

LW: Leerwert; LPS: E.coli LPS; CWPS: pneumococcal cell wall polysaccharide; Pg LPS: *Porphyromonas gingivalis* LPS; CEF: Peptidpool aus Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus und Influenza (Flu)-Virus

Das ELISpot-Assay für die RANTES-Freisetzung wurde als kommerziell erhältliches Kit (Human CCL5/RANTES ELISpot Development Module der Firma R&D) auf BDTM ELISPOT Plates (Catalogue No 51-2447KC) durchgeführt. Dabei wurden 3500 Zellen/well eingesetzt und für fünf Stunden unter den oben genannten

Bedingungen und mit denselben Stimulantien inkubiert. Die Farbentwicklung erfolgte mit dem empfohlenen ELISpot Blue Color Module (Catalog Number SEL002).

Die Visualisierung und Zählung der Spots wurde mit dem AID-Spot-Reader automatisiert durchgeführt.

3.3.4. Mikrobiologische Diagnostik

3.3.4.1. Kultur

Die gepoolte Probe wurde 30 Sekunden gevortext und anschließend eine zehnfache Verdünnungsreihe bis 10^{-5} in Thioglycolat-Lösung hergestellt. Von jeder Verdünnung wurden 100 μ l auf Columbia-Blut-Agar (5 % Schafsblut, Hemin (5 μ g/l) und Vitamin K1 (1 μ g/l) zugesetzt) mit und ohne Gentamycin (100 mg) ausgestrichen. Außerdem wurden Teilproben auf TSBV-Platten (nur Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-3}) gegeben, um selektiv *A. actinomycetemcomitans* zu isolieren und zu zählen. Das Ausstreichen erfolgte mittels Drigalski-Spatel.

Anschließend wurden die Columbia-Platten 7 Tage unter anaeroben Bedingungen und die TSBV-Platten 3 Tage in 10 % CO_2 -Atmosphäre bebrütet.

Zur Isolierung wurden für jede Kolonie-Art eine Columbia-Platte und eine viertel Kochblut-Agar-Platte als CO_2 -Kontrolle eingesetzt. Diese wurden vier Tage bebrütet. Fakultativ anaerobe Stämme wurden nicht weiter bearbeitet. Die verbleibenden anaeroben Stämme wurden anhand von Gram-Färbung, Koloniemorphologie, Katalase-Produktion, An-Ident-Testblättchen und Biochemischen Tests (Rapid ID 32A System) identifiziert.

Die Identifizierung von *A. actinomycetemcomitans* erfolgte anhand der typischen Kolonieförmigkeit (sternförmige innere Struktur) und der Produktion von Katalase.

Stämme, die durch den IDA32A-Teststreifen nicht auswertbar waren, wurden bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

3.3.4.2. Sequenzierung mit eubakteriellen Primern

Eingefrorene Stämme wurden durch sequenzielle Analyse der 16S ribosomalen-DNA-Gene identifiziert. Diese Methode macht auch die Detektion von Bakterien möglich, die bislang nicht kultivierbar sind (Paster & Dewhirst 2009). Alle bekannten Taxa und Phyla sind durch die „Humane Oral Microbiome Database“ (HOMD) frei zugänglich recherchierbar (www.homd.org) (Dewhirst et al. 2010).

Nach dem Auftauen der eingefrorenen Bakterienstämme für die Durchführung der Sequenzierung werden mittels "DNeasy® Blood and Tissue Kit" laut der vom Hersteller vorgegebenen Arbeitsanweisung die Templates hergestellt. Zu 2 µl Template werden 48 µl Mastermix (bestehend aus 36,75 µl Aqua dest, 5,0 µl Puffer, 3,0 µl MgCl₂, 1,0 µl dNTPs, 1,0 µl BAK, 1,0 µl PC3mod und 0,25 µl Taq-Polymerase) zugegeben und bei Programm 9 des T-Gradient (PCR-Blog) der DNA-Amplifikation unterzogen. 10 µl des entstandenen PCR-Produktes werden auf ein Agarose-Gel aufgetragen, um den Erfolg der PCR zu evaluieren. Bei Erkennung charakteristischer Banden wird das PCR-Produkt entsprechend der Arbeitsanleitung des verwendeten Invisorb® Spin PCRapid Kits gereinigt. Der sich anschließende Sequenzierungsschritt erfordert die Herstellung eines Mastermix aus 8,0 µl Aqua dest, 4,0 µl markierter dNTPs (aus dem IZKF bezogen) und 1,0 µl BAK als Primer. Diesem werden 4,0 µl DNA zugesetzt. Anschließend erfolgt die Sequenzierung bei Programm 3 im Thermocycler. Das Sequenase-Produkt wird nach folgendem Protokoll ausgefällt und getrocknet:

Zugabe von 2 µl Natrium-Acetat und 60 µl 96 %-igem Ethanol, anschließend 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur, Zentrifugation für 15 Minuten mit 1371 x g.

Abpipettieren des 96 %-igen Ethanols, Zugabe von 100 µl 70 %-igem Ethanol, 15 Minuten Zentrifugation bei 1371 x g.

Abnahme des Ethanols und trocknen lassen bei Raumtemperatur.

Nach vollständiger Trocknung wurde das Sequenase-Produkt zur weiteren Auswertung dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung der Medizinischen Fakultät Leipzig (IZKF) übergeben. Anhand der dort ermittelten Nukleo-

tidsequenzen wurde unter Verwendung der frei zugänglichen und täglich aktualisierten BLAST-Database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) eine Identifikation der sequenzierten Spezies durch Kalkulation der statistischen Signifikanz von Übereinstimmungen der Nukleotidsequenzen vorgenommen.

3.4. Auswertung und Statistik

Grafische Darstellung der Ergebnisse sowie statistische Auswertungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS Statistics 14.0 (SPSS Inc.) vorgenommen.

Die statistische Auswertung erfolgte durch deskriptive Statistik der klinischen sowie der durchflusszytometrisch erhobenen immunologischen Daten. Die Auswertung der im ELISpot ermittelten Ergebnisse erfolgte unter Verwendung des Kruskal-Wallis-Tests. Hierbei wurde auf Unterschiede in der Stimulierbarkeit der PBMCs der Patientengruppen bezüglich ihrer IL-1 β - und IL-8-Produktion bei Stimulation mit verschiedenen Antigenen untersucht. Dazu wurde der jeweilige Stimulationsindex als Quotient aus der Spotanzahl bei Stimulation mit dem entsprechenden Antigen und der Spotanzahl ohne Stimulation (Leerwert) gebildet. Das Signifikanzniveau wurde entsprechend der Bonferroni-Korrektur mit $p < 0,008$ festgelegt.

Die Analysen der mikrobiologischen Daten wurden mittels Chi-Square-Test (oder Fischer-Test) und Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Nach Bonferroni-Korrektur wurde $p < 0,001$ als statistisch signifikant angesehen.

Zusammenhänge zwischen mikrobiologischen und immunologischen Befunden wurden rein explorativ untersucht. Hierbei kamen der Mann-Whitney-U-Test sowie der Kruskal-Wallis-Test zur Anwendung. Zusammenhänge mit $p < 0,05$ werden in der Ergebnisdarstellung aufgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Deskriptive Statistik der klinischen Charakteristika

Anhand klinischer Kriterien konnten von insgesamt 45 untersuchten Individuen 14 gesunde Probanden und 26 Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Von diesen wurden 15 Patienten der Gruppe mit aggressiver Parodontitis zugeordnet, bei 11 Patienten lag eine moderate chronische Parodontitis vor. Die Daten der deskriptiven Beschreibung sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Neben Mittelwerten \pm Standardabweichung sind für die Gruppen im Einzelnen auch Minimum, Maximum sowie Median aufgeführt.

Die Patientenkohorten unterscheiden sich bezüglich des Alters entsprechend der Einschlusskriterien. Die gesunde Vergleichsgruppe weist mit 25 Jahren im Median das niedrigste Alter auf, gefolgt von 31 Jahren bei Patienten mit aggressiver und 46 Jahren bei Patienten mit moderater chronischer Parodontitis. Dies ist keine Normalverteilung.

Bei den gesunden Probanden liegt ein im Median niedriger API mit 12,5 % vor, was auf eine gute Mundhygiene hindeutet; die Probanden zeigen entsprechend den Einschlusskriterien keine klinischen Anzeichen parodontaler Destruktion. Es handelt sich bei den gesunden Individuen hauptsächlich um Studierende der Zahn- und Humanmedizin.

Die Patienten mit aggressiver Parodontitis weisen gute Mundhygiene auf, ausgewiesen durch den im Median mit 25 % bestimmten API. Sie zeigen die schwersten klinischen Symptome mit klinischen Attachmentverlusten von 3,42 mm im Median, Sondierungstiefen von 3,10 mm im Median und erhöhter Blutung auf Sondierung von 24,60 % im Median, beziehungsweise 30,12 % im Mittel. Der maximale klinische Attachmentverlust liegt im Median bei 9,00 mm und ist als stark fortgeschritten zu bewerten.

Die Patientengruppe mit moderater chronischer Parodontitis weist im Vergleich der Gruppen die schlechteste Mundhygiene bei einem API von 36 % und das höchste Alter mit 46 Jahren (jeweils der Median) auf. Der klinische Attachmentver-

lust liegt bei 2,24 mm, die Sondierungstiefe beträgt 2,53 mm und der BOP-Wert 17,46 % (jeweils im Median).

Maximaler röntgenologisch erkennbarer Knochenverlust wurde bei Patienten mit aggressiver Parodontitis im Median mit 70 % und bei Patienten mit moderater chronischer Parodontitis mit 15 % bestimmt. Bei gesunden Probanden mussten nicht zwingend Röntgenaufnahmen vorliegen, da durch Sechspunktmessung an allen Zähnen ein verlässlicher klinischer Ausschluss von Knochenverlust vorgenommen werden kann (Gonzales et al. 2007).

Tabelle 2: Klinische Charakteristika der Studienteilnehmer

		agP Patienten n = 15 8 w, 7 m	cP Patienten n = 11 5 w, 6 m	Ktr.-Probanden n = 14 1 w, 3 m
<i>Alter [Jahre]</i>	$\bar{x} \pm \varsigma$	32,1 ± 7,1	45,2 ± 8,0	24,9 ± 1,6
	\tilde{x}	31,0	46,0	25,0
	Min – Max	20 – 47	33 – 57	22 – 27
<i>API [%]</i>	$\bar{x} \pm \varsigma$	30,7 ± 15,2	35,6 ± 16,4	12,1 ± 5,5
	\tilde{x}	25,0	36,0	12,5
	Min – Max	11 – 74	14 – 61	4 – 18
<i>BOP [%]</i>	$\bar{x} \pm \varsigma$	30,12 ± 20,07	24,84 ± 14,36	13,63 ± 8,85
	\tilde{x}	24,60	17,46	16,97
	Min – Max	8,33 – 64,20	8,33 – 52,17	0,00 – 29,76
<i>CAL (Mittelwert) [mm]</i>	$\bar{x} \pm \varsigma$	3,39 ± 1,00	2,23 ± 0,81	0,42 ± 0,36
	\tilde{x}	3,42	2,24	0,30
	Min – Max	2,07 – 5,49	1,10 – 3,32	0,03 – 1,06
<i>CAL (max) [mm]</i>	$\bar{x} \pm \varsigma$	8,67 ± 2,19	4,55 ± 1,13	1,57 ± 0,85
	\tilde{x}	9,00	4,00	1,00
	Min – Max	5,00 – 12,00	3,00 – 6,00	1,00 – 3,00
<i>TT (Mittelwert) [mm]</i>	$\bar{x} \pm \varsigma$	3,25 ± 0,96	2,66 ± 0,72	2,03 ± 0,25
	\tilde{x}	3,10	2,53	2,08
	Min – Max	2,27 – 5,58	1,17 – 4,10	1,35 – 2,40
<i>TT (max) [mm]</i>	$\bar{x} \pm \varsigma$	7,73 ± 2,74	5,27 ± 1,42	3,64 ± 0,63
	\tilde{x}	7,00	5,00	4,00
	Min – Max	4,00 – 13,00	4,00 – 8,00	2,00 – 4,00
<i>Max röntgen. Knochenverlust [%]</i>	$\bar{x} \pm \varsigma$	66,67 ± 9,76	13,18 ± 4,62	0,00 ± 0,00
	\tilde{x}	70,00	15,00	0,00
	Min – Max	40,00 – 80,00	5,00 – 20,00	0,00 – 0,00

agP: an aggressiver Parodontitis erkrankte Patienten; cP: an moderater chronischer Parodontitis erkrankte Patienten; Ktr.-Probanden: Kontroll-Probanden; m: männlich; w: weiblich; n: Stichprobengröße; API: approximaler Plaqueindex; TT: Taschentiefe; CAL: klinisches Attachmentlevel; max: maximal; mean: durchschnittlich; BOP: Sondierungsblutung aus der Tasche; $\bar{x} \pm \varsigma$: Mittelwert ± Standardabweichung; Max röntgen. Knochenverlust: maximaler röntgenologisch sichtbarer Knochenverlust

4.2. Immunologische Befunde in Bezug zur klinischen Zuordnung

4.2.1. Intrazelluläre Zytokinproduktion in PBMCs (IL-4, IL-17, IFN- γ)

In Abbildung 6 wird durch drei gruppierte Boxplots die Produktion von IL-17, IL-4 und IFN- γ durch PBMCs für die drei untersuchten Gruppen dargestellt. Erkennbar ist, dass keine Unterschiede im Anteil der IL-17-produzierenden T-Helferzellen, der im Median 0,43% (gesund), 0,42 (cP) und 0,41 (agP) beträgt, zwischen den drei Probandengruppen bestehen.

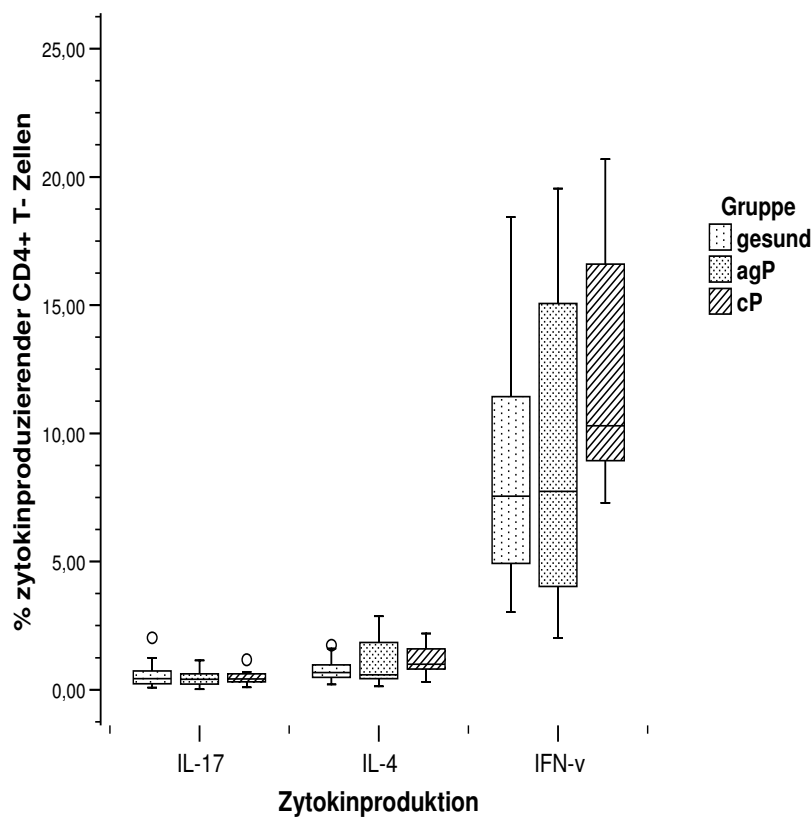


Abbildung 6: Bestimmung der intrazellulären Zytokinproduktion mittels Durchflusszytometrie bei Stimulation CD4-positiver T-Zellen (Th-Zellen) mit PMA (10 ng/ml)

Die Betrachtung der Boxplots, welche die IL-4-produzierenden Zellen repräsentieren (Abbildung 6), einem hauptsächlich von Th2-Zellen freigesetzten Zytokin, lässt vermuten, dass der Anteil IL-4-produzierender T-Helferzellen bei Patienten mit moderater chronischer Parodontitis höher ist (1,00 % im Median) als in der gesunden Kontrollgruppe (0,67 % im Median) und der Gruppe mit aggressiver Parodontitis (0,58 % im Median). Die Werte in der Patientengruppe mit aggressiver Paro-

Parodontitis zeigen, verglichen mit den anderen Gruppen, die stärkste Streuung mit einem Minimum von 0,14 % und einem Maximum von 2,87 %. In keiner der Gruppen fällt ein unphysiologisch hoher Anteil IL-4-produzierender T-Zellen auf. Es liegen somit keine relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der IL-4-Produktion ihrer T-Helferzellen vor.

Auch bezüglich der IFN- γ -Produktion zeigen Patienten aus der Gruppe mit moderater chronischer Parodontitis die im Median höchsten Prozentwerte der IFN- γ -produzierenden T-Helferzellen mit 10,29 %. Die Medianwerte der Gruppe mit aggressiver Parodontitis (7,74 %) und der gesunden Kontrollen (7,55 %) sind annähernd gleich groß. Der Anteil IFN- γ -produzierender T-Helfer-Zellen ist insgesamt, also in allen Gruppen, höher als der mit IL-17- und IL-4-Produktion. Es produzieren also durchschnittlich mehr T-Helferzellen IFN- γ als IL-4 und IL-17 bei Stimulation mit PMA (10 ng/ml).

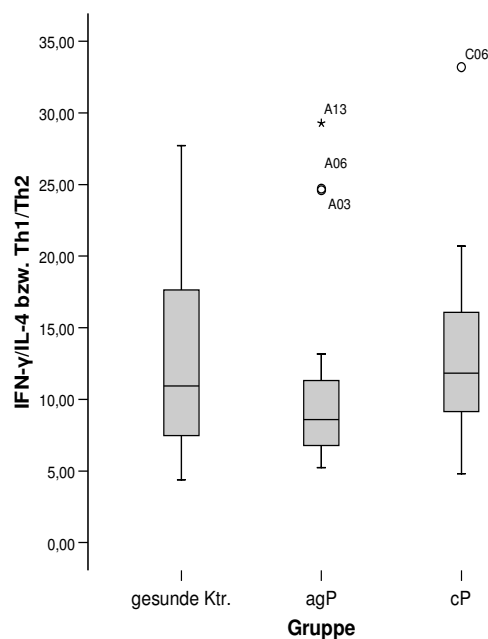


Abbildung 7: Darstellung des Verhältnisses von Th1- zu Th2-Zellen, errechnet aus dem Quotienten der IFN- γ produzierenden und IL-4 produzierenden CD4-positiven Zellen; intrazelluläre Zytokine wurden, wie oben beschrieben, durchflusszytometrisch bestimmt

Der IFN- γ -produzierende T-Helferzell-Anteil repräsentiert die Th1-Zellen, während IL-4 ein typischerweise von Th2-Zellen produziertes Zytokin darstellt. Durch Bildung des Quotienten aus IFN- γ -produzierenden T-Helferzellen und IL-4-produzierenden T-Helferzellen kann das Th1-Th2-Zell-Verhältnis bestimmt wer-

den. Das Verhältnis zwischen Th1- und Th2-Zellen wird in Abbildung 7 veranschaulicht: Im peripheren Blut wurden nur minimale Unterschiede des Th1/Th2-Zellverhältnisses zwischen Patienten mit aggressiver und moderater chronischer Parodontitis sowie gesunden Kontrollen nachgewiesen. In der Gruppe mit aggressiver Parodontitis liegt der Median mit 8,59 leicht unter dem der anderen beiden Gruppen, die untereinander mit 11,83 (cP) und 10,93 (gesund) keinen deutlichen Unterschied zeigen. Dieser Zusammenhang spricht für eine leicht herabgesetzte Th1-Antwort bei aggressiver Parodontitis.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass im Zytokinprofil peripherer Leukozyten bei der Stimulierung mit PMA keine relevanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen vorliegen.

4.2.2. CVID-Panel

Abbildung A-1 (im Anhang I) stellt den Anteil der B-Lymphozyten an der Gesamtanzahl der Lymphozyten für die unterschiedlichen Gruppen dar. Es wird deutlich, dass die Mediane des Anteils der B-Zellen an der Gesamt-Lymphozytenzahl im Bereich zwischen 8,76 % (gesund) und 11,31 % (cP) und somit innerhalb des Referenzbereiches nach Warnatz et al. liegen, welcher mit 4,7 % bis 15 % angegeben ist (Sack et al. 2007). In unseren Untersuchungen stellten mindestens 5,81% (bei einem Patient mit aggressiver Parodontitis) und maximal 21,67 % (Patient mit moderater chronischer Parodontitis) der Lymphozyten CD19-positive B-Zellen dar. Da die in der Literatur dargestellten Grenzwerte variieren, ist auch ein B-Lymphozyten-Anteil von 5,81 % als klinisch unauffällig einzustufen – Warnatz et al. gaben die untere Grenze des Referenzbereiches mit 4,9 % an (Warnatz & Schlesier 2008). Zusammenfassend können bezüglich des B-Lymphozytenanteils keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Auch der Anteil an naiven und transitionalen B-Zellen unterscheidet sich nicht zwischen den Gruppen, wie grafisch in Abbildung A-2 veranschaulicht. Die gemessenen Werte liegen bei der Betrachtung aller Gruppen im Median mit 5,46 % etwas unter dem von Warnatz et al. angegebenen Normwert von 7,7 – 36,0 % (Sack et al. 2007). Das Minimum von nur 0,769 % bei Patienten mit moderater chronischer Parodontitis ist deutlich niedriger als die untere Grenze des Referenzbereiches.

Da der niedrigste Wert bei gesunden Probanden mit 1,61 % und bei Patienten mit aggressiver Parodontitis mit 2,51 % den Referenzbereich ebenfalls deutlich unterschreitet, scheint es sich um eine verfahrensbedingte Erscheinung zu handeln. Das Maximum des Anteils naiver und transitionaler B-Zellen wurde in der Gruppe der Patienten mit aggressiver Parodontitis mit 12,65 % erreicht.

Bei der Auswertung der Ergebnisse für die klassengewechselten B-Gedächtniszellen konnte ein im Median für alle Gruppen mit 10,46 % bestimmter Anteil an der gesamten B-Zellpopulation festgestellt werden, der innerhalb des von 6,5% bis 29,1 % angegebenen Referenzbereiches (Warnatz & Schlesier 2008) liegt. Im Gruppenvergleich liegt der höchste Medianwert mit 13,08 %, wie auch der für alle Gruppen ermittelte Maximalwert (36,65 %) in der Gruppe mit moderater chronischer Parodontitis vor. Die Medianwerte der anderen Gruppen liegen mit 8,75 % (agP) und 10,44 % (gesund) im physiologischen Bereich. Im Minimum liegt der Anteil klassengewechselter B-Zellen bei 4,78 % in der Gruppe mit aggressiver Parodontitis und 5,10 % in der gesunden Kontrollgruppe. Abbildung A-3 (Anhang I) stellt den Anteil der klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen („switched memory B-Zellen“) an der Gesamtpopulation der B-Zellen in den verschiedenen Gruppen dar. Erkennbar ist, dass keine großen Unterschiede bezüglich des Anteils der klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen zwischen den Gruppen vorliegen; die Daten lassen einen im Gruppenvergleich leicht erhöhten Anteil dieser B-Zellpopulation bei Patienten mit moderater chronischer Parodontitis erkennen.

Eine weitere B-Zellpopulation, auf die hier eingegangen werden soll, stellen die Gedächtnis-B-Zellen („memory-B-Zellen“) dar, die keinen Klassenwechsel vollzogen haben. In Abbildung 8 sind die erhobenen Daten grafisch dargestellt und lassen erkennen, dass die Gruppe mit moderater chronischer Parodontitis den im Gruppenvergleich höchsten Anteil dieser B-Zellen an der Gesamt-B-Zellzahl besitzt. Dies bestätigen auch die Medianwerte mit 33,03 % (cP) versus 19,39 % (gesunde Ktr.) und 15,06 % (agP), die alle innerhalb des Referenzbereiches liegen, der mit 7,8 % bis 36 % angegeben ist (Sack et al. 2007). Der Gesamtmedian über alle Gruppen liegt bei 19,39 % und lässt vermuten, dass statistische Signifikanz für einen erhöhten Anteil von B-Gedächtniszellen bei Patienten mit chronischer Paro-

odontitis vorliegen könnte. Diese Zusammenhänge werden in der vorliegenden Arbeit rein explorativ untersucht.

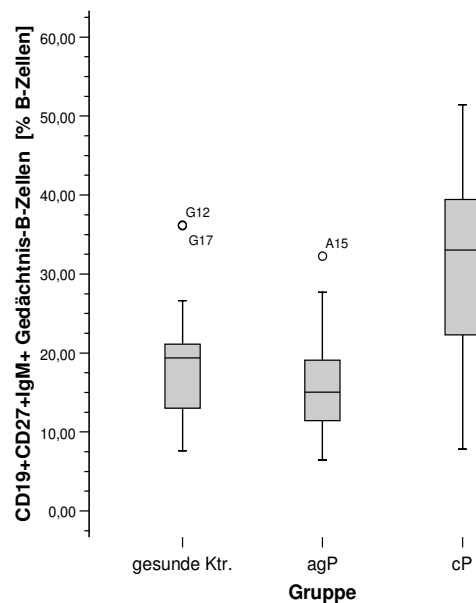


Abbildung 8: Anteil der Gedächtnis-B-Zellen (CD19+CD27+IgM+) an den B-Zellen

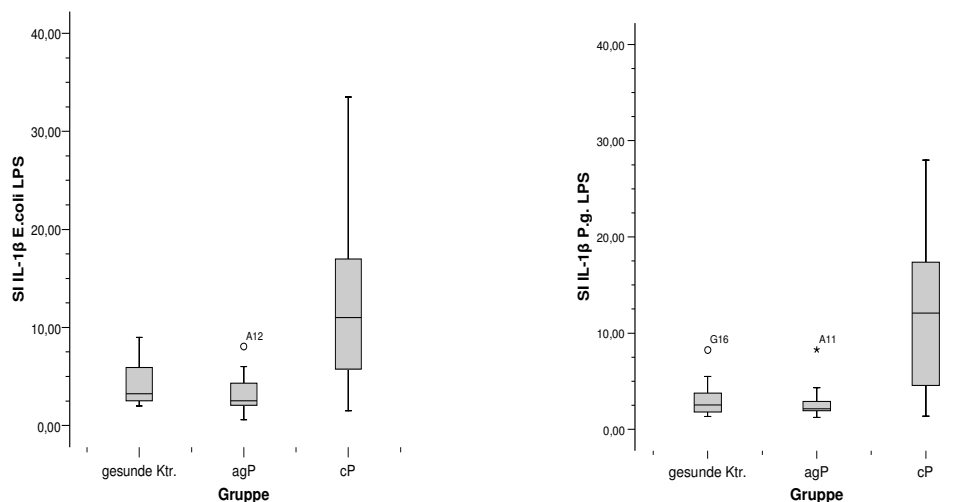
Die Minimalwerte für den Anteil der Gedächtnis-B-Zellen ohne Klassenwechsel liegen mit 7,64 % (gesunde Ktr.), 6,44 % (agP) und 7,81 % (cP) an der unteren Grenze des Referenzbereiches, respektive für Patienten mit aggressiver Parodontitis und gesunde Probanden leicht unterhalb des Normbereiches. Diese Abweichungen sind als klinisch unauffällig anzusehen und werden auf methodische Ursachen zurückgeführt.

4.2.3. ELISpot-Assay

Bei der Betrachtung der Daten, die durch ELISpot-Assays erhoben wurden, wird auf die Stimulationsindizes Bezug genommen. Diese berechnen sich durch Bildung des Quotienten aus spezifischer Stimulation und unspezifischer Stimulation. Die unspezifische Stimulation ist als Zytokinproduktion der Zellen ohne Stimulation durch Antigen, also als Leerwert, zu verstehen. Der Stimulationsindex beschreibt somit die Stimulierbarkeit der PBMCs durch das jeweilige Antigen.

Bei der Auswertung der Ergebnisse der ELISpot Assays für die IL-1 β -Produktion durch PBMCs wurde festgestellt, dass entgegen der Ausgangshypothese, „die Stimulierbarkeit der Zellen von Patienten mit aggressiver Parodontitis unterschei-

de sich von der gesunder Probanden“, die Stimulationsindizes im Vergleich dieser beiden Gruppen annähernd gleich sind. Dies ist grafisch in den Abbildungen 9 und 10 dargestellt. Die LPS-Stimulierbarkeit der PBMCs bezüglich ihrer IL-1 β -Produktion ist bei Patienten mit moderater chronischer Parodontitis hingegen signifikant höher als die der anderen beiden Gruppen ($p = 0,002$).



Abbildungen 9 und 10: Darstellung des SI für IL-1 β bei Stimulation mit *E. coli* LPS (Abbildung 9) und *P.g.* LPS (Abbildung 10): feststellbarer Unterschied des Sekretionsverhaltens der PBMCs bezüglich der IL-1 β -Freisetzung bei Stimulation mit LPS (sowohl *E.coli* LPS als auch *P.g.* LPS) zwischen den Gruppen

Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, konnten für die Freisetzung von IL-1 β bei Stimulation mit CEF, das einem viralen Peptidpool entspricht, keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Des Weiteren ist die durch CEF induzierte IL-1 β -Ausschüttung, verglichen mit der Ruhesekretion (entspricht dem Wert 1), im Median kaum verändert, wie aus den Stimulationsindizes von 1,36 bei gesunden Probanden und 1,20/1,00 für Patienten mit aggressiver und moderater chronischer Parodontitis hervorgeht. Die Stimulierbarkeit der IL-1 β -Sekretion durch virale Antigene ist demnach bei 20-stündiger Inkubation laut der durchgeführten Untersuchungen in allen Gruppen als gering einzuschätzen.

Nach fünfstündiger Inkubation mit den unter 3.3.3. erläuterten Antigenen konnte bei Stimulation mit *E. coli* LPS in der Gruppe der Patienten mit moderater chronischer Parodontitis der höchste Stimulationsindex mit 2,86 für die IL-8-Freisetzung erhoben werden. Patienten mit aggressiver Parodontitis zeigten den niedrigsten

Stimulationsindex für die IL-8-Freisetzung mit 1,58. Diese Zusammenhänge sind mit $p = 0,099$ als statistisch nicht signifikant anzusehen. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei der Stimulierung mit P.g. LPS gemacht werden (Abbildung 11), bei der wiederum PBMCs von Patienten mit moderater chronischer Parodontitis den stärksten Anstieg der IL-8-Sekretion zeigten (SI = 2,64), während Leukozyten gesunder Probanden und von Patienten mit aggressiver Parodontitis ein annähernd gleiches Sekretionsverhalten mit den Stimulationsindizes 1,51 und 1,59 zeigten. Auch diese Ergebnisse sind mit $p = 0,094$ nicht signifikant.

Tabelle 3: Stimulationsindizes und Rangverteilung nach Kruskal-Wallis

	\bar{x}			$\bar{x} \pm \varsigma$		
	Gesund n = 14	AgP n = 15	cP n = 11	Gesund n = 14	AgP n = 15	cP n = 11
SI IL-1 β E coli LPS	3,23	2,51	11,00	4,15 \pm 2,12	3,22 \pm 2,03	12,69 \pm 9,49
Mittlerer Rang	19,54	14,03	30,55			
SI IL-1 β P.g. LPS	2,54	2,13	12,08	3,17 \pm 1,86	2,72 \pm 1,73	11,70 \pm 8,63
Mittlerer Rang	18,04	15,10	31,00			
SI IL-1 β CEF	1,36	1,20	1,00	1,26 \pm 0,57	1,48 \pm 0,90	2,69 \pm 2,98
Mittlerer Rang	19,29	20,97	21,41			
SI IL-8 E coli LPS	2,01	1,58	2,86	2,72 \pm 2,84	1,83 \pm 0,96	8,36 \pm 15,74
Mittlerer Rang	19,89	16,63	26,55			
SI IL-8 P.g. LPS	1,51	1,59	2,64	2,78 \pm 2,82	1,72 \pm 2,03	6,53 \pm 10,41
Mittlerer Rang	19,00	17,20	26,91			
SI IL-8 CEF	1,12	1,07	1,40	1,26 \pm 0,53	1,20 \pm 0,37	1,85 \pm 1,33
Mittlerer Rang	18,32	18,77	25,64			

statistisch signifikante Werte hervorgehoben

agP: an aggressiver Parodontitis erkrankte Patienten; cP: an moderater chronischer Parodontitis erkrankte Patienten; SI: Stimulationsindex (Quotient aus unspezifischer Zytokinsekretion und stimulierter Zytokinfreisetzung); \bar{x} : Median; $\bar{x} \pm \varsigma$: Mittelwert \pm Standardabweichung; n: Stichprobenanzahl

Die Stimulation mit CEF-Peptidpool führte zu keiner wesentlich erhöhten IL-8-Freisetzung der PBMCs. Die Stimulationsindizes in der Gruppe der gesunden Probanden und der an aggressiver Parodontitis erkrankten Patienten entsprechen mit im Median 1,12 und 1,07 annähernd der Ruhesekretion; bei den an moderater chronischer Parodontitis erkrankten Patienten liegt der Stimulationsindex mit 1,40

im Median etwas höher als bei den anderen beiden Gruppen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind als statistisch nicht signifikant anzusehen ($p = 0,230$).

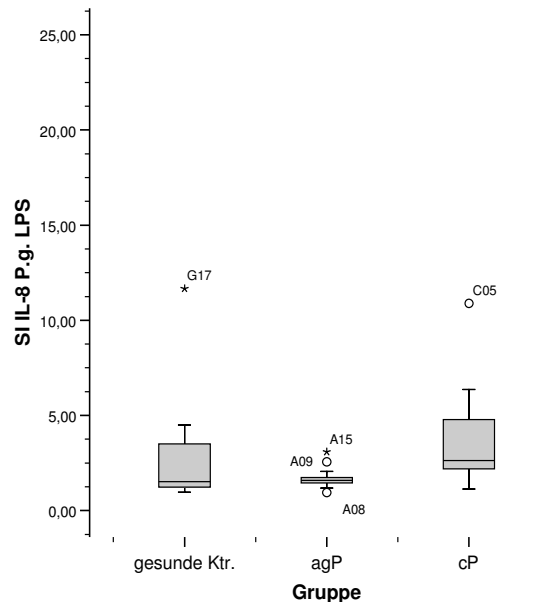


Abbildung 11: Stimulierbarkeit IL-8-Freisetzung der PBMCs durch *P.g.* LPS

Die Untersuchung der RANTES-Sekretion mit Hilfe des ELISPOT-Assays führte bei vielen Probanden zu nicht auswertbaren Spot-Formationen. Aus diesem Grund wird auf die grafische Darstellung der Ergebnisse verzichtet.

4.3. Mikrobiologische Befunde in Bezug zur klinischen Zuordnung

Nicht bei allen in die Studie eingeschlossenen Individuen wurde die mikrobiologische Diagnostik durchgeführt, da bei einem gesunden Probanden und vier Patienten mit aggressiver Parodontitis kein Probenmaterial an das Institut für Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie geschickt werden konnte.

Bei den 36 mikrobiologisch untersuchten Individuen konnten insgesamt 236 anaerobe Isolierungen identifiziert werden, davon 186 bei Patienten und 50 bei gesunden Probanden. 51 verschiedene anaerobe Spezies wurden isoliert, durchschnittlich 8,1 Spezies pro Patient und 3,8 Spezies je gesunder Proband.

Unterschiede der Prävalenz konnten für den Nachweis von *Prevotella denticola* bei aggressiver Parodontitis ($p = 0,00098$) und hohen Werten für CAL ($p = 0,00100$) nachgewiesen werden.

Der Vergleich zwischen Parodontitis-Patienten und gesunden Probanden zeigte einen tendenziellen Zusammenhang zwischen moderater chronischer Parodontitis und dem Nachweis von *Porphyromonas gingivalis* ($p = 0,082$), *Prevotella intermedia* ($p = 0,047$) und *Prevotella oralis* ($p = 0,023$) sowie aggressiver Parodontitis mit *Parvimonas micra* ($p = 0,015$), *Prevotella oralis* ($p = 0,011$) und *Anaerococcus prevotii* ($p = 0,039$). Für *Parvimonas micra* konnte des Weiteren ein Zusammenhang mit hohen Taschentiefen ($p = 0,005$) und klinischem Befestigungsverlust ($p = 0,012$) festgestellt werden, ebenso für *Prevotella oralis* (TT: $p = 0,035$; CAL: $p = 0,023$). *Anaerococcus prevotii* ist mit erhöhtem klinischen Attachmentlevel assoziierbar ($p = 0,007$).

Beim Vergleich zwischen Patienten mit aggressiver Parodontitis und moderater chronischer Parodontitis konnte die Prädominanz von *P. gingivalis* ($p = 0,093$) bei moderater chronischer Parodontitis und *A. prevotii* ($p = 0,093$) bei aggressiver Parodontitis nachgewiesen werden.

Für *Porphyromonas gingivalis* fiel erhöhte Prävalenz bei höherem Alter ($p = 0,006$) und API ($p = 0,015$) sowie tieferen Taschen ($p = 0,023$) auf.

Nach Bonferroni-Korrektur wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit der statistischen Auswertung mit $\alpha = 0,001$ festgesetzt. Die Nullhypothese wurde verworfen und das Ergebnis als statistisch signifikant betrachtet, wenn dieser Wert unterschritten wurde ($p < 0,001$). Die Ergebnisse weisen demnach auf eine signifikant erhöhte Prävalenz von *Prevotella denticola* bei Patienten mit aggressiver Parodontitis und erhöhten Taschentiefen hin. Alle anderen Ergebnisse sind als statistisch nicht signifikant anzusehen.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans war bei keinem der hier untersuchten Individuen nachweisbar.

Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die isolierten Bakterienspezies und ihr Vorkommen in den drei verschiedenen Gruppen. Des Weiteren sind in der Anlage III

quantitative Keimzahlen der nachgewiesenen Spezies für Patientengruppen und gesunde Kontrollgruppe aufgeführt. Zusammenfassend kann bemerkt werden, dass die quantitative Menge der nachgewiesenen Bakterienspezies bei den gesunden Probanden am geringsten war. Die Ausnahme stellt das Bakterium *Actinomyces israelii* dar, welches bei gesunden Individuen in höherer Menge nachgewiesen wurde als in den Gruppen mit moderater chronischer und aggressiver Parodontitis. Typische parodontopathogene Keime wie *P. intermedia* und *F. nucleatum* konnten auch bei gesunden Probanden nachgewiesen werden, dort aber in wesentlich geringerer quantitativer Menge als in den Patientengruppen.

Tabelle 4: Kultivierte Spezies in den Probandengruppen

Bakterienspezies	Kolonisierte Ktr.- Probanden (n _{ges} =13)		Kolonisierte agP- Patienten (n _{ges} =12)		Kolonisierte cP- Patienten (n _{ges} =11)	
	n	%	n	%	n	%
<i>Actinomyces israelii</i>	2	15,38	1	8,33	1	9,09
<i>Actinomyces meyeri</i>	4	30,78	5	47,92	2	18,18
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1	7,69	1	8,33	1	9,09
<i>Actinomyces naeslundii</i>	0	0,00	1	8,33	0	0,00
<i>Actinomyces viscosus</i>	0	0,00	0	0,00	1	9,09
<i>Actinomyces prevotii</i>	0	0,00	0	0,00	1	9,09
<i>Eggerthella lenta</i>	3	23,08	2	16,67	1	9,09
<i>Veillonella species</i>	5	38,46	7	58,33	2	18,18
<i>Capnocytophaga spp.</i>	6	46,15	2	16,67	3	27,27
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	5	38,46	7	58,33	8	72,73
<i>Fusobacterium varium</i>	0	0,00	1	8,33	1	9,09
<i>Fusobacterium necrogenes</i>	1	7,69	3	25,00	1	9,09
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	1	7,69	1	8,33	0	0,00
<i>Prevotella intermedia</i>	5	38,46	9	75,00	9	81,82
<i>Prevotella loeschii</i>	3	23,08	5	47,92	4	36,36
<i>Prevotella buccae</i>	3	23,08	3	25,00	6	54,55
<i>Prevotella bivia</i>	1	7,69	0	0,00	0	0,00
<i>Prevotella oralis</i>	1	7,69	7	58,33	6	54,55
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2	15,38	2	16,67	0	0,00
<i>Prevotella denticola</i>	0	0,00	7	58,33	1	9,09
<i>Prevotella disiens</i>	0	0,00	0	0,00	2	18,18
<i>Prevotella buccalis</i>	0	0,00	1	8,33	1	9,09
<i>Prevotella tannerae</i>	0	0,00	0	0,00	1	9,09
<i>Prevotella nigrescens</i>	1	7,69	0	0,00	0	0,00
<i>Gemella morbillorum</i>	2	15,38	2	16,67	5	45,45
<i>Micromonas micros</i>	0	0,00	5	47,92	2	18,18
<i>Propionibacterium acnes</i>	1	7,69	1	8,33	1	9,09
<i>Propionibacterium propionicus</i>	0	0,00	1	8,33	0	0,00
<i>Anaerococcus prevotii</i>	0	0,00	4	33,33	0	0,00
<i>Peptostreptococcus anaerobicus</i>	0	0,00	2	16,67	1	9,09
<i>Bacteroides merdae</i>	0	0,00	1	8,33	1	9,09
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	1	7,69	3	25,00	3	27,27
<i>Eubacterium limosum</i>	0	0,00	2	16,67	0	0,00

<i>Eubacterium yurii</i>	0	0,00	1	8,33	0	0,00
<i>Eubacterium brachy</i>	0	0,00	0	0,00	1	9,09
<i>Campylobacter rectus</i>	0	0,00	2	16,67	0	0,00
<i>Fingoldia magna</i>	0	0,00	0	0,00	2	18,18
<i>Selenomonas spp.</i>	0	0,00	3	25,00	2	18,18
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0	0,00	0	0,00	3	27,27
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	0	0,00	0	0,00	2	18,18
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	0	0,00	0	0,00	1	9,09
<i>Clostridium clostridioforme</i>	0	0,00	0	0,00	1	9,09
<i>Clostridium fallax</i>	0	0,00	0	0,00	1	9,09
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	0	0,00	0	0,00	1	9,09
<i>Clostridium spp.</i>	1	7,69	0	0,00	0	0,00
<i>Clostridium beijerium</i>	0	0,00	2	16,67	1	9,09
<i>Clostridium sordellii</i>	0	0,00	0	0,00	1	9,09
<i>Clostridium bifermentans</i>	0	0,00	1	8,33	0	0,00
<i>Clostridium histolyticum</i>	0	0,00	2	16,67	0	0,00
<i>Clostridium innocuum</i>	1	7,69	0	0,00	1	9,09
<i>Clostridium sporogenes</i>	1	7,69	0	0,00	1	9,09

Prozentsatz der Träger von individuellen kultivierten Spezies unter Patienten mit aggressiver und moderater chronischer Parodontitis sowie gesunden Kontrollprobanden

n_{ges}: Gesamtanzahl der in die Betrachtung eingeschlossenen Individuen der Gruppe
n: Anzahl der Individuen

4.4. Bezug mikrobiologische und immunologische Befunde

Da in der Studie sowohl die immunologische als auch mikrobiologische Charakterisierung der Studienteilnehmer durchgeführt wurde, werden in diesem Teil der Ergebnisdarstellung Zusammenhänge zwischen diesen Befunden explorativ untersucht und dargestellt.

Der Rangsummentest nach Mann-U-Whitney wurde explorativ durchgeführt, um mögliche Zusammenhänge zwischen Bakterienspezies und immunologischen Befunden zu eruieren. Zusammenhänge mit $p < 0,05$ sind in Tabelle 5 zusammengefasst, unabhängig vom parodontalen Befund. Das als spezifisch bei aggressiver Parodontitis nachgewiesene Bakterium *Prevotella denticola* zeigte keinen Bezug zu den erhobenen immunologischen Befunden.

Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, lässt sich das Bakterium *P. gingivalis*, welches ausschließlich in der Gruppe mit moderater chronischer Parodontitis nachgewiesen wurde (Tabelle 4), mit verstärkter LPS-Stimulierbarkeit der PBMCs bezüglich deren IL-1 β - und IL-8-Freisetzung in Zusammenhang bringen. Des Weiteren kann das Vorhandensein von *P. gingivalis* positiv mit dem Anteil IFN- γ -freisetzender T-

Helferzellen assoziiert werden, wodurch auch das erhöhte Verhältnis von IFN- γ zu IL-4 bei der Betrachtung der intrazellulären Zytokinfreisetzung zu erklären ist. Das Verhältnis zwischen T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen ist bei Patienten, in deren subgingivaler Plaque *P. gingivalis* nachgewiesen werden konnte, zugunsten der zytotoxischen T-Zellen verschoben.

Der Nachweis von *Prevotella disiens* – ein Bakterium, das hier ausschließlich bei Patienten mit chronischer Parodontitis isoliert wurde – zeigt Zusammenhang mit einem erhöhten Stimulationsindex bezüglich der IL-1 β -Sekretion bei Stimulierung der PBMCs mit *P.g.* LPS. Auch die Verschiebung des Verhältnisses von IFN- γ - zu IL-4-Produktion von T-Helferzellen zugunsten von IFN- γ zeigt einen Zusammenhang mit dem Nachweis von *Prevotella disiens*. *Finegoldia magna* wurde ebenfalls ausschließlich bei Patienten mit moderater chronischer Parodontitis isoliert und zeigt im explorativ durchgeführten Mann-Whitney-U-Test positive Assoziation mit dem Anteil naiver B-Lymphozyten und der Anzahl IL-4-produzierender T-Helferzellen, der sich auch in der Verschiebung des IFN- γ /IL-4-Verhältnisses zugunsten von IL-4 widerspiegelt. Des Weiteren fällt eine reduzierte LPS-Stimulierbarkeit der PBMCs bezüglich ihrer IL-8-Freisetzung auf.

Der Nachweis von *Fusobacterium nucleatum* lässt sich tendenziell mit erniedrigtem Anteil an B-Lymphozyten sowie „naiven und transitionalen“ B-Zellen in Verbindung bringen, während der Anteil IgM und auch IgG freisetzender Gedächtnis-B-Zellen erhöht ist. *Prevotella buccalis* konnte mit relativer Erhöhung der T-Helferzellen gegenüber der zytotoxischen T-Zellen assoziiert werden.

Anaerococcus prevotii und *Campylobacter rectus* wurden ausschließlich bei Patienten mit aggressiver Parodontitis nachgewiesen, wie auch aus Tabelle 4 hervorgeht. Sie sind mit verringerter Stimulierbarkeit der IL-1 β -Freisetzung durch PBMCs bezüglich LPS-Exposition assoziierbar. Auch die IFN- γ -Produktion von T-Helferzellen scheint bei Patienten mit *Campylobacter rectus*-Infektion herabgesetzt zu sein. *Eubacterium limosum* ist ein weiteres Bakterium, welches bei Patienten mit aggressiver Parodontitis isoliert wurde und das sich mit immunologischen Befunden (erniedrigter Anteil naiver und transitionaler B-Zellen sowie B-Lymphozyten) in Zusammenhang bringen lässt.

Tabelle 5: Bezug zwischen immunologischen und mikrobiologischen Befunden

Bakterium	Immunologischer Befund	Mittlerer Rang		p
		positiv	negativ	
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (n = 3)	SI IL-1 β <i>E.coli</i> LPS	31,67	17,30	0,019
	SI IL-8 <i>E.coli</i> LPS	31,00	17,36	0,029
	SI IL-8 <i>P.g.</i> LPS	32,00	17,27	0,015
	CD4/CD8 Verhältnis	5,00	19,73	0,023
	IFN- γ produzierende T-Helferzellen	31,33	17,33	0,023
	IFN- γ /IL-4 ratio	32,00	17,27	0,015
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (n = 20)	B-Lymphozyten	15,10	22,75	0,030
	Naive und transitionale B-Zellen	14,20	23,88	0,050
	Switched memory B-Zellen	22,35	13,69	0,014
	Memory B-Zellen	22,20	13,88	0,018
<i>Anaerococcus prevotii</i> (n = 4)	SI IL-1 β <i>E.coli</i> LPS	5,88	20,08	0,007
<i>Actinomyces meyeri</i> (n = 12)	B-Lymphozyten	13,58	20,96	0,049
<i>Prevotella disiens</i> (n = 2)	SI IL-1 β <i>P.g.</i> LPS	33,50	17,62	0,029
	IFN- γ /IL-4 ratio	33,50	17,62	0,029
<i>Campylobacter rectus</i> (n = 2)	SI IL-1 β <i>E.coli</i> LPS	4,00	19,35	0,038
	IFN- γ produzierende T _H -Zellen	3,00	19,24	0,019
<i>Eubacterium limosum</i> (n = 2)	Naive und transitionale B-Zellen	34,50	17,56	0,013
	B-Lymphozyten	34,50	17,56	0,013
<i>Fingoldia magna</i> (n = 2)	B-Lymphozyten	34,50	17,56	0,013
	IFN- γ /IL-4 ratio	3,00	19,41	0,019
	SI IL-8 <i>E.coli</i> LPS	4,00	19,35	0,038
	IL-4-produzierende T-Helferzellen	33,00	17,65	0,038
<i>Prevotella oralis</i> (n = 14)	Switched memory B-Zellen	13,86	21,45	0,035
	IFN- γ /IL-4 ratio	13,86	21,45	0,035
<i>Prevotella buccalis</i> (n = 2)	CD4/CD8 Verhältnis	35,50	17,50	0,003

Darstellung von Zusammenhängen zwischen immunologischen und mikrobiologischen Befunden; Untersuchung mittels Mann-Whitney-U-Test: Testung erfolgte rein explorativ; Darstellung von Zusammenhängen mit $p < 0,05$

n: Anzahl der Individuen, bei denen das Pathogen nachgewiesen werden konnte

Bei dem in dieser Untersuchung mit Parodontitis assoziierten Bakterium *Prevotella oralis* werden Zusammenhänge mit der B-Zell-Reifung gefunden. Der Nachweis von *Prevotella oralis* lässt sich weiterhin in Bezug zum Anteil klassengewechselter Gedächtnis-B-Zellen bringen; bei positivem Keimnachweis nimmt der Anteil klas-

sengewechselter Gedächtnis-B-Zellen ab ($p = 0,035$), wie auch in Tabelle 5 dargestellt ist. *Prevotella oralis* wird hauptsächlich bei Patienten mit Parodontitis nachgewiesen ($p = 0,004$). Dem entsprechend wird festgestellt, dass die untersuchten Patienten mit Parodontitis, in deren subgingivaler Plaque *Prevotella oralis* nachweisbar ist, einen erniedrigten Anteil klassengewechselter B-Zellen aufweisen, verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe ($p = 0,002$). Hierbei fällt auf, dass der verringerte Anteil klassengewechselter B-Gedächtniszellen auf Patienten mit aggressiver Parodontitis entfällt. Diese Erkenntnis wird in Tabelle 6 durch die Darstellung der Rangverteilung nach Mann-Whitney für den Anteil klassengewechselter B-Gedächtniszellen in den Gruppen mit Parodontitis mit Zahlen unterlegt.

Tabelle 6: Klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen bei Nachweis von *Prevotella oralis*

	Gruppe	n	Mittlerer Rang	p
<i>Switched memory B-Zellen (IgD-IgM-CD19+CD27+)</i> [% der B-Zellen]	Patienten mit aggressiver PA	7	5,14	
	Patienten mit chronischer PA	6	9,17	
	Gesamt	13		0,073

Pivot-Tabelle für die Rangverteilung des Anteils an klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen („switched memory B-Zellen“) bei Individuen mit Parodontitis, die positiv für das Bakterium *Prevotella oralis* getestet wurden; Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests für den nichtparametrischen Test von zwei unabhängigen Stichproben

n: Anzahl der positive getesteten Individuen; PA: Parodontitis

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit festgestellt, dass, wie aus Tabelle 5 zu ersehen ist, neun Assoziationen für T- und B-Zellen, die Bestandteile der adaptiven Immunität darstellen, mit mikrobiologischen Befunden vorliegen. Weiterhin fallen fünf Assoziationen bezüglich des IL-1 β -Stimulationsindex und zwei Assoziationen in Hinblick auf den IL-8-Stimulationsindex auf. Es resultiert die Erkenntnis, dass alle Arme des Immunsystems zur Parodontopathogenese beitragen.

5. Diskussion

Ziel der Arbeit ist die Untersuchung immunregulatorischer Vorgänge, welche mit der Entstehung des Krankheitsbildes der aggressiven Parodontitis in Verbindung stehen. Zugrunde liegende klinische und immunologische Zusammenhänge sind in der Einleitung dieser Arbeit ausführlich dargestellt. Des Weiteren wurde mikrobiologische Diagnostik durchgeführt zur Herstellung der Vergleichbarkeit mit anderen Untersuchungen, die sich mit Zusammenhängen zwischen dem Vorhandensein verschiedener Parodontalpathogene und dem klinischen Bild der untersuchten Individuen beschäftigt haben (Gajardo et al. 2005; Lafaurie et al. 2007; Nibali et al. 2012; Ximénez-Fyvie et al. 2000) und in der Einleitung genauer beleuchtet sind. Weiterführend spielt die Eruierung möglicher Zusammenhänge zwischen parodontopathogenen Bakterien und immunologischen Befunden in dieser Arbeit eine Rolle.

Grundsätzlich können immunologische Untersuchungen der regulatorischen Vorgänge in der Pathogenese einer Parodontitis an verschiedenen Zelltypen, die sich in unterschiedlichen Kompartimenten des Individuums befinden, durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde die klinische Charakterisierung der Studienteilnehmer durchgeführt und Leukozyten im peripheren Blut sowie die mikrobiologische Zusammensetzung der Taschenflora untersucht.

Bei der Untersuchung der Entzündungsabläufe in parodontalen Läsionen muss auch die Produktion von Entzündungsmediatoren durch ortsständige Zellen betrachtet werden. Gingivale Fibroblasten (GF) und Zellen des Parodontalligaments (PDLF) sind funktionell unterschiedliche Zelltypen des Parodontiums, die an der Immunantwort bei Parodontitis teilnehmen. Bei Stimulation mit *P. gingivalis* konnten für beide Zelltypen, die in einer von Scheres durchgeführten Untersuchung aus gesunden Individuen stammten, starke immunologische Reaktionen beobachtet werden. Auf Ebene der Genexpression konnte eine Erhöhung von IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1 und RANTES durch Stimulation beobachtet werden. Bei Gingivafibroblasten konnte eine Induktion des MCP nachgewiesen werden, während die Expression von Osteoprotegerin erniedrigt war, was nicht bei Parodontalligamentzellen zu beobachten war. In unstimulierten Zellen war eine höhere Ex-

pression von IL-6 in GF als in PDLF nachweisbar. Zwischen den verschiedenen Zellspendern konnte große Heterogenität bezüglich der Empfindlichkeit auf *P. gingivalis* festgestellt werden. Des Weiteren waren bei jedem Individuum entweder GF oder PDLF empfindlicher gegenüber *P. gingivalis* (Scheres et al. 2010). Eine Studie unter Einbeziehung von Vergleichsgruppen könnte hier weitere Informationen bereitstellen. Für die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Untersuchungsergebnisse wird klar, dass die letztendlich am Ort der Entzündung auftretenden Konzentrationen proinflammatorischer Zyto- und Chemokine nicht nur durch PBMCs determiniert sind.

Zytokine wirken in einem funktionellen Netzwerk zusammen und integrieren dabei sowohl Aspekte der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort, indem sie die Leukozytenmobilisierung zur Infektionsstelle sowie die Initiation von adaptiver Immunantwort und akuter-Phase-Reaktion vermitteln (Preshaw & Taylor 2011).

5.1. Angeborene Immunität und Parodontitis (IL-1 β und IL-8)

In den durchgeführten Untersuchungen wurden, betreffend der IL-1 β -Freisetzung Unterschiede in der Stimulierbarkeit von PBMCs mittels LPS festgestellt: Die Gruppe mit moderater chronischer Parodontitis weist eine signifikant erhöhte Stimulierbarkeit der PBMCs durch *P.g.* und *E.coli* LPS auf ($p = 0,002$), verglichen mit den anderen Gruppen, deren Stimulationsindizes annähernd gleich groß sind. Für die Stimulierbarkeit der IL-8-Freisetzung wurden keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt.

IL-1 β und TNF- α sind die Zytokine, welche am besten in der Pathogenese der Parodontitis beschrieben sind. Sie werden mit der Destruktion parodontalen Halteapparates assoziiert (Preshaw & Taylor 2011). Die molekularen Mechanismen der Funktionen und Interaktionen von IL-1 β sind weitestgehend verstanden und in verschiedenen Übersichtsartikeln dargestellt (Boch et al. 2001; Dinarello 2005). Es ist unter anderem in die Aktivierung verschiedener Gene involviert, die wiederum für die Produktion anderer Zytokine sowie deren Rezeptoren, Proteine der akuten Phase, Wachstumsfaktoren, Enzyme für den Gewebeumbau, Komponenten der extrazellulären Matrix und Adhäsionsmoleküle verantwortlich sind (Dinarello

1996). Viele Studien haben sich mit der Untersuchung von IL-1 β in gingivalen Geweben und gingivaler Sulkusflüssigkeit bei Patienten mit verschiedenen Diagnosen bezüglich des parodontalen Gesundheitszustandes beschäftigt. In beiden Probenmaterialien konnte erhöhte IL-1 β -Expression positiv mit der Schwere der Parodontalerkrankung assoziiert werden (Scheres et al. 2010; Becerik et al. 2012). Dem gegenüber zeigten die Plasmaspiegel untersuchter proinflammatorischer Zytokine keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit chronischer Parodontitis, aggressiver Parodontitis und Gingivitis sowie gesunden Kontrollen (Becerik et al. 2012).

IL-1 β wird bei Parodontitispatienten durch zirkulierende Monozyten, Makrophagen und Fibroblasten gebildet (Boch et al. 2001). Auch auf die B-Zellen, insbesondere Gedächtnis-B-Zellen, entfällt ein Teil der Produktion dieses Zytokins sowie auch anderer Zytokine und Chemokine, zu denen u.a. IL-8 zählt (Agrawal & Gupta 2011).

Tanabe et al. behandelten Makrophagen, die aus U937 Monozyten isoliert wurden, mit niedrigen LPS-Dosen (10 bis 100 ng/ml) und beobachteten, dass diese Toleranz auf erneute LPS-Stimulation entwickelten, was sich vorrangig in einer signifikant reduzierten TNF- α -Sekretion zeigte. Die Toleranzreaktion war weiterhin mit erhöhter IL-1 β - und MMP-9-Sekretion assoziiert, wohingegen die Sekretion von IL-6, IL-8 und PGE₂ nicht beeinflusst war. Inhibitoren der PI-3-K, welche während der Toleranzinduktion zugegeben wurden, unterstützten die Steigerung der IL- β -Sekretion merklich, hatten aber keinen Effekt auf TNF- α (Tanabe & Grenier 2008).

Bei mehrfacher Stimulierung von Monozyten aus peripherem Blut mit *P.g.* LPS oder *E. coli* LPS in einer Konzentration von 1000 ng/ml konnten Muthukuru et al. eine Herabregulierung von TLR2 und TLR4 auf mRNA- und Proteinebene sowie von IL-1 β auf mRNA-Ebene beobachten. Des Weiteren wiesen sie eine circa 10-fache Reduktion der TNF- α -Sekretion nach (Muthukuru et al. 2005). Es ist anzumerken, dass eine erhöhte mRNA-Bildung nicht zwingend mit erhöhten Spiegeln von funktionell wirksamem IL-1 β einhergehen muss (Dinarello 1996).

Der Nachweis einer reduzierten TNF- α -Sekretion konnte bei wiederholter Stimulation von THP-1-Zellen mit LPS auch durch Zaric et al. erbracht werden (Zaric et al. 2010). Diese Arbeitsgruppe schloss durch die gleichbleibend hohe IL-8-Ausschüttung auf die Induktion einer partiellen Endotoxintoleranz, die zu gleichbleibend starker Migration von Neutrophilen bei gestörtem Gleichgewicht zwischen Generierung und Apoptose der Zellen dieser Zellpopulation führt (Zaric et al. 2010) und die parodontale Destruktion begünstigt.

In mehreren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die LPS-Konzentration im Blut von Parodontitispatienten erhöht ist, verglichen mit gesunden Individuen (Pussinen et al. 2007). Dies führt auch zu den vielfach beschriebenen systemischen gesundheitlichen Problemen, die durch Parodontitis induziert werden können (Pussinen et al. 2007; Brown et al. 2002). Demnach ist anzunehmen, dass auch die LPS-Konzentration im Blut der hier untersuchten Patienten erhöht ist und es somit zu einer „Vorstimulation“ der PBMCs mit niedrigen LPS-Dosen in der Blutbahn kam, wie sie in den Experimenten von Tanabe experimentell erzeugt wurde (Tanabe & Grenier 2008).

Eine von Shaddox et al. durchgeführte Untersuchung wies bei Stimulation des TLR4 peripherer Leukozyten im Blut von Patienten mit lokalisierter aggressiver Parodontitis eine erhöhte Produktion verschiedener pro-inflammatorischer Zyto- und Chemokine nach, verglichen mit Kulturen gesunder Probanden (Shaddox et al. 2010).

Patienten mit moderater chronischer Parodontitis weisen einen mildereren Erkrankungsverlauf als Patienten mit aggressiver Parodontitis auf. Dies spiegelt sich in den – trotz vergleichsweise größerer Plaquemengen (API = 36 %) und höherem Alter – lediglich moderaten Entzündungszeichen und Attachmentleveln wieder, die in der hier vorliegenden Untersuchung festgestellt wurden. In der gesunden Vergleichsgruppe, für die in der Analyse der subgingivalen Flora eine wesentlich geringere Besiedlung mit gram-negativen Keimen vorlag, wurde ein ähnliches Verhalten bezüglich der Stimulierbarkeit der IL-1 β -Freisetzung von PBMCs festgestellt, wie in der Gruppe mit aggressiver Parodontitis, die ein ähnliches mikrobiologisches Profil aufwies wie die Patienten mit moderater chronischer Parodontitis.

Induzierbarkeit einer LPS-Toleranz könnte bei Patienten mit aggressiver Parodontitis gestört sein und zur schnellen Progression des Entzündungsprozesses beitragen. Inwieweit die Erhöhung der Anzahl IL-1 β -produzierender Zellen auch mit der quantitativen Erhöhung der Menge an freigesetztem IL-1 β korreliert, kann anhand der hier durchgeführten Untersuchungen nicht einwandfrei vorhergesagt werden.

Tendenziell stimmt die Beobachtung der erhöhten IL-1 β -Menge nicht mit dem klinischen Bild des mildereren Erkrankungsverlaufes bei moderater chronischer Parodontitis überein, da IL-1 β ein proinflammatorisches Zytokin darstellt. Andere Autoren formulierten aber auch die Hypothese, dass eine Reduktion des IL-1 β -Spiegels die Fähigkeit des Wirtes, eine bakterielle Infektion abzuwehren, abschwächen könnte (Bostanci et al. 2007). Möglicherweise wird durch eine Erhöhung der IL-1 β -Produktion der PBMCs bei Patienten mit moderater chronischer Parodontitis die Apoptose der Neutrophilen, welche bei Patienten mit aggressiver Parodontitis aufgrund fehlender TNF- α -Mengen nur in reduziertem Maße abzulaufen scheint (Zaric et al. 2010), kompensiert und so die immunologische Homöostase bezüglich des Neutrophilenumsatzes im Gewebe aufrecht erhalten. Dies würde auch den Entzündungsprozess limitieren.

IL-8 spielt eine große Rolle bei der Entzündungsantwort, da es für Neutrophilenmigration und -aktivierung unerlässlich ist (Taylor 2010). Es wird auch als CXCL8 bezeichnet und ist ein proinflammatorisches CXC-Chemokin. Die Transkription des IL-8-Gens führt zur Bildung eines Proteins, das prozessiert und in ein signalkompetentes Protein von 77 (Nicht-Immunzellen) oder 72 (Monozyten und Makrophagen) Aminosäuren umgewandelt wird. Die Expression von IL-8 wird primär durch ein Aktivatorprotein und/oder die NF- κ B-vermittelte Transkriptionsaktivität reguliert. Zusätzlich wird die IL-8-Expression durch eine Anzahl verschiedener Stimuli, einschließlich inflammatorischer Signale (z.B. TNF α , IL-1 α), chemischen und umweltbedingten Stress (Chemotherapie, Hypoxie) und Steroidhormone (Androgene, Östrogene, Dexamethason) beeinflusst (Waugh & Wilson 2008).

Goncalves et al. konnten bei Stimulierung von PBMCs mittels LPS eine stärkere IL-8-Freisetzung bei gesunden Probanden, verglichen mit an chronischer Parodontitis erkrankten Patienten, beobachten (Goncalves et al. 2010). Dem gegenüber stehen Untersuchungen, die im Plasma von Patienten mit schwerer chroni-

scher Parodontitis eine erhöhte IL-8-Konzentration, verglichen mit gesunden Kontrollprobanden, nachweisen konnten, die zum Priming der Neutrophilen und somit zur verstärkten Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale führten (Dias et al. 2011).

Es ist bekannt, dass Zytokine einander kompensieren und somit den Effekt Zytokin-spezifischer Inhibitoren limitieren können. Die Modulierung eines Signalweges kann verschiedene Gene betreffen. Der MKK-MAPK-MK2-Signalweg ist in die Phosphorylierung verschiedener Zwischenprodukte involviert und reguliert so die Synthese proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF- α , GM-CSF und IL-8 durch deren mRNA-Stabilität (Li et al. 2012).

Es konnte nachgewiesen werden, dass IL-1 β sowie auch TNF- α und LPS durch MAPK/AP-1 und IKK $\alpha/\beta/I-\kappa B-\alpha/NF-\kappa B$ Signaltransduktionskaskaden aktivieren, welche die Synthese von IL-8, IL-6, PGE₂ und MMP-1 in humanen Parodontalligament-Zellen (Murayama et al. 2011) und auch gingivalen Fibroblasten (Kida et al. 2005) vermitteln. Die Inhibierung der p38 MAPK oder des NF- κB waren besonders effektiv bezüglich der Suppression der IL-1 β -Aktivität. Die lokale Applikation von p38-MAPK-Inhibitoren, Inhibitoren der NF- κB -Aktivierung, Proteasom-Inhibitoren und IKK-Inhibitoren könnten therapeutisch und klinisch nützlich bei der Therapie der destruktiven Parodontitis sein (Murayama et al. 2011). Möglicherweise existieren bei Patienten mit mildem Verlauf der parodontalen Erkrankung, wie sie bei moderater chronischer Parodontitis vorliegt, natürliche Inhibierungsmechanismen, welche die Signaltransduktion auf ein optimales Maß beschränken, welches die Neutrophilenrekrutierung und -aktivierung in sinnvollem Rahmen reguliert und so die Gewebshomöostase aufrecht erhält.

Auch Hyperlipidämie kann nachgewiesenermaßen einen Einfluss auf immunologische Abläufe haben. Eine erhöhte Konzentration oxidierten LDL (zum Beispiel 7-Ketocholesterol), wie es bei Patienten mit Übergewicht in verstärktem Maße auftritt, kann die IL-8-Produktion gingivaler Epithelzellen steigern. Inhibitoren des Scavenger-Rezeptors, Fucoidan und Dextransulfat, verhinderten die OxLDL-induzierte IL-8 und PGE₂-Produktion bei Anwesenheit von IL-1 β , ebenso wie die p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und SB202190 und der ERK-Inhibitor PD98059 (Suzuki et al. 2010). Diese Beobachtung könnte bei der Therapie von Parodontalerkrankungen eine Rolle spielen, ist aber unter Umständen auch ein Hinweis da-

rauf, dass nur bei Anwesenheit von IL-1 β die IL-8 und PGE₂-Produktion inhibiert werden kann. Schon 1996 wurde von Howells die Hypothese formuliert, dass destruktive Parodontalerkrankungen eher auf Regulationsstörungen von Inhibitoren als auf die Überproduktion von IL-1 und TNF- α zurückführbar sein könnten (Howells 1995).

5.2. Adaptive Immunität und Parodontitis

Die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit zeigen keine relevanten Unterschiede bezüglich der intrazellulär von T-Helferzellen freigesetzten Zytokine IL-4, IFN- γ und IL-17. Dem entsprechend wurde die aufgestellte Hypothese, es lägen Unterschiede vor im Anteil IL-4-produzierender T-Zellen zwischen Patienten mit aggressiver Parodontitis gegenüber Patienten mit chronischer Parodontitis und gesunden Probanden, widerlegt. Das Th1/Th2-Zellverhältnis ist somit nicht, wie hypothetisch angenommen, bei Patienten mit aggressiver Parodontitis erniedrigt im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Bei Untersuchung der B-Zellpopulationen im peripheren Blut stellte sich in der Gruppe mit moderater chronischer Parodontitis ein erhöhter Anteil der Gedächtnis-B-Zellen ohne Klassenwechsel heraus, verglichen mit den anderen Gruppen. Immundefekterkrankungen konnten anhand der Untersuchungsergebnisse bei allen Probanden ausgeschlossen werden.

Von Smith et al. werden Studien zusammengefasst, die sich mit der Untersuchung der T-Zellverteilung und dem Vorkommen sowie der Struktur von Plasmazellen in den parodontalen Läsionen verschiedener Patientengruppen befassen. Zusammenfassend wird formuliert, dass Entwicklung und Progression der aggressiven Parodontitis schlecht verstanden sind und bestimmte Erscheinungen, wie starkes Plasmazellinfiltrat und die Dominanz der B-Zell-Läsion, auch mit chronischer Parodontitis assoziierbar sind. Dies führt Smith darauf zurück. Dass die Immunpathogenese für beide Erkrankungen möglicherweise gleich ist, auch wenn die Initiation der Erkrankungen sich unterscheidet (Smith et al. 2010). Die verschiedenen Destruktionsraten, welche bei chronischer und aggressiver Parodontitis beobachtet werden, können demnach nicht durch histopathologische Beobachtungen erklärt werden (Armitage et al. 2010).

Bei der Untersuchung des Anteils IL-4-produzierender Th-Zellen, also der Th2-Zellen, sind in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede zwischen den Gruppen aufgefallen. Gonzales et al. konnten hingegen in einer explorativen Studie Zusammenhänge zwischen den IL-4 -590 T/T und -34 T/T Genotypen in PBMCs und generalisierter aggressiver Parodontitis nachweisen (Gonzales et al. 2007). Diese Genpolymorphismen werden mit einer erhöhten Expression von IL-4 beim Menschen assoziiert. IL-4 wiederum wird mit der Th2-Antwort und IgE-Freisetzung in Verbindung gebracht. Die untersuchten IL-4-Polymorphismen wurden auch bei Asthma (Rosenwasser & Borish 1997) und rheumatoider Arthritis (Pawlik et al. 2005) identifiziert.

Bei Patienten mit lokalisierter und generalisierter aggressiver Parodontitis wurden im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe erhöhte IL-17-Konzentrationen im Serum mittels ELISA nachgewiesen. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass die Th17-Zell-vermittelte Immunantwort für aggressive Parodontitis charakteristisch sein und IL-17 bei der Pathogenese der aggressiven Parodontitis eine Rolle spielen könnte (Schenkein et al. 2010). Die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen bestätigen diese Erkenntnisse nicht, da die Menge intrazellulär freigesetzten IL-17 nicht zwischen den untersuchten Gruppen differierte.

Hinweise auf das Vorliegen einer Autoimmunreaktion als Auslöser der aggressiven Parodontitis werden anhand der vorliegenden Untersuchungsergebnisse, die keine Unterschiede bezüglich der adaptiven Immunität zwischen der Gruppe mit aggressiver Parodontitis und gesunden Probanden aufzeigen, nicht gesehen. Der Regulationsmechanismus für die Kontrolle der Immunantwort bei aggressiver Parodontitis wird daher auf der Ebene der angeborenen Immunantwort vermutet.

Durch die Untersuchungen dieser Arbeit konnten im peripheren Blut keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen im Anteil der T-Zellpopulationen und CD19-positiven B-Zellen nachgewiesen werden. Die Regulation durch MCP und MIP könnte jedoch auf lokaler Ebene die adaptive Immunantwort regulieren. MCP spielt eine Rolle bei der Rekrutierung von Th1- und Th2-Zellen, es bewirkt unter anderem die selektive Migration von Monozyten und Lymphozyten, wobei MIP-1 α hauptsächlich als chemotaktischer Faktor für B-Zellen und CD8⁺ T-Zellen wirkt und MIP-1 β vor allem für die Migration von CD4⁺ T-Zellen verantwortlich zu sein

scheint (Schall et al. 1993). In neueren Untersuchungen wurde ein Anstieg der MCP-1-Expression in *P. gingivalis*-infizierten Endothelzellen durch ROS, p38 MAP Kinase, JNK, NF- κ B und AP-1 gezeigt. *T. denticola* war nicht in der Lage, die MCP-1-Expression zu induzieren. Behandlung mit Antioxidantien und Inhibierung der NAD(P)H-Oxidase konnten die MCP-Produktion signifikant reduzieren (Choi et al. 2005). Garlet et al. wiesen in Gingivabiopsien von Patienten mit aggressiver Parodontitis eine höher frequente und quantitativ stärkere Expression der Chemokine „Macrophage inflammatory protein-1 α “ (MIP-1 α) und „IFN- γ -inducible protein 10“ (IP-10) sowie deren entsprechenden Rezeptoren, CCR5 und CXCR3, nach; die Gewebe waren außerdem mit einer höheren Expression von IFN- γ und niedrigerer Expression von IL-10 assoziiert. Im Gegensatz dazu wurde bei Patienten mit chronischer Parodontitis eine höher frequente und intensivere Expression von Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) und seinem Rezeptor CCR4 sowie IL-10 gezeigt (Garlet et al. 2003). Diese Ergebnisse zur Expression spezifischer Chemokine und ihrer Rezeptoren bei aggressiver Parodontitis könnten auf die Chemoattraktion/Aktivierung von Th1-Helferzellen hindeuten, die einen Widerspruch zu der feststehenden Erkenntnis darstellt, die aggressive Parodontitis sei vorwiegend durch B-Zellen, Plasmazellen und Th2-Zellen vermittelt. Es scheinen vielfältige Regulations- und Kompensationsmechanismen auf verschiedenen Ebenen der Immunantwort vorzuliegen, die in ihrer Komplexität nicht hinreichend verstanden sind.

Möglicherweise liegt ein protektiver Mechanismus bei Patienten mit moderater chronischer Parodontitis im erhöhten Anteil an Gedächtnis-B-Zellen, die eine schnell wirksame adaptive Immunantwort durch die Bildung von Immunglobulinen hoher Avidität gegen entsprechende Antigene einleiten können (Murphy 2012), begründet. Dieser Zusammenhang konnte allerdings aufgrund der geringen Stichprobengröße nicht als statistisch signifikant nachgewiesen werden und sollte in einer Folgestudie reevaluiert werden.

Von Sugita et al. wurde ein höheres klinisches Attachmentlevel nachgewiesen bei Patienten mit chronischer Parodontitis, die den Fc γ RIIB-nt645+25AA Genotyp aufweisen im Vergleich zu Patienten mit Fc γ RIIB-nt645+25GG Genotyp. Der Fc γ RIIB ist ein Immunglobulin-Rezeptor, welcher die Aktivierung von B-

Lymphozyten mit B-Zellrezeptor durch Immunkomplexe vermittelt. Er fungiert als negativer Regulator der Antikörper-Produktion. Die Expression des FcγRIIB ist bei Patienten mit dem AA-Genotypen erhöht, was zu reduzierter Produktion von IgG gegen *P.g.* führt und so zur Ausprägung eines erhöhten Schweregrades der Parodontitis beitragen könnte (Sugita et al. 2012).

In Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde bei Patienten mit moderater chronischer Parodontitis die Tendenz eines erhöhten Gedächtnis-B-Zell-Anteils und einer verstärkte Stimulierbarkeit der PBMCs bezüglich ihrer IL-1β-Freisetzung bei LPS-Exposition festgestellt. Da IL-1β durch die Induktion der IL-6-Produktion auch die Immunglobulinsynthese durch Lymphozytenaktivierung anregt (Murphy 2012), kann davon ausgegangen werden, dass höhere IgG-Mengen bei Patienten mit moderater chronischer Parodontitis freigesetzt werden als in den anderen Gruppen. Eine schnelle und effiziente Produktion von IgG ist eine mögliche Erklärung für den milderen Verlauf der parodontalen Erkrankung bei Patienten mit moderater chronischer Parodontitis, verglichen mit aggressiver Parodontitis, die das Zusammenspiel zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort verdeutlicht.

5.3. Mikrobiologie und Parodontitis

In der vorliegenden Arbeit wurden die Prädominanz bekannter Parodontopathogene in den an Parodontitis erkrankten Gruppen nachgewiesen und Zusammenhänge zwischen *P. denticola* und aggressiver Parodontitis sowie klinischem Attachmentlevel aufgezeigt, was *P. denticola* potentiell zu einem neuen parodontopathogenen Keim macht, der als solcher in der Literatur noch nicht explizit erwähnt wurde.

Durch Forschungen ist inzwischen fest etabliert, dass dentale Plaque als Biofilm und Parodontitis als eine Biofilm-assoziierte Erkrankung anzusehen ist. Die vielen Vorteile, die das Leben im Biofilm gegenüber der planktonischen Lebensweise für Bakterien hat, macht die Behandlung von Infektionen schwierig (Berezow & Darveau 2011).

Die mikrobiologische Besiedlung an gesunden und pathologisch veränderten Situs unterscheidet sich quantitativ wie auch qualitativ (Darveau 2009). Untersuchungen

supra- und subgingivalen Biofilms von Patienten mit gesunden parodontalen Zuständen sowie Parodontitis zeigten, dass die durchschnittliche totale Anzahl an DNA-Proben, die bei gesunden Probanden sowohl im supra- als auch im subgingivalen Biofilm isoliert werden konnte, geringer war als die von Patienten mit Parodontitis (Ximénez-Fyvie et al. 2000). Bei der Entwicklung einer Parodontitis wurde die Verschiebung der mikrobiellen Flora mit Erhöhung des Anteils gramnegativer Organismen um 15 bis 50%, verglichen mit parodontal gesunden Zuständen, festgestellt (Haffajee & Socransky 1994; Darveau et al. 1997). In der vorliegenden Untersuchung konnte eine höhere quantitative Menge anaerober gramnegativer Bakterien bei Parodontitis-Patienten festgestellt werden als bei gesunden Probanden; *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Prevotella oralis*, *Parvimonas micra* und *Prevotella denticola* konnten tendenziell mit parodontaler Erkrankung assoziiert werden (Tabelle A-1). Damit werden Untersuchungen, die das Vorhandensein parodontopathogener Bakterien wie *P. gingivalis* und *P. intermedia* mit parodontalen Läsionen korrelieren konnten (Gajardo et al. 2005; Lafaurie et al. 2007; Ximénez-Fyvie et al. 2000; Darveau 2009), bestätigt. Die durchgeführten Untersuchungen weisen auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *P. gingivalis* und zunehmendem Alter des Patienten, der auch durch Nibali et al. beschrieben wird (Nibali et al. 2012), hin. Entsprechend den Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen, die durch Mombelli et al. zusammengefasst wurden (Mombelli et al. 2002), wird auch durch die in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen keine Unterscheidung zwischen aggressiver und chronischer Parodontitis anhand der Besiedelung durch diesen Keim mit statistischer Signifikanz nachgewiesen.

Riep et al. zeigten, dass parodontale Pathogene wie *P. gingivalis* und *T. forsythia* auch regelmäßig bei gesunden Patienten isoliert werden können (Riep et al. 2009; Lafaurie et al. 2007; Haubek et al. 2008; van Winkelhoff et al. 2002). Bestehende Grundsätze wurden direkt widerlegt mit der Beobachtung, dass *Veillonella* als gram-negative Bakterien mit parodontal gesunden Zuständen assoziiert sind (Stingu et al. 2012), wohingegen der gram-positive anaerobe *Filifactor alocis* mit der Erkrankung in Verbindung gebracht wurde (Kumar et al. 2006). Auch in den hier durchgeführten Untersuchungen wurden anaerobe und potentiell parodonto-

pathogene Spezies – wie *Veillonella*, *Capnocytophaga*, *F. nucleatum* und *P. intermedia* – im gingivalen Sulkus parodontal gesunder Probanden nachgewiesen (Tabelle 3). Insgesamt wurden allerdings mehr anaerobe Spezies je Individuum in den Patientengruppen als in der gesunden Kontrollgruppe (Tabelle A-1) isoliert. Dies entspricht Ergebnissen von Stingu et al., die *P. intermedia* und *F. nucleatum* ebenfalls in geringen Proportionen und Mengen bei gesunden Individuen isolieren konnten (Stingu et al. 2012). Statistisch signifikante Unterscheidungen bezüglich des mikrobiologischen Profils zwischen den untersuchten Gruppen sind aufgrund der geringen Stichprobengröße sehr schwer nachweisbar.

Bei keinem der hier untersuchten Probanden konnte *A. actinomycetemcomitans* detektiert werden. Des Weiteren wurde bei keinem der Patienten mit aggressiver Parodontitis *P. gingivalis* gefunden. Dies entspricht den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Faveri, denen auch unter Verwendung der hoch-sensitiven 16S rRNA-Sequenzierung kein Nachweis von *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* bei Patienten mit generalisierter aggressiver Parodontitis gelang (Faveri et al. 2008). In Untersuchungen von Gajardo et al. konnte hingegen in subgingivalem Biofilm bei chilenischen Patienten höhere Prävalenz von *Porphyromonas gingivalis* bei aggressiver Parodontitis als bei chronischer Parodontitis nachgewiesen werden, jedoch ohne statistische Signifikanz (Gajardo et al. 2005).

Lafaurie et al. fassten die Erkenntnisse einer von ihnen durchgeführten Multicenter-Studie in Kolumbien zusammen, indem sie formulierten, dass die mikrobielle Flora in Abhängigkeit von unterschiedlichen geografischen Regionen variieren könnte (Lafaurie et al. 2007). Dies würde eine mögliche Erklärung für die teilweise inhomogenen Untersuchungsergebnisse zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen bezüglich der Zusammensetzung des subgingivalen Biofilms darstellen.

Grundsätzlich ist durch neuere Forschungsergebnisse verdeutlicht worden, dass nicht alle Stämme und Serotypen potentiell parodontopathogener Bakterien, wie *A. actinomycetemcomitans* (Haubek et al. 2008; Haubek 2010) und *P. gingivalis* (Kilian et al. 2006), in gleichem Maße toxisch sind. Daraus ergibt sich die logische Konsequenz, dass die mikrobiologische Untersuchung als Analyse der einzelnen spezifischen Stämme durchgeführt werden sollte statt alle Varianten einer Spezies

zusammenzufassen. Da dies in aktuell durchgeführten mikrobiologischen Untersuchungen nicht getan wird, ist deren Nutzen zu diskutieren.

5.4. Methodenkritik

Die Auswahl des ELISpot-Assays zur Untersuchung der Zytokin- und Chemokinproduktion auf Einzelzellniveau kann als positiver Aspekt in die Methodenkritik einbezogen werden, da es eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität besitzt (beispielsweise kann ein spezifischer T-Zell-Klon auf 100.000 untersuchte Zellen identifiziert werden). Der Einfriervorgang und das Auftauen der Zellen haben laut Datenlage bei korrekten Arbeitsabläufen keinen negativen Einfluss auf die Ergebnisse des Assays (Kalyuzhny 2005). Das ELISpot-Assay stellt eine nützliche Methode dar, mit der auch Zellen der angeborenen Immunantwort funktionell auf Einzelzellniveau untersucht werden können (Smedman et al. 2009). Die Durchführung ist mit geringen Zellzahlen möglich, was sich günstig auf die praktische Durchführbarkeit bei Forschungsvorhaben auswirkt, da auch mit wenig Probenmaterial auswertbare Ergebnisse gewonnen werden können. Da nach dem Auftauen eine Überprüfung der Vitalität der eingefrorenen Zellen durch Anfärben mit Trypanblau und eine Zellzählung erfolgte, kann davon ausgegangen werden, dass der Anteil toter Zellen gering war.

Eine Ruheseekretion (ohne Stimulation) von IL-8- und IL-1 β , die in den durchgeführten Untersuchungen bei PBMCs aller Probandengruppe beobachtet wurde, ist für IL-8 in ähnlichem Maß auch durch andere Arbeitsgruppen beschrieben worden. Sie wird auf CD14+ Monozyten zurückgeführt, da nach deren Eliminierung die Ruheseekretion von IL-8 erheblich abnahm (Smedman et al. 2009).

Die aus organisatorischen Gründen durchgeführte Kryokonservierung der PBMCs könnte Einfluss auf die Funktionsfähigkeit der Zellen gehabt haben. Die Resultate von Chen et. al zeigen, dass die beste Wahl für in-vitro-Stimulationsstudien die Verwendung von frischem Vollblut ist. Dies wurde anhand der TNF α -Genexpression nach der Stimulation von frischem Vollblut, frischen PBMCs und eingefrorenen PBMCs mit LPS nachvollzogen. Kryokonservierung kann laut verschiedener Autoren zu signifikanten Veränderungen des Zellüberlebens, der Zytokinproduktion und der Oberflächenmarker von PBMCs führen. Des Weiteren führt

der Einfriervorgang zu einem selektiven Verlust der Lymphozyten und ist als zelltoxisch beschrieben worden. Aus diesem Grund seien Untersuchungsergebnisse schwer zu bewerten, da zerstörte Zellpopulationen möglicherweise die Zytokine von Interesse produzieren (Chen et al. 2010). Da solche Einflüsse trotz sorgfältiger Arbeit nicht auszuschließen sind, könnten sie unter Umständen die Ruhesekretion von IL-1 β erklären, die in anderen Untersuchungen mit ähnlichem Aufbau aber unter der Verwendung frischer Zellen nicht beobachtet wurde (Smedman et al. 2009) .

Unter Berücksichtigung der beobachteten Ergebnisse wäre die zusätzliche Bestimmung der TNF- α -Sekretion eine sinnvolle Ergänzung der Untersuchungen gewesen, um Vergleichbarkeit mit den oben genannten Studien von Muthukuru (2006) und Tanabe (2008) herzustellen. Ein Vorteil der hier durchgeführten Studie ist die Herstellung der Vergleichbarkeit zwischen aggressiver und moderater chronischer Parodontitis neben der Gegenüberstellung mit einer gesunden Kontrollgruppe.

Die Methodenauswahl in der Untersuchung des mikrobiologischen Profils ist aufgrund der vielfältigen Untersuchungsmöglichkeiten in diesem wissenschaftlichen Gebiet zu diskutieren. Mikrobiologische Methoden weisen starke Variation auf und basieren auf traditionellen Methoden wie Kultivierung und molekularbiologischen Methoden. Es ist möglich, verschiedene sowie unerwartete Bakterienspezies gleichzeitig zu detektieren und relative und absolute Keimzahlen zu bestimmen (D'Ercole et al. 2008). Eine relevante Fragestellung der vorliegenden Arbeit bestand in der Identifizierung anaerober Bakterien. Die Selektion der Anaerobier und deren Vermehrung stellt dabei eine praktische Eigenschaft der mikrobiologischen Diagnostik dar. Ein weiterer positiver Aspekt der klassischen Mikrobiologie ist die Möglichkeit, neue Erkenntnisse bezüglich der Keimkonstellation zu gewinnen. Nachteile bestehen darin, dass durch kulturelle Methoden Probleme bei der Unterscheidung eng verwandter Taxa und der Vitalerhaltung parodontopathogener Bakterien auftreten können (Jervøe-Storm et al. 2005; Urbán et al. 2010). Aus diesen Gründen werden Methoden, die unabhängig von der Kultivierung der Bakterien sind, bei der Untersuchung der mikrobiologischen Zusammensetzung in der menschlichen Mundhöhle als nützlich beschrieben (Sakamoto et al. 2005). Zu den

kaum kultivierbaren Spezies zählt *T. denticola*. Dies könnte eine Begründung für den fehlenden Nachweis dieser Spezies in der hier durchgeführten Untersuchung darstellen.

Generell kann die Differenzierung zwischen aggressiver und chronischer Parodontitis bei der klinischen Zuordnung ein Problem darstellen, wenn es zu Überschneidung bei der Diagnosestellung, insbesondere zwischen schwerer chronischer Parodontitis und aggressiver Parodontitis kommt (Armitage & Cullinan 2010). Es existiert zum aktuellen Zeitpunkt kein Konsens bezüglich einer optimalen Definition parodontaler Erkrankungen für wissenschaftliche Fragestellungen (Demmer & Papapanou 2010; Savage et al. 2009). Präzise Richtlinien zur bestmöglichen Falldefinition in parodontologischen Studien sind durch keines der aktuell gültigen oder vorgeschlagenen Klassifikationssysteme parodontaler Erkrankungen gegeben (Armitage & Cullinan 2010). In der vorliegenden Untersuchung werden Patienten mit aggressiver Parodontitis und moderater chronischer Parodontitis untersucht. Diese Erkrankungsformen sind unter anderem aufgrund objektiver Unterschiede im klinischen Attachmentlevel gut voneinander zu differenzieren. Die Definition der Probandengruppen wurde des Weiteren mit dem Ziel vorgenommen, die unterschiedliche Ausprägung der Parodontitis in den Patientengruppen immunologischen und mikrobiologischen Befunden zuzuordnen. Große Unterschiede im Ausprägungsgrad der Parodontitis, respektive der Anfälligkeit für Parodontitis, zwischen den untersuchten Gruppen erschienen geeignet, die möglicherweise dafür ursächlichen Unterschiede im Immunsystem zu detektieren.

Es ist kritisch zu bemerken, dass es sich bei der Patientengruppe mit aggressiver Parodontitis sowohl um Patienten mit lokalisierter als auch generalisierter Form der Erkrankung handelt. Möglicherweise liegen zwischen diesen Gruppen Unterschiede in der immunologischen sowie mikrobiologischen Charakteristik vor. Dies ist in der Literatur umstritten. Pocolos et al. konnten keine Unterschiede bezüglich Antikörpertiter oder Entzündungsablauf zwischen lokalisierter und generalisierter aggressiver Parodontitis feststellen (Pocolos et al. 2005). Andere Untersuchungsergebnisse wiesen erhöhte Antikörpertiter gegen *A. actinomycetemcomitans* bei Patienten mit lokalisierter aggressiver Parodontitis nach (Genco et al. 1985). Es ist wissenschaftlich erwiesen, dass nur der hochgradig leukotoxische Klon von *A.*

actinomycescomitans, JP2 Serotyp b, mit aggressiver Parodontitis assoziiert werden kann und dieser spezifisch für Individuen mit mediterranen oder westafrikanischen Vorfahren ist (Haubek 2010). Länger zurück liegende Untersuchungen spezifischer Immunglobulin-Antikörpertiter gegen *A. actinomycescomitans* sollten demnach zurückhaltend interpretiert werden. Des Weiteren sollte die diagnostische Bedeutung der Antikörperbestimmung kritisch hinterfragt werden, da der Nachweis von Immunglobulin G, das spezifisch für ein einzelnes Pathogen ist, lediglich als Nachweis für die Exposition gegenüber diesem Pathogen interpretiert werden kann (Pussinen et al. 2007). Eine Korrelation mit dem klinischen Erscheinungsbild ist nicht beschrieben.

Die Unterschiede im Alter der in diese Untersuchung eingeschlossenen Probanden sind insofern kritisch zu betrachten, als dass sie Einfluss auf die Zytokinproduktion von PBMCs haben könnten. Bezüglich der IL-1 β -Produktion von PBMCs werden keine Veränderungen in Abhängigkeit vom Alter der Patienten beschrieben (Dinarello 1996).

5.5. Weiterführende Überlegungen

Die durchgeführten Untersuchungen wiesen bei LPS-Stimulation eine verstärkte Freisetzung von IL-1 β durch PBMCs von Patienten mit moderater chronischer Parodontitis nach. Weiterhin wurde, verglichen mit den anderen Gruppen, eine Erhöhung im Anteil der Gedächtnis-B-Zellen ohne Klassenwechsel gezeigt. Aufgrund dieser Ergebnisse und der bereits thematisierten Erkenntnisse aus Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, wird die Hypothese aufgestellt, dass sich bei Patienten mit moderater chronischer Parodontitis eine Selbstlimitierung der parodontalen Destruktion durch Balance zwischen Immunantwort und mikrobieller Herausforderung einstellt. Diese scheint aus der adäquaten Freisetzung von IL-1 β aus PBMCs bei Stimulation durch PAMPs und der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses mit schneller Antigenerkennung und Aktivierung der adaptiven Immunantwort zu resultieren. Es wird hypothetisch angenommen, dass dieses Gleichgewicht bei Patienten mit aggressiver Parodontitis gestört ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen an Patienten mit aggressiver Parodontitis deuten auf Hyporesponsivität der PBMCs bei Stimulierung mit LPS und zu geringe

Anzahl von Gedächtnis-B-Zellen, verglichen mit der Gruppe mit moderater chronischer Parodontitis, hin. Diese Beobachtungen sprechen für eine inadäquate Immunantwort bei bakterieller Herausforderung und könnten eine Erklärung für den schweren Erkrankungsverlauf darstellen, der vor allem bei generalisierter aggressiver Parodontitis beschrieben wird. „Selbstlimitierung der Progression des Abbaus von parodontalem Halteapparat und Knochenverlust“ wurde bislang nur für die lokalisierte aggressive Parodontitis beschrieben, wo sie mit erhöhten Serumantikörper-Titern auf die der Infektion zugrunde liegenden Pathogene assoziiert wird (Lang et al. 1999; Lu et al. 1994). Es ist zu bedenken, dass nicht nur der Antikörperspiegel, sondern vielmehr die Avidität der Antikörper, die Immunantwort gegen Parodontalpathogene determinieren (Cole et al. 1995).

Wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, wurden 0,5 ml EDTA-Blut jedes Studienteilnehmers eingefroren. Des Weiteren wurde bei der Lymphozytenpräparation Serum abgenommen und in zwei Aliquotes á 1 ml eingefroren. Dieses Probenmaterial stünde für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

Wie aus der Diskussion hervorgeht, haben verschiedene Arbeitsgruppen Immunglobuline, insbesondere spezifische Immunglobuline gegen verschieden Parodontalpathogene, im peripheren Blut von Parodontitispatienten bestimmt und mit den Werten gesunder Kontrollprobanden verglichen (Pussinen et al. 2007; Picoles et al. 2005; Mooney et al. 2001). Diese Untersuchungen könnten anhand der Serumproben der rekrutierten Probanden ebenfalls durchgeführt werden, wobei mögliche Unterschiede zwischen Patienten mit aggressiver und moderater chronischer Parodontitis interessant wären.

Weiterhin ist die Untersuchung von Genpolymorphismen der in dieser Arbeit thematisierten Zyto- und Chemokine anhand des EDTA-Blutes möglich. Da in den durchgeführten Untersuchungen Unterschiede bezüglich stimulierter IL-1 β -Freisetzung der PBMCs zwischen den untersuchten Gruppen feststellbar waren, wäre die Bestimmung des IL-1 β -3954-Genpolymorphismus (C \rightarrow T) eine mögliche weiterführende Untersuchung. Bislang gewonnene Ergebnisse diesbezüglich sind widersprüchlich. Eine Untersuchung an brasilianischen Patienten und gesunden Kontrollen wies bei Patienten mit chronischer Parodontitis einen höheren Anteil der Träger des T-Allels nach als bei Patienten mit aggressiver Parodontitis und

gesunden Kontrollen (Moreira et al. 2005). Des Weiteren wurde beschrieben, dass Homozygote für das C-Allel (Allel 1) anscheinend resistenter gegenüber Parodontalerkrankungen sind (López et al. 2005; Quappe et al. 2004). Auch der Promotorpolymorphismus am Locus -511 wurde mit Veränderungen in der IL-1 β -Freisetzung assoziiert: Patienten mit T/T-Genotyp scheinen eine erhöhte Synthesekapazität für das Zytokin aufzuweisen (Mattila et al. 2002). Es existieren Studien, in welchen dieser Genpolymorphismus bei Patienten mit aggressiver Parodontitis untersucht wurde, allerdings ohne signifikante Zusammenhänge nachweisen zu können (Scapoli et al. 2005; Tai et al. 2002). Patienten mit chronischer Parodontitis wurden in den genannten Studien nicht untersucht. Trevilatto et al. konnten bei Mulatten und Afroamerikaner unter den von ihnen untersuchten Brasilianern einen Zusammenhang zwischen dem T-Allel für IL-1 β (C-511T) und chronischer Parodontitis feststellen.

Bei der Durchführung genetischer Untersuchungen sollte über eine Vergrößerung der Patientenkohorte nachgedacht werden, um statistisch aussagekräftige Ergebnisse erwarten zu können.

6. Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med. dent.

Immunregulation bei aggressiver Parodontitis im Vergleich mit moderater chronischer Parodontitis und gesundem Parodontium

eingereicht von: Jana Schmidt

angefertigt am: Institut für Klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

betreut von: Herrn Professor Dr. med. Ulrich Sack

Mitbetreuer: Herr Professor Dr. med. Dr. h.c. Holger Jentsch
Leiter des Funktionsbereiches Parodontologie, Poliklinik für
Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie

Juni 2012

Parodontale Erkrankungen sind in den letzten Jahren Gegenstand allgemeinmedizinischen sowie zahnärztlichen Interesses geworden. Die Ätiopathogenese der Parodontitis, insbesondere der schnell progredienten und nicht direkt mit lokalen Faktoren assoziierbaren aggressiven Parodontitis, ist bislang in ihren immunologischen Abläufen nicht hinreichend geklärt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Generierung eines Konzeptvorschlags für das Risikoprofil von Patienten mit aggressiver Parodontitis. Zur immunologischen Charakterisierung der untersuchten Individuen wurden T- und B-Zell-Subpopulationen, Freisetzung intrazellulärer Zytokine aus T-Helferzellen und Stimulierbarkeit der IL-1 β - und IL-8-Freisetzung aus PBMCs bei jedem Studienteilnehmer bestimmt. Des Weiteren stellt die Gewinnung von Informationen zur mikrobiologischen Zusammensetzung der subgingivalen Flora der Studienteilnehmer Vergleichbarkeit zu anderen Studien her und eröffnet die Möglichkeit der explorativen Eruiierung von Zusammenhängen zwischen mikrobiologischen und immunologischen Befunden.

Entsprechend vorliegendem Ethikvotum wurden 15 Patienten mit aggressiver Parodontitis, 11 Patienten mit moderater chronischer Parodontitis und 14 gesunde Kontrollprobanden rekrutiert. Die parodontologische Untersuchung umfasste die Sechspunktmessung von klinischem Attachmentlevel (CAL), Taschentiefe (TT) und Blutung bei Sondierung der Tasche (BOP) an allen Zähnen sowie die Erhebung von proximalem Plaque-Index (API) und modifiziertem Sulkus-Blutungs-Index (SBI). Des Weiteren wurden 18 ml Heparin-Blut und 6 ml EDTA-Blut als Probenmaterial für immunologische Untersuchungen entnommen. Die Untersuchungen verschiedener Bestandteile der angeborenen und adaptiven Immunantwort wurden mittels durchflusszytometrischer Methoden und Enzymgekoppeltem Immunosorbent Spot (ELISpot) Assay an aufgetauten PBMCs durchgeführt. Im ELISpot-Assay wurden die PBMCs mittels *E.coli* LPS, *P.g.* LPS und CWPS sowie dem Peptidpool CEF stimuliert. Die durchflusszytometrisch ermittelten Daten werden deskriptiv als Vergleich der untersuchten Gruppen ausgewertet.

Für die mikrobiologischen Untersuchungen wurden subgingivale Plaqueproben mittels steriler Papierspitzen aus den vier Stellen mit dem höchsten Wert für TT gewonnen und sofort kultiviert. Alle anaeroben Stämme wurden biochemisch identifiziert. Bei Bedarf erfolgte die Identifizierung mittels sequenzieller Analyse der 16S ribosomalen-RNA-Gene. Zusammenhänge zwischen mikrobiologischen und immunologischen Befunden wurden explorativ unter Verwendung der Tests nach Mann-Whitney und Kruskal-Wallis untersucht. Bei $p < 0,05$ wird der Zusammenhang aufgeführt.

Bezüglich der B-Zell-Subpopulationen und der Produktion intrazellulärer Zytokine durch T-Zellen sind keine pathologischen Befunde nachweisbar. Die explorative Untersuchung des Gedächtnis-B-Zell-Anteils lässt einen erhöhten Anteil dieser B-Zellsubpopulation in der Gruppe mit chronischer Parodontitis, verglichen mit den anderen Gruppen, erkennen. Das Th1/Th2-Verhältnis im peripheren Blut liegt bei allen untersuchten Individuen ohne nennenswerte Unterschiede zwischen den Gruppen im physiologischen Bereich.

Im ELISpot-Assay unterscheidet sich die in-vitro durch bakterielle Antigene induzierte Stimulierung der PBMCs von Patienten mit aggressiver Parodontitis bezüglich der Freisetzung von IL-8 und IL-1 β nicht von der gesunder Individuen. Bezüg-

lich der IL-1 β -Freisetzung bei in-vitro Stimulation mit *P.g.* und *E.coli* LPS liegt eine erhöhte Stimulierbarkeit der PBMCs von Patienten mit moderater chronischer Parodontitis im Vergleich zu den anderen Gruppen vor.

Die mikrobielle Besiedelung unterscheidet sich zwischen Patientengruppen und Kontrollgruppe. Quantitativ als auch qualitativ sind Unterschiede in der Zusammensetzung subgingivaler Plaque nachweisbar, mit einer quantitativ höheren Menge gram-negativer Anaerobier bei den Patientengruppen. Bekannte parodontopathogene Spezies wurden gefunden und *Prevotella denticola* als ein möglicherweise neues, mit aggressiver Parodontitis assoziiertes Pathogen, welches in der Literatur bislang nicht explizit beschrieben wurde, identifiziert. Der Vergleich zwischen Patienten mit chronischer Parodontitis und gesunden Probanden lässt eine starke Assoziation der Parodontopathogene *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Prevotella oralis* mit moderater chronischer Parodontitis erkennen. Patienten mit aggressiver Parodontitis weisen gehäuft *Prevotella oralis*, *Parvimonas micra* und *Anaerococcus prevotii* beim Vergleich mit gesunden Individuen auf. Der Vergleich zwischen chronischer und aggressiver Parodontitis zeigt die Prädominanz von *Porphyromonas gingivalis* bei chronischer Parodontitis und *Anaerococcus prevotii* bei aggressiver Parodontitis.

Entgegen der Hypothese zeichnen sich Unterschiede bezüglich der mikrobiellen Flora bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis ab. Des Weiteren wurden Zusammenhänge zwischen dem Nachweis bestimmter Bakterien und der Stimulierbarkeit der IL-1 β -Freisetzung, der B-Zelldifferenzierung und dem T-Zellverhältnis gefunden. Die Erstellung eines differenzierten immunologischen Risikoprofils für Patienten mit aggressiver Parodontitis ist anhand der hier durchgeführten Untersuchungen nicht möglich. Es werden jedoch entscheidende Unterschiede zur Gruppe mit moderater chronischer Parodontitis deutlich, die auf fehlende Balancierung zwischen Immunantwort und bakterieller Herausforderung bei aggressiver Parodontitis hindeuten.

Anhand der Untersuchungsergebnisse kann vermutet werden, dass sich ein Gleichgewicht zwischen Immunantwort und bakterieller Herausforderung bei Patienten mit moderater chronischer Parodontitis einstellt, das mit Limitierung der Schwere und Progression der Erkrankung einhergeht.

7. Literaturverzeichnis

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I. & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (11), 5721-5732.
- Agrawal, S. & Gupta, S. (2011). TLR1/2, TLR7, and TLR9 signals directly activate human peripheral blood naive and memory B cell subsets to produce cytokines, chemokines, and hematopoietic growth factors. *Journal of Clinical Immunology*, 31 (1), 89-98.
- Akira, S. (2011). Innate immunity and adjuvants. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 366 (1579), 2748-2755.
- Al-Ahmad, A., Roth, D., Wolkewitz, M., Wiedmann-Al-Ahmad, M., Follo, M., Ratka-Krüger, P. et al. (2010). Change in diet and oral hygiene over an 8-week period: effects on oral health and oral biofilm. *Clinical Oral Investigations*, 14 (4), 391-396.
- Albandar, J. M. (2011). Underestimation of periodontitis in NHANES surveys. *Journal of Periodontology*, 82 (3), 337-341.
- Armitage, G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology / The American Academy of Periodontology*, 4 (1), 1-6.
- Armitage, G. C. (2010). Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, 53, 70-88.
- Armitage, G. C. & Cullinan, M. P. (2010). Comparison of the clinical features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, 53, 12-27.
- Armitage, G. C., Cullinan, M. P. & Seymour, G. J. (2010). Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis: introduction. *Periodontology 2000*, 53, 7-11.
- Bartold, P. M., Cantley, M. D. & Haynes, D. R. (2010). Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontology 2000*, 53, 55-69.
- Becerik, S., Ozgen Öztürk, V., Atmaca, H., Atilla, G. & Emingil, G. (2012). Gingival Crevicular Fluid and Plasma Acute Phase Cytokine Levels in Different Periodontal Diseases. *Journal of Periodontology*.
- Berezow, A. B. & Darveau, R. P. (2011). Microbial shift and periodontitis. *Periodontology 2000*, 55 (1), 36-47.
- Berezow, A. B., Ernst, R. K., Coats, S. R., Braham, P. H., Karimi-Naser, L. M. & Darveau, R. P. (2009). The structurally similar, penta-acylated lipopolysaccharides of *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides* elicit strikingly different innate immune responses. *Microbial Pathogenesis*, 47 (2), 68-77.
- Berglundh, T. & Donati, M. (2005). Aspects of adaptive host response in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 32 Suppl 6, 87-107.
- Berglundh, T., Donati, M. & Zitzmann, N. (2007). B cells in periodontitis: friends or enemies? *Periodontology 2000*, 45, 51-66.
- Boch, J. A., Wara-aswapati, N. & Auron, P. E. (2001). Interleukin 1 signal transduction--current concepts and relevance to periodontitis. *Journal of Dental Research*, 80 (2), 400-407.

- Bostanci, N., Allaker, R., Johansson, U., Rangarajan, M., Curtis, M. A., Hughes, F. J. et al. (2007). Interleukin-1alpha stimulation in monocytes by periodontal bacteria: antagonistic effects of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiology and Immunology*, 22 (1), 52-60.
- Brett, P. M., Zygogianni, P., Griffiths, G. S., Tomaz, M., Parkar, M., D'Aiuto, F. et al. (2005). Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *Journal of Dental Research*, 84 (12), 1149-1153.
- Brown, L. J., Johns, B. A. & Wall, T. P. (2002). The economics of periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 29, 223-234.
- Cairo, F., Nieri, M., Am Gori, Tonelli, P., Branchi, R., Castellani, S. et al. (2010). Markers of systemic inflammation in periodontal patients: chronic versus aggressive periodontitis. An explorative cross-sectional study. *European Journal of Oral Implantology*, 3 (2), 147-153.
- Carman, C. V. & Springer, T. A. (2003). Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Current Opinion in Cell Biology*, 15 (5), 547-556.
- Casarin, R. C. V., Ribeiro, E. D. P., Mariano, F. S., Nociti, F. H., Casati, M. Z. & Gonçalves, R. B. (2010). Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 45 (5), 635-642.
- Chen, J., Bruns, A. H., Donnelly, H. K. & Wunderink, R. G. (2010). Comparative in vitro stimulation with lipopolysaccharide to study TNFalpha gene expression in fresh whole blood, fresh and frozen peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Immunological Methods*, 357 (1-2), 33-37.
- Chi, A. C., Neville, B. W., Krayner, J. W. & Gonsalves, W. C. (2010). Oral manifestations of systemic disease. *American Family Physician*, 82 (11), 1381-1388.
- Choi, E.-K., Park, S.-A., Oh, W.-M., Kang, H.-C., Kuramitsu, H. K., Kim, B.-G. et al. (2005). Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in endothelial cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 44 (1), 51-58.
- Cole, M. F., Fitzsimmons, S. P., Sheridan, M. J. & Xu, Y. (1995). Humoral immunity to commensal oral bacteria: quantitation, specificity and avidity of serum IgG and IgM antibodies reactive with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in children. *Microbiology and Immunology*, 39 (8), 591-598.
- Colombo, F., Cattaneo, A., Lopa, R., Portararo, P., Rebullà, P. & Porretti, L. (2008). Evaluation of a multicolor, single-tube technique to enumerate lymphocyte subpopulations. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*, 15 (7), 1124-1127.
- Corbet, E. F. & Leung, W. K. (2011). Epidemiology of periodontitis in the Asia and Oceania regions. *Periodontology 2000*, 56 (1), 25-64.
- Currier, J. R., Kuta, E. G., Turk, E., Earhart, L. B., Loomis-Price, L., Janetzki, S. et al. (2002). A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays. *Journal of Immunological Methods*, 260 (1-2), 157-172.
- Darveau, R. P. (2009). The oral microbial consortium's interaction with the periodontal innate defense system. *DNA and Cell Biology*, 28 (8), 389-395.

- Darveau, R. P., Pham, T.-T. T., Lemley, K., Reife, R. A., Bainbridge, B. W., Coats, S. R. et al. (2004). Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infection and Immunity*, 72 (9), 5041-5051.
- Darveau, R. P., Tanner, A. & Page, R. C. (1997). The microbial challenge in periodontitis. *Periodontology 2000*, 14, 12-32.
- Deas, D. E., Mackey, S. A. & McDonnell, H. T. (2003). Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction. *Periodontology 2000*, 32, 82-104.
- Demmer, R. T. & Papapanou, P. N. (2010). Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, 53, 28-44.
- D'Ercole, S., Catamo, G. & Piccolomini, R. (2008). Diagnosis in periodontology: a further aid through microbiological tests. *Critical Reviews in Microbiology*, 34 (1), 33-41.
- Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C. R., Yu, W.-H. et al. (2010). The Human Oral Microbiome. *Journal of Bacteriology*, 192 (19), 5002-5017.
- Dias, I. H., Matthews, J. B., Chapple, I. L., Wright, H. J., Dunston, C. R. & Griffiths, H. R. (2011). Activation of the neutrophil respiratory burst by plasma from periodontitis patients is mediated by pro-inflammatory cytokines. *Journal of Clinical Periodontology*, 38 (1), 1-7.
- Dinarello, C. A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87 (6), 2095-2147.
- Dinarello, C. A. (2005). *Blocking IL-1 in systemic inflammation*. 9. Zugriff am 05.11.2011. Verfügbar unter <http://jem.rupress.org/content/201/9/1355.full.pdf#page=1&view=FitH>.
- Dutzan, N., Gamonal, J., Silva, A., Sanz, M. & Vernal, R. (2009). Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, interleukin (IL) -17, IL-10 and transforming growth factor-beta during the progression of chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 36 (5), 396-403.
- Ebersole, J. L. & Taubman, M. A. (1994). The protective nature of host responses in periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 5, 112-141.
- Emingil, G., Atilla, G. & Hüseyinov, A. (2004). Gingival crevicular fluid monocyte chemoattractant protein-1 and RANTES levels in patients with generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 31 (10), 829-834.
- Emingil, G., Atilla, G., Başkesen, A. & Berdeli, A. (2005). Gingival crevicular fluid EMAP-II, MIP-1alpha and MIP-1beta levels of patients with periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 32 (8), 880-885.
- Engelhardt, B. & Wolburg, H. (2004). Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *European Journal of Immunology*, 34 (11), 2955-2963.
- Ernst, C. W. O., Lee, J. E., Nakanishi, T., Karimbux, N. Y., Rezende, T. M. B., Stashenko, P. et al. (2007). Diminished forkhead box P3/CD25 double-positive T regulatory cells are associated with the increased nuclear factor-kappaB lig-

- and (RANKL+) T cells in bone resorption lesion of periodontal disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 148 (2), 271-280.
- Faveri, M., Mayer, M. P. A., Feres, M., Figueiredo, L. C. de, Dewhirst, F. E. & Paster, B. J. (2008). Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiology and Immunology*, 23 (2), 112-118.
- Ford, P. J., Gamonal, J. & Seymour, G. J. (2010). Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, 53, 111-123.
- Gaffen, S. L. & Hajishengallis, G. (2008). A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *Journal of Dental Research*, 87 (9), 817-828.
- Gainet, J., Dang, P. M., Chollet-Martin, S., Brion, M., Sixou, M., Hakim, J. et al. (1999). Neutrophil dysfunctions, IL-8, and soluble L-selectin plasma levels in rapidly progressive versus adult and localized juvenile periodontitis: variations according to disease severity and microbial flora. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163 (9), 5013-5019.
- Gajardo, M., Silva, N., Gómez, L., León, R., Parra, B., Contreras, A. et al. (2005). Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *Journal of Periodontology*, 76 (2), 289-294.
- Gamonal, J., Acevedo, A., Bascones, A., Jorge, O. & Silva, A. (2001). Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 36 (3), 194-203.
- Garlet, G. P. (2010). Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of Dental Research*, 89 (12), 1349-1363.
- Garlet, G. P., Martins, W., Ferreira, B. R., Milanezi, C. M. & Silva, J. S. (2003). Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, 38 (2), 210-217.
- Gemmell, E. & Seymour, G. J. (2004). Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontology 2000*, 35, 21-41.
- Gemmell, E., Carter, C. L., Hart, D. N. J., Drysdale, K. E. & Seymour, G. J. (2002). Antigen-presenting cells in human periodontal disease tissues. *Oral Microbiology and Immunology*, 17 (6), 388-393.
- Gemmell, E., Yamazaki, K. & Seymour, G. J. (2002). Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, 13 (1), 17-34. Verfügbar unter <http://cro.sagepub.com/content/13/1/17.full.pdf>.
- Gemmell, E., Yamazaki, K. & Seymour, G. J. (2007). The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontology 2000*, 43, 14-40.
- Genco, R. J., Zambon, J. J. & Murray, P. A. (1985). Serum and gingival fluid antibodies as adjuncts in the diagnosis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

- associated periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 56 (11 Suppl), 41-50.
- Gjerme, P. E. & Grytten, J. (2009). Cost-effectiveness of various treatment modalities for adult chronic periodontitis. *Periodontology 2000*, 51, 269-275.
- Goncalves, T. O., Costa, D., Brodskyn, C. I., Duarte, P. M., Cesar, N. J. B. & Nogueira-Filho, G. (2010). Release of cytokines by stimulated peripheral blood mononuclear cells in chronic periodontitis. *Archives of Oral Biology*, 55 (12), 975-980.
- Gonzales, J. R., Mann, M., Stelzig, J., Bödeker, R. H. & Meyle, J. (2007). Single-nucleotide polymorphisms in the IL-4 and IL-13 promoter region in aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 34 (6), 473-479.
- Gu, L., Tseng, S., Horner, R. M., Tam, C., Loda, M. & Rollins, B. J. (2000). Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature*, 404 (6776), 407-411.
- Guentsch, A., Puklo, M., Preshaw, P. M., Glockmann, E., Pfister, W., Potempa, J. et al. (2009). Neutrophils in chronic and aggressive periodontitis in interaction with *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of Periodontal Research*, 44 (3), 368-377.
- Guo, Y., Nguyen, K.-A. & Potempa, J. (2010). Dichotomy of gingipains action as virulence factors: from cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins. *Periodontology 2000*, 54 (1), 15-44.
- Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 5, 78-111.
- Hajishengallis, G. (2010). Complement and periodontitis. *Biochemical Pharmacology*, 80 (12), 1992-2001.
- Haubek, D. (2010). The highly leukotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: evolutionary aspects, epidemiology and etiological role in aggressive periodontitis. *APMIS. Supplementum* (130), 1-53.
- Haubek, D., Ennibi, O.-K., Poulsen, K., Vaeth, M., Poulsen, S. & Kilian, M. (2008). Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet*, 371 (9608), 237-242.
- Henderson, B., Nair, S. P., Ward, J. M. & Wilson, M. (2003). Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Annual Review of Microbiology*, 57, 29-55.
- Hendler, A., Mulli, T. K., Hughes, F. J., Perrett, D., Bombardieri, M., Houry-Haddad, Y. et al. (2010). Involvement of autoimmunity in the pathogenesis of aggressive periodontitis. *Journal of Dental Research*, 89 (12), 1389-1394.
- Herrmann, J. M., Kantarci, A., Long, H., Bernardo, J., Hasturk, H., Wray, L. V. et al. (2005). Simultaneous measurements of cytoplasmic Ca²⁺ responses and intracellular pH in neutrophils of localized aggressive periodontitis (LAP) patients. *Journal of Leukocyte Biology*, 78 (3), 612-619.
- Holt, S. C. & Ebersole, J. L. (2005). *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology 2000*, 38, 72-122.

- Holtfreter, B., Schwahn, C., Biffar, R. & Kocher, T. (2009). Epidemiology of periodontal diseases in the Study of Health in Pomerania. *Journal of Clinical Periodontology*, 36 (2), 114-123.
- Howells, G. L. (1995). Cytokine networks in destructive periodontal disease. *Oral Diseases*, 1 (4), 266-270.
- Imai, K. & Ochiai, K. (2011). Role of histone modification on transcriptional regulation and HIV-1 gene expression: possible mechanisms of periodontal diseases in AIDS progression. *Journal of Oral Science*, 53 (1), 1-13.
- Ito, H., Honda, T., Domon, H., Oda, T., Okui, T., Amanuma, R. et al. (2005). Gene expression analysis of the CD4+ T-cell clones derived from gingival tissues of periodontitis patients. *Oral Microbiology and Immunology*, 20 (6), 382-386.
- Jentsch, H., Cachovan, G., Guentsch, A., Eickholz, P., Pfister, W. & Eick, S. (2012). Characterization of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains in periodontitis patients in Germany. *Clinical Oral Investigations*.
- Jervøe-Storm, P.-M., Koltzsch, M., Falk, W., Dörfler, A. & Jepsen, S. (2005). Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Periodontology*, 32 (7), 778-783.
- Johnstone, A. M., Koh, A., Goldberg, M. B. & Glogauer, M. (2007). A hyperactive neutrophil phenotype in patients with refractory periodontitis. *Journal of Periodontology*, 78 (9), 1788-1794.
- Jotwani, R. & Cutler, C. W. (2003). Multiple dendritic cell (DC) subpopulations in human gingiva and association of mature DCs with CD4+ T-cells in situ. *Journal of Dental Research*, 82 (9), 736-741.
- Jotwani, R., Palucka, A. K., Al-Quotub, M., Nouri-Shirazi, M., Kim, J., Bell, D. et al. (2001). Mature dendritic cells infiltrate the T cell-rich region of oral mucosa in chronic periodontitis: in situ, in vivo, and in vitro studies. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167 (8), 4693-4700.
- Kalyuzhny, A. E. (2005). *Handbook of ELISPOT: Methods and protocols*. Totowa, N.J: Humana Press. Verfügbar unter <http://www.worldcat.org/oclc/56013074>.
- Kalyuzhny, A. E. (2009). ELISPOT assay on membrane microplates. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 536, 355-365.
- Kang, J.-G., Kim, S. H. & Ahn, T.-Y. (2006). Bacterial diversity in the human saliva from different ages. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 44 (5), 572-576.
- Kawai, T. & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 11 (5), 373-384.
- Kenneth Murphy. (2012). *Janeway's Immunobiology* (8. Aufl., 1 Band). New York: Garland Science.
- Kenneth S. Kornmann, R. C. P. M. T. (1997). The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology 2000*, 1997 (14), 33-53.
- Kida, Y., Kobayashi, M., Suzuki, T., Takeshita, A., Okamoto, Y., Hanazawa, S. et al. (2005). Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF-kappaB in human gingival fibroblasts. *Cytokine*, 29 (4), 159-168.

- Kikuchi, T., Willis, D. L., Liu, M., Purkall, D. B., Sukumar, S., Barbour, S. E. et al. (2005). Dendritic-NK cell interactions in *P. gingivalis*-specific responses. *Journal of Dental Research*, *84* (9), 858-862.
- Kilian, M., Frandsen, E. V. G., Haubek, D. & Poulsen, K. (2006). The etiology of periodontal disease revisited by population genetic analysis. *Periodontology* *2000*, *42*, 158-179.
- Kinane, D. F. & Lappin, D. F. (2001). Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta odontologica Scandinavica*, *59* (3), 154-160.
- Kobayashi, R., Kono, T., Bolerjack, B. A., Fukuyama, Y., Gilbert, R. S., Fujihashi, K. et al. (2011). Induction of IL-10-producing CD4+ T-cells in chronic periodontitis. *Journal of Dental Research*, *90* (5), 653-658.
- Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *388* (4), 621-625.
- Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, *30* (1), 16-34.
- Kumar, P. S., Leys, E. J., Bryk, J. M., Martinez, F. J., Moeschberger, M. L. & Griffen, A. L. (2006). Changes in periodontal health status are associated with bacterial community shifts as assessed by quantitative 16S cloning and sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, *44* (10), 3665-3673.
- Lafaurie, G. I., Contreras, A., Barón, A., Botero, J., Mayorga-Fayad, I., Jaramillo, A. et al. (2007). Demographic, clinical, and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. *Journal of Periodontology*, *78* (4), 629-639.
- Lang, N., Bartold, P. M., Cullinan, M., Jeffcoat, M., Mombelli, A., Murakami, S. et al. (1999). Consensus Report: Aggressive Periodontitis. *Annals of Periodontology*, *4* (1), 53.
- Laurence, A. & O'Shea, J. J. (2007). T(H)-17 differentiation: of mice and men. *Nature Immunology*, *8* (9), 903-905.
- Leino, L. & Hurttia, H. (1999). A potential role of an intracellular signaling defect in neutrophil functional abnormalities and promotion of tissue damage in patients with localized juvenile periodontitis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine : CCLM / FESCC*, *37* (3), 215-222.
- Lerner, U. (2006). Inflammation-induced Bone Remodeling in Periodontal Disease and the Influence of Post-menopausal Osteoporosis. *Journal of Dental Research*, *85* (7), 596-607.
- Levin, L., Baev, V., Lev, R., Stabholz, A. & Ashkenazi, M. (2006). Aggressive periodontitis among young Israeli army personnel. *Journal of Periodontology*, *77* (8), 1392-1396.
- Lexberg, M. H., Taubner, A., Förster, A., Albrecht, I., Richter, A., Kamradt, T. et al. (2008). Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo. *European Journal of Immunology*, *38* (10), 2654-2664.
- Li, J., Helmerhorst, E. J., Leone, C. W., Troxler, R. F., Yaskell, T., Haffajee, A. D. et al. (2004). Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *Journal of Applied Microbiology*, *97* (6), 1311-1318.
- Li, Q., Valerio, M. S. & Kirkwood, K. L. (2012). MAPK usage in periodontal disease progression. *Journal of Signal Transduction*, *2012*, 308943.

- Lindhe, J., Ranney, R., Lamster, I., Charles, A., Chung, C.-P., Flemmig, T. et al. (1999). Consensus Report: Chronic Periodontitis. *Annals of Periodontology*, 4 (1), 38.
- López, N. J., Jara, L. & Valenzuela, C. Y. (2005). Association of interleukin-1 polymorphisms with periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 76 (2), 234-243.
- López, R., Dahlén, G., Retamales, C. & Baelum, V. (2011). Clustering of subgingival microbial species in adolescents with periodontitis. *European Journal of Oral Sciences*, 119 (2), 141-150.
- Lu, H., Wang, M., Gunsolley, J. C., Schenkein, H. A. & Tew, J. G. (1994). Serum immunoglobulin G subclass concentrations in periodontally healthy and diseased individuals. *Infection and Immunity*, 62 (5), 1677-1682.
- Marazita, M. L., Burmeister, J. A., Gunsolley, J. C., Koertge, T. E., Lake, K. & Schenkein, H. A. (1994). Evidence for autosomal dominant inheritance and race-specific heterogeneity in early-onset periodontitis. *Journal of Periodontology*, 65 (6), 623-630.
- Marsh, P. D. (2005). Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal of Clinical Periodontology*, 32 Suppl 6, 7-15.
- Matthews, J. B., Wright, H. J., Roberts, A., Cooper, P. R. & Chapple, I. L. C. (2007). Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 147 (2), 255-264.
- Matthews, J. B., Wright, H. J., Roberts, A., Ling-Mountford, N., Cooper, P. R. & Chapple, I. L. C. (2007). Neutrophil hyper-responsiveness in periodontitis. *Journal of Dental Research*, 86 (8), 718-722.
- Mattila, K. J., Pussinen, P. J. & Paju, S. (2005). Dental infections and cardiovascular diseases: a review. *Journal of Periodontology*, 76 (11 Suppl), 2085-2088.
- Mattila, K. M., Rinne, J. O., Lehtimäki, T., Røyttä, M., Ahonen, J. P. & Hurme, M. (2002). Association of an interleukin 1B gene polymorphism (-511) with Parkinson's disease in Finnish patients. *Journal of Medical Genetics*, 39 (6), 400-402.
- Meng, H., Xu, L., Li, Q., Han, J. & Zhao, Y. (2007). Determinants of host susceptibility in aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, 43, 133-159.
- Micheelis, W., Schiffner, U. & Hoffmann, T. (2006). *Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV): Neue Ergebnisse zu oralen Erkrankungsprävalenzen, Risikogruppen und zum zahnärztlichen Versorgungsgrad in Deutschland 2005*. Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV.
- Modlin, R. L. & Nutman, T. B. (1993). Type 2 cytokines and negative immune regulation in human infections. *Current Opinion in Immunology*, 5 (4), 511-517.
- Mombelli, A., Casagni, F. & Madianos, P. N. (2002). Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, 29 Suppl 3, 10-21; discussion 37-8.
- Mooney, J., Hodge, P. J. & Kinane, D. F. (2001). Humoral immune response in early-onset periodontitis: influence of smoking. *Journal of Periodontal Research*, 36 (4), 227-232.
- Moreira, P. R., Sá, A. R. de, Xavier, G. M., Costa, J. E., Gomez, R. S., Gollob, K. J. et al. (2005). A functional interleukin-1 beta gene polymorphism is associated

- with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *Journal of Periodontal Research*, 40 (4), 306-311.
- Murayama, R., Kobayashi, M., Takeshita, A., Yasui, T. & Yamamoto, M. (2011). MAPKs, activator protein-1 and nuclear factor- κ B mediate production of interleukin-1 β -stimulated cytokines, prostaglandin E2 and MMP-1 in human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research*
- Muthukuru, M. & Cutler, C. W. (2006). Upregulation of immunoregulatory Src homology 2 molecule containing inositol phosphatase and mononuclear cell hyporesponsiveness in oral mucosa during chronic periodontitis. *Infection and Immunity*, 74 (2), 1431-1435.
- Muthukuru, M., Jotwani, R. & Cutler, C. W. (2005). Oral mucosal endotoxin tolerance induction in chronic periodontitis. *Infection and Immunity*, 73 (2), 687-694.
- Nakajima, T., Ueki-Maruyama, K., Oda, T., Ohsawa, Y., Ito, H., Seymour, G. J. et al. (2005). Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues. *Journal of Dental Research*, 84 (7), 639-643.
- Nasidze, I., Li, J., Quinque, D., Tang, K. & Stoneking, M. (2009). Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome research*, 19 (4), 636-643.
- Nibali, L., D'Aiuto, F., Ready, D., Parkar, M., Yahaya, R. & Donos, N. (2012). No association between A actinomycetemcomitans or P gingivalis and chronic or aggressive periodontitis diagnosis. *Quintessence International (Berlin, Germany : 1985)*, 43 (3), 247-254.
- Nobbs, A. H., Jenkinson, H. F. & Jakubovics, N. S. (2011). Stick to your gums: mechanisms of oral microbial adherence. *Journal of Dental Research*, 90 (11), 1271-1278.
- Oda, T., Yoshie, H. & Yamazaki, K. (2003). Porphyromonas gingivalis antigen preferentially stimulates T cells to express IL-17 but not receptor activator of NF-kappaB ligand in vitro. *Oral Microbiology and Immunology*, 18 (1), 30-36.
- Ohlrich, E. J., Cullinan, M. P. & Seymour, G. J. (2009). The immunopathogenesis of periodontal disease. *Australian Dental Journal*, 54 Suppl 1, S2-10.
- Oyaizu, K., Kantarci, A., Maeda, H., Batista, E. L., Hasturk, H., Murayama, Y. et al. (2003). Identification of mRNAs for the various diacylglycerol kinase isoforms in neutrophils from patients with localized aggressive periodontitis. *Journal of Periodontal research*, 38 (5), 488-495.
- Page, R. C. & Schroeder, H. E. (1976). Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory Investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology*, 34 (3), 235-249.
- Page, R. C., Sims, T. J., Geissler, F., Altman, L. C. & Baab, D. A. (1985). Defective neutrophil and monocyte motility in patients with early onset periodontitis. *Infection and Immunity*, 47 (1), 169-175.
- Papaiannou, W., Gizani, S., Haffajee, A. D., Quirynen, M., Mamai-Homata, E. & Papagiannoulis, L. (2009). The microbiota on different oral surfaces in healthy children. *Oral Microbiology and Immunology*, 24 (3), 183-189.
- Paster, B. J. & Dewhirst, F. E. (2009). Molecular microbial diagnosis. *Periodontology 2000*, 51, 38-44.

- Pawlik, A., Wrzesniewska, J., Florczak, M., Gawronska-Szklarz, B. & Herczynska, M. (2005). The -590 IL-4 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*, 26 (1), 48-51.
- Persson, G. R. & Persson, R. E. (2008). Cardiovascular disease and periodontitis: an update on the associations and risk. *Journal of Clinical Periodontology*, 35 (8 Suppl), 362-379.
- Picolos, D. K., Lerche-Sehm, J., Abron, A., Fine, J. B. & Papapanou, P. N. (2005). Infection patterns in chronic and aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 32 (10), 1055-1061.
- Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S. & Johnson, N. W. (2005). Periodontal diseases. *Lancet*, 366 (9499), 1809-1820.
- Poltorak, A. (1998). Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science*, 282 (5396), 2085-2088.
- Preshaw, P. M. & Taylor, J. J. (2011). How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *Journal of Clinical Periodontology*, 38 Suppl 11, 60-84.
- Pussinen, P. J., Paju, S., Mäntylä, P. & Sorsa, T. (2007). Serum microbial- and host-derived markers of periodontal diseases: a review. *Current Medicinal Chemistry*, 14 (22), 2402-2412.
- Quappe, L., Jara, L. & López, N. J. (2004). Association of interleukin-1 polymorphisms with aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology*, 75 (11), 1509-1515.
- Randolph, G. J., Angeli, V. & Swartz, M. A. (2005). Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nature Reviews. Immunology*, 5 (8), 617-628.
- Ren, L., Leung, W. K., Darveau, R. P. & Jin, L. (2005). The expression profile of lipopolysaccharide-binding protein, membrane-bound CD14, and toll-like receptors 2 and 4 in chronic periodontitis. *Journal of Periodontology*, 76 (11), 1950-1959.
- Rescala, B., Rosalem, W., Teles, R. P., Fischer, R. G., Haffajee, A. D., Socransky, S. S. et al. (2010). Immunologic and microbiologic profiles of chronic and aggressive periodontitis subjects. *Journal of periodontology*, 81 (9), 1308-1316.
- Riep, B., Edesi-Neuss, L., Claessen, F., Skarabis, H., Ehmke, B., Flemmig, T. F. et al. (2009). Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? *Journal of Clinical Microbiology*, 47 (6), 1705-1711.
- Rosenwasser, L. J. & Borish, L. (1997). Genetics of atopy and asthma: the rationale behind promoter-based candidate gene studies (IL-4 and IL-10). *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 156 (4 Pt 2), S152-5.
- Rossol, M., Heine, H., Meusch, U., Quandt, D., Klein, C., Sweet, M. J. et al. (2011). LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Critical Reviews in Immunology*, 31 (5), 379-446.
- Ryder, M. I. (2010). Comparison of neutrophil functions in aggressive and chronic periodontitis. *Periodontology 2000*, 53, 124-137.
- Sack, U., Tárnok, A. & Rothe, G. (2007). *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendung der Durchflusszytometrie*. Basel: Karger. Verfügbar unter <http://www.worldcat.org/oclc/489080270>.

- Sage, P. T. & Carman, C. V. (2009). Settings and mechanisms for trans-cellular diapedesis. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 14, 5066-5083.
- Sakamoto, M., Umeda, M. & Benno, Y. (2005). Molecular analysis of human oral microbiota. *Journal of Periodontal Research*, 40 (3), 277-285.
- Salvi, G. E., Carollo-Bittel, B. & Lang, N. P. (2008). Effects of diabetes mellitus on periodontal and peri-implant conditions: update on associations and risks. *Journal of Clinical Periodontology*, 35 (8 Suppl), 398-409.
- Savage, A., Eaton, K. A., Moles, D. R. & Needleman, I. (2009). A systematic review of definitions of periodontitis and methods that have been used to identify this disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 36 (6), 458-467.
- Scapoli, C., Trombelli, L., Mamolini, E. & Collins, A. (2005). Linkage disequilibrium analysis of case-control data: an application to generalized aggressive periodontitis. *Genes and Immunity*, 6 (1), 44-52.
- Schall, T. J., Bacon, K., Camp, R. D., Kaspari, J. W. & Goeddel, D. V. (1993). Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 177 (6), 1821-1826.
- Schenkein, H. A., Koertge, T. E., Brooks, C. N., Sabatini, R., Purkall, D. E. & Tew, J. G. (2010). IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *Journal of Dental Research*, 89 (9), 943-947.
- Scheres, N., Laine, M. L., Vries, T. J. de, Everts, V. & van Winkelhoff, A. J. (2010). Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research*, 45 (2), 262-270.
- Schulz, S., Machulla, H. K. G., Altermann, W., Klapproth, J., Zimmermann, U., Gläser, C. et al. (2008). Genetic markers of tumour necrosis factor alpha in aggressive and chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 35 (6), 493-500.
- Séguier, S., Godeau, G. & Brousse, N. (2000). Immunohistological and morphometric analysis of intra-epithelial lymphocytes and Langerhans cells in healthy and diseased human gingival tissues. *Archives of Oral Biology*, 45 (6), 441-452.
- Shaddox, L., Wiedey, J., Bimstein, E., Magnuson, I., Clare-Salzler, M., Aukhil, I. et al. (2010). Hyper-responsive phenotype in localized aggressive periodontitis. *Journal of Dental Research*, 89 (2), 143-148.
- Shibata, K., Warbington, M. L., Gordon, B. J., Kurihara, H. & van Dyke, T. E. (2000). Defective calcium influx factor activity in neutrophils from patients with localized juvenile periodontitis. *Journal of Periodontology*, 71 (5), 797-802.
- Siveke, J. T. & Hamann, A. (1998). T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 160 (2), 550-554.
- Slack, E., Hapfelmeier, S., Stecher, B., Velykoredko, Y., Stoel, M., Lawson, M. A. E. et al. (2009). Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. *Science (New York, N.Y.)*, 325 (5940), 617-620.
- Smedman, C., Gårdlund, B., Nihlmark, K., Gille-Johnson, P., Andersson, J. & Paulie, S. (2009). ELISpot analysis of LPS-stimulated leukocytes: human granulo-

- cytes selectively secrete IL-8, MIP-1beta and TNF-alpha. *Journal of Immunological Methods*, 346 (1-2), 1-8. Verfügbar unter 21345222.
- Smith, M., Seymour, G. J. & Cullinan, M. P. (2010). Histopathological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, 53, 45-54.
- Socransky, S. S. (1979). Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 6 (7), 16-21.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000*, 38, 135-187.
- Sørensen, L. K., Havemose-Poulsen, A., Sønder, S. U., Bendtzen, K. & Holmstrup, P. (2008). Blood cell gene expression profiling in subjects with aggressive periodontitis and chronic arthritis. *Journal of Periodontology*, 79 (3), 477-485.
- Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76 (2), 301-314.
- Steinman, R. M. & Hemmi, H. (2006). Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 311, 17-58.
- Stingu, C. S., Jentsch, H., Eick, S., Schaumann, R., Knofler, G. & Rodloff, A. (2012). Microbial profile of patients with periodontitis compared with healthy subjects. *Quintessence International (Berlin, Germany : 1985)*, 43 (2), e23-31.
- Sugita, N., Iwanaga, R., Kobayashi, T. & Yoshie, H. (2012). Association of the FcγRIIB-nt645+25A/G polymorphism with the expression level of the FcγRIIb receptor, the antibody response to *Porphyromonas gingivalis* and the severity of periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 47 (1), 105-113.
- Suzuki, K., Sakiyama, Y., Usui, M., Obama, T., Kato, R., Itabe, H. et al. (2010). Oxidized low-density lipoprotein increases interleukin-8 production in human gingival epithelial cell line Ca9-22. *Journal of periodontal research*, 45 (4), 488-495.
- Tai, H., Endo, M., Shimada, Y., Gou, E., Orima, K., Kobayashi, T. et al. (2002). Association of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms with early onset periodontitis in Japanese. *Journal of Clinical Periodontology*, 29 (10), 882-888.
- Takahashi, K., Ohyama, H., Kitanaka, M., Sawa, T., Mineshiba, J., Nishimura, F. et al. (2001). Heterogeneity of host immunological risk factors in patients with aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology*, 72 (4), 425-437.
- Tanabe, S.-I. & Grenier, D. (2008). Macrophage tolerance response to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide induces differential regulation of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and matrix metalloproteinase 9 secretion. *Journal of Periodontal Research*, 43 (3), 372-377.
- Tas, M. P. & Murray, J. C. (1996). Endothelial-monocyte-activating polypeptide II. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 28 (8), 837-841.
- Taylor, J. J. (2010). Cytokine regulation of immune responses to *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology 2000*, 54 (1), 160-194.
- Tew, J. G., El Shikh, M. E., El Sayed, R. M. & Schenkein, H. A. (2012). Dendritic cells, antibodies reactive with oxLDL, and inflammation. *Journal of Dental Research*, 91 (1), 8-16.

- Timmerman, M. F. & van der Weijden, G. A. (2006). Risk factors for periodontitis. *International Journal of Dental Hygiene*, 4 (1), 2-7.
- Turvey, S. E. & Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125 (2 Suppl 2), S24-32.
- Urbán, E., Terhes, G., Radnai, M., Gorzó, I. & Nagy, E. (2010). Detection of periodontopathogenic bacteria in pregnant women by traditional anaerobic culture method and by a commercial molecular genetic method. *Anaerobe*, 16 (3), 283-288.
- van der Weijden, F. & Slot, D. E. (2011). Oral hygiene in the prevention of periodontal diseases: the evidence. *Periodontology 2000*, 55 (1), 104-123.
- van Genco R, K. K. W. R. O. S. Z. J. L. M. M. B. P. R. S. H. S. J. S. S. D. T. (1996). Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Annals of Periodontology / The American Academy of Periodontology*, 1 (1), 926-932.
- van Winkelhoff, A. J., Loos, B. G., van der Reijden, W. A. & van der Velden, U. (2002). Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *Journal of Clinical Periodontology*, 29 (11), 1023-1028.
- Warnatz, K. & Schlesier, M. (2008). Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 74 (5), 261-271.
- Warrington, R., Watson, W., Kim, H. L. & Antonetti, F. R. (2011). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, asthma, and clinical immunology : Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 7 Suppl 1, S1.
- Waugh, D. J. J. & Wilson, C. (2008). The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clin Cancer Res*, 14 (21), 6735-6741.
- Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M. & Murphy, K. M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, 24 (6), 677-688.
- Wright, H. J., Matthews, J. B., Chapple, I. L. C., Ling-Mountford, N. & Cooper, P. R. (2008). Periodontitis associates with a type 1 IFN signature in peripheral blood neutrophils. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181 (8), 5775-5784.
- Ximénez-Fyvie, L. A., Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (2000). Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 27 (9), 648-657.
- Yu, J. J. & Gaffen, S. L. (2008). Interleukin-17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity. *Frontiers in Bioscience : a Journal and Virtual Library*, 13, 170-177.
- Yu, X. & Graves, D. T. (1995). Fibroblasts, mononuclear phagocytes, and endothelial cells express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflamed human gingiva. *Journal of Periodontology*, 66 (1), 80-88.
- Zaric, S., Shelburne, C., Darveau, R., Quinn, D. J., Weldon, S., Taggart, C. C. et al. (2010). Impaired immune tolerance to Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide promotes neutrophil migration and decreased apoptosis. *Infection and Immunity*, 78 (10), 4151-4156.

-
- Zhao, C.-J., Xu, C.-R., Zhou, Y.-Z. & Su, X.-P. (2009). [Detection and functional analysis of CD-4+ CD-25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with generalized aggressive periodontitis]. *Zhonghua kou qiang yi xue za zhi = Zhonghua kouqiang yixue zazhi = Chinese Journal of Stomatology*, 44 (7), 413-415.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N. et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116 (16), e74-80.

Anlagenverzeichnis

Anlage I: Grafische Darstellung der Ergebnisse des CVID-Panels.....	101
Anlage II: Grafische Darstellung der Spotbildung ohne Stimulation	102
Anlage III: Tabelle Quantitative Keimbestimmung	103
Anlage IV: Fragebogen.....	105
Anlage V: Votum der Ethikkommission.....	106
Anlage VI: Einwilligungserklärung	108
Anlage VII: Datenschutzerklärung	109

Anlagen

I. Ergebnisse des CVID-Panels

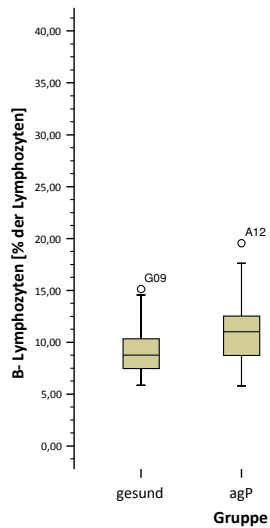


Abbildung A 1: Anteil der B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der Lymphozyten

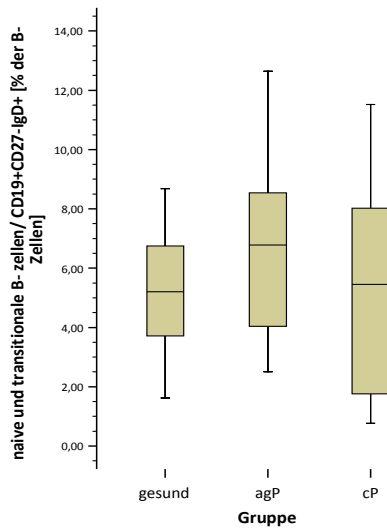


Abbildung A 2: Anteil naiver und transistionaler B-Zellen an der Gesamtmenge der B-Lymphozyten

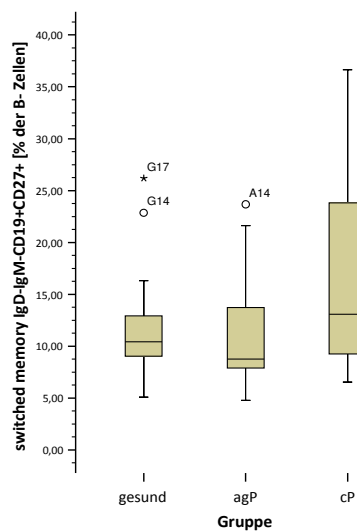


Abbildung A 3: Anteil der „switched memory B-Zellen“ (IgD-IgM-CD19+CD27+) an den B-Lymphozyten

II. Spotbildung ohne Stimulation

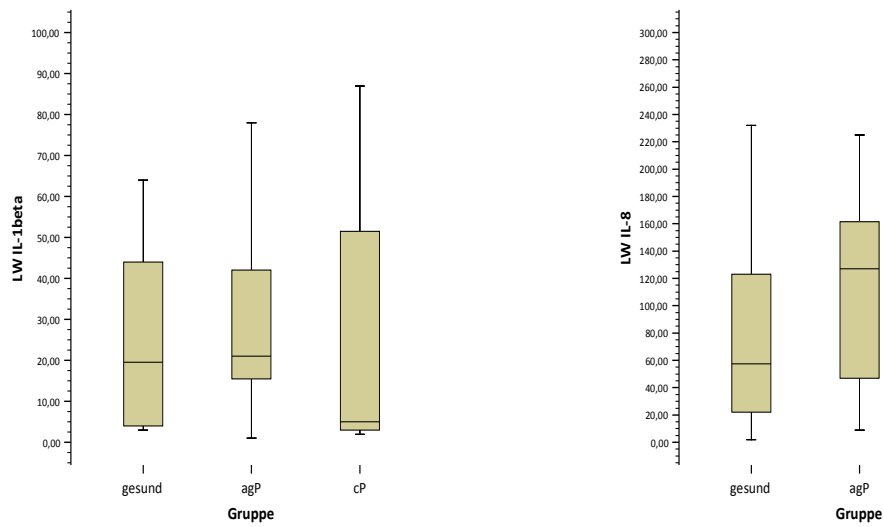


Abbildung A 4 und Abbildung A 5: Darstellung der Anzahl gemessener Spots im ELISpot (repräsentativ für die Anzahl der Zytokin-/Chemokin-produzierenden Zellen) in den verschiedenen Probandengruppen ohne Stimulation mittels Antigen

III. Quantitative Verteilung der Bakterienspezies

Bakterium	Median der Bakterienanzahl [KBE*10 ⁴] {Min – Max [KBE*10 ⁴]}					
	Gesund		agP		cP	
<i>A. israelii</i>	0,00	{0 – 500,00}	0,00	{0 – 25,00}	0,00	{0 – 300,00}
<i>A. meyeri</i>	0,00	{0 – 100,00}	0,00	{0 – 300,00}	0,00	{0 – 26,00}
<i>A. odontolyticus</i>	0,00	{0 – 10,00}	0,00	{0 – 0,20}	0,00	{0 – 0,70}
<i>A. naeslundii</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 0,20}	0,00	{0 – 0,00}
<i>A. viscosus</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 500,00}
<i>A. prevotii</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 10,00}
<i>Bacteroides merdae</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 30,00}	0,00	{0 – 2,00}
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	0,00	{0 – 0,05}	0,00	{0 – 200,00}	0,00	{0 – 2000,00}
<i>Eggerthella lenta</i>	0,00	{0 – 80,00}	0,00	{0 – 3000,00}	0,00	{0 – 5,00}
<i>Veillonella spp</i>	0,00	{0 – 11,00}	7,70	{0 – 3000,00}	0,00	{0 – 100,00}
<i>Capnocytophaga spp</i>	0,00	{0 – 104,00}	0,00	{0 – 20,00}	0,00	{0 – 50,00}
<i>F. nucleatum</i>	0,00	{0 – 7,00}	6,01	{0 – 1000,00}	11,00	{0 – 1000,00}
<i>F. necrophorum</i>	0,00	{0 – 10,00}	0,00	{0 – 10,00}	0,00	{0 – 0,00}
<i>F. necrogenes</i>	0,00	{0 – 8,00}	0,00	{0 – 580,00}	0,00	{0 – 20,00}
<i>F. varium</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 100,00}	0,00	{0 – 20,00}
<i>Eubacterium brachy</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 200,00}
<i>Eubacterium limosum</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 200,00}	0,00	{0 – 0,00}
<i>Eubacterium yurii</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 5,00}	0,00	{0 – 0,00}
<i>P. intermedia</i>	0,00	{0 – 60,00}	100,00	{0 – 4000,00}	17,00	{0 – 2000,00}
<i>P. loeschii</i>	0,00	{0 – 153,00}	0,00	{0 – 300,00}	0,00	{0 – 100,00}
<i>P. buccae</i>	0,00	{0 – 120,00}	0,00	{0 – 100,00}	2,00	{0 – 2000,00}
<i>P. bivia</i>	0,00	{0 – 30,00}	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 0,00}
<i>P. oralis</i>	0,00	{0 – 30,00}	1,40	{0 – 1000,00}	1,00	{0 – 200,00}
<i>P. melaninogenica</i>	0,00	{0 – 0,10}	0,00	{0 – 50,00}	0,00	{0 – 0,00}
<i>P. denticola</i>	0,00	{0 – 0,00}	2,00	{0 – 610,00}	0,00	{0 – 30,00}
<i>P. disiens</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 40,00}
<i>P. buccalis</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 10,00}	0,00	{0 – 2,00}
<i>P. tanneriae</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 30,00}
<i>P. nigrescens</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 0,00}
<i>Gemella morbillorum</i>	0,00	{0 – 20,00}	0,00	{0 – 100,00}	0,00	{0 – 100,00}
<i>Micromonas micros</i>	0,00	{0 – 00,00}	0,00	{0 – 200,00}	0,00	{0 – 3000,00}
<i>Propionib. acnes</i>	0,00	{0 – 1,00}	0,00	{0 – 70,00}	0,00	{0 – 100,00}
<i>Propionib. propionicus</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 10,00}	0,00	{0 – 0,00}
<i>Anaerococcus prevotii</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 100,00}	0,00	{0 – 0,00}
<i>Peptostr. anaerobicus</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 100,00}	0,00	{0 – 100,00}
<i>Campylobacter rectus</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 400,00}	0,00	{0 – 0,00}
<i>Fingoldia magna</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 200,00}
<i>Selenomonas spp</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 80,00}	0,00	{0 – 200,00}
<i>Porph. gingivalis</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 200,00}
<i>Porph. asaccharolytica</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 40,00}
<i>Porph. endodontalis</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 1000,00}
<i>Cl. tyrobutyricum</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 10,00}

<i>Cl. fallax</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 1,00}
<i>Cl. bifermentans</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 40,00}	0,00	{0 – 0,00}
<i>Cl. histolyticum</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 200,00}	0,00	{0 – 0,00}
<i>Cl. sordellii</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 2000,00}
<i>Cl sporogenes</i>	0,00	{0 – 0,10}	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 15,00}
<i>Cl. beijerickii/butyricum</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 100,00}	0,00	{0 – 1000,00}
<i>Cl. innocuum</i>	0,00	{0 – 0,01}	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 3000,00}
<i>Cl. clostridioforme</i>	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 0,00}	0,00	{0 – 10,00}

Quantitative Menge der isolierten anaeroben Bakterienspezies bei den verschiedenen Probanden- und Patientengruppen im Median sowie Minimum und Maximum der nachgewiesenen Bakterienanzahl

agP: an aggressiver Parodontitis erkrankte Patienten; cP: an moderater chronischer Parodontitis erkrankte Patienten; KBE: Kolonie-bildende Einheiten; Min: Minimum; Max: Maximum; A.: Actinomyces; F.: Fusobacterium; Cl.: Clostridium; Porph.: Porphyromonas; P.: Prevotella; spp: species pluralis; Propionib.: Propionibacterium; Peptostr.: Peptostreptococcus

IV. Fragebogen

**Fragebogen zur Studie
„Immunregulation bei aggressiver Parodontitis“**

Die Beantwortung der folgenden Fragen unterstützt die Interpretation der Forschungsergebnisse der Studie.

Name:	Probennummer:	Alter:	Beruf:
1. a. Sind in Ihrer Familie schwere Erkrankungen vorgekommen? Welche?			<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein
1. b. Haben oder hatten Sie schwere Erkrankungen? Welche?			<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein
2. Sind Sie zurzeit in ärztlicher Behandlung? Warum?			<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein
3. Nehmen Sie in den letzte 6 Monaten Medikamente ein? Welche?			<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein
4. Sind Sie zuckerkrank (Diabetiker?)			<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein
5. Haben Sie Herz- oder Kreislaufbeschwerden?			<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein
6. Haben oder hatten Sie Gelbsucht?			<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein
7. Haben Sie Erkrankungen des Immunsystems? Welche?			<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein
8. Haben Sie Allergien? Welche?			<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein
9. Wie schätzen Sie selbst Ihre Zahn- und Mundpflege ein? <input type="radio"/> sehr gut <input type="radio"/> gut <input type="radio"/> befriedigend <input type="radio"/> ausreichend <input type="radio"/> mangelhaft <input type="radio"/> ungenügend			
10. Benutzen Sie außer der Zahnbürste Hilfsmittel zur Zahn- und Mund- pflege? Welche?			<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein
11. Haben Sie Blutgerinnungsstörung?			<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein
12. Wie oft gehen Sie zu Ihrem Zahnarzt zur vorsorglichen Untersuchung? <input type="radio"/> 1x jährlich <input type="radio"/> 2x jährlich <input type="radio"/> öfter			
13. Sind Sie schwanger oder stillen Sie?			<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein
14. Rauchen Sie zurzeit oder haben Sie einmal regelmäßig geraucht? aktuelle Raucher: Wie viele Zigaretten täglich? Ehemalige Raucher: Wann haben Sie aufgehört zu rauchen?			<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein
15. Nehmen Sie die Antibabypille?			<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein
16. Ist bei einem Ihrer direkten Verwandten Zahnverlust aufgrund von Zahnlockerung (Parodontitisgründen) bekannt?			<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nein

Datum

Unterschrift

V. Votum der Ethikkommission

UNIVERSITÄT LEIPZIG

Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Vorsitzender: Professor Dr. R. Preiß

Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig
 ☐ Institut für Klinische Pharmakologie, Härtelstraße 16-18, 04107 Leipzig

Vorsitzender:
 Prof. Dr. R. Preiß
 Institut für Klinische
 Pharmakologie

Mitglieder:
 Prof. Dr. Dr. Bernhard Frerich
 Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
 Kieferchirurgische Poliklinik

em. Prof. Dr. Derk Olthoff
 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie

Prof. Dr. Martin Petzoldt
 Institut für Systematische Theologie

Prof. Dr. Dr. Ortrun Riha
 Karl-Sudhoff-Institut für Geschichte der Medizin und der Naturwissenschaften

em. Prof. Dr. Peter Schneider
 Herzzentrum Leipzig GmbH
 Universitätsklinik für Kinderkardiologie

Prof. Arnd Schultheiß
 Maler und Graphiker/Kultursenator

Prof. Dr. V. Schuster
 Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche

Tzscharschuch, Doreen
 Justiziarat

Immunregulation bei aggressiver Parodontitis

- Prof. Dr. med. U. Sack – Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Bereich immunologische Diagnostik, Universität Leipzig

Unsere Bearbeitungs-Nr. 151-2009-06072009 (Bitte stets angeben!)

Die genannte Studie wurde von der Ethik-Kommission an der Universität Leipzig unter ethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und juristischen Gesichtspunkten geprüft.

Das Gutachten kann die uneingeschränkte Zustimmung, die Darlegung von Empfehlungen und Forderungen oder die Ablehnung der Studie in der vorliegenden Fassung beinhalten (siehe Seite 2). Eine Empfehlung soll auf die moralische Verantwortung hinweisen und in Freiheit und Verantwortung zur Änderung bzw. Erweiterung des Versuchsplanes anregen. Eine zur Forderung erhobene Stellungnahme der Kommission hat zur Folge, dass die Zustimmung der Kommission für die Durchführung der vorgelegten Studien an die Erfüllung dieser Forderung(en) durch den verantwortlichen Studienleiter gebunden ist.

Die Ethik-Kommission bestätigt, dass ihre Zusammensetzung und Arbeitsweise den gesetzlichen Vorschriften bzw. relevanten ICH-GCP-Empfehlungen zur Nutzen-Risiko-Abwägung von wissenschaftlichen Untersuchungen am Menschen entspricht.

UNIVERSITÄT LEIPZIG**Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig**

Vorsitzender: Professor Dr. R. Preiß

Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig
☑ Institut für Klinische Pharmakologie, Härtelstraße 16-18, 04107 Leipzig

Immunregulation bei aggressiver Parodontitis


➤ Prof. Dr. med. U. Sack – Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Bereich immunologische Diagnostik, Universität Leipzig

Unsere Bearbeitungs-Nr. 151-2009-06072009 (Bitte stets angeben!)

Die Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig erhebt keine ethischen und wissenschaftlichen Bedenken gegen das vorgelegte Studiendesign, sofern nachfolgende Forderung berücksichtigt wird:

- ♦ Zur röntgenologischen Auswertung soll ein OPG durchgeführt werden, sofern kein aktuelles Bild vorliegt (Kap. 5.2.). Keine Einwände erhebt die Kommission für PA-Patienten, da für diese eine Indikation vorliegt. Für die Einbeziehung gesunder Probanden fordert die Kommission, nur solche Probanden einzubeziehen, bei denen aus anderen Indikationen heraus bereits ein OPG vorliegt.

Leipzig, 20. Juli 2009


Professor Dr. R. Preiß
Vorsitzender der Ethik-Kommission
an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Bei Vorlage von überarbeiteten Unterlagen sind sämtliche Änderungen unter Angabe der Bearbeitungs-Nr. deutlich kenntlich zu machen. Andernfalls erfolgt keine Bearbeitung durch die Ethik-Kommission.

VI. Einwilligungserklärung

Titel der Studie: Immunregulation bei aggressiver Parodontitis

Patient/in Nr.: ||

Kooperationspartner für Laboranalysen: Prof. Dr. U. Sack, Universität Leipzig, Institut für
Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient!

In diesem wissenschaftlichen Vorhaben soll die Immunregulation bei Patienten mit aggressiver Parodontitis untersucht werden. Wir möchten Sie bitten, diese Forschung durch die Entnahme von 20 ml Ihres Blutes und eine klinische Untersuchung zu unterstützen. Im Labor werden dann verschiedene Untersuchungen an den Blutproben vorgenommen. Bei einer davon, werden aus den Blutproben Zellen des Immunsystems isoliert und es wird gemessen, wie viele Zellen und in welchem Maße diese auf die Stimulation mit Infektionserregern reagieren. Dieser so genannte ELISpot-Test ermöglicht uns damit, Aussagen über die Funktion Ihres Immunsystems zu treffen und dies in Zusammenhang mit den bei Ihnen ermittelten klinischen Werten bezüglich des Entzündungsstatus, Ihren Zahnhalteapparat betreffend, zu bringen. Eine andere Analyse erlaubt Aussagen über eventuell vorhandene genetische Besonderheiten, die Auswirkungen auf den Schweregrad der Erkrankung haben. Die im Blut erhobenen Messwerte müssen in Beziehung zu Ihren klinisch-diagnostischen Untersuchungsergebnissen gesetzt werden, die bei der zahnärztlichen Untersuchung erhoben wurden, weswegen wir Sie auch um Genehmigung zur Verwendung dieser medizinischen Daten bitten wollen.

Alle auf Ihre Person bezogenen identifizierten und medizinischen Daten unterliegen sowohl der ärztlichen Schweigepflicht, als auch den Bestimmungen des Bundesdatenschutzgesetzes. Nach Abschluss der Laboruntersuchungen werden die Proben vernichtet. Mit Ihrer Unterschrift erklären Sie,

- a) dass Sie bereit sind, sich der klinischen Untersuchung an der Poliklinik für Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie zu unterziehen, dass
- b) Sie Gelegenheit hatten, alle die Sie interessierenden Fragen umfassend und abschließend zu besprechen, dass
- c) Sie die Patienteninformation gelesen haben, dass
- d) Sie damit einverstanden sind, dass die im Rahmen der wissenschaftlichen Untersuchung über Sie erhobenen Krankheitsdaten und sonstigen mit dieser Untersuchung zusammenhängenden personenbezogenen Daten verschlüsselt aufgezeichnet werden. Es wird gewährleistet, dass Ihre personenbezogenen Daten nicht an Dritte weitergegeben werden. Bei der Veröffentlichung (wissenschaftliche Zeitung, Kongresspräsentationen) wird aus den Daten nicht hervorgehen, wer an dieser Untersuchung teilgenommen hat. Ihre persönlichen Daten unterliegen dem Datenschutzgesetz und werden nur verschlüsselt erfasst.

Sie wissen, dass Sie nicht in die Studie eingeschlossen werden können, wenn Sie einem dieser Punkte nicht zustimmen (§7 Abs. 2. Nr. 35 GCP-V). Eine Ablehnung, die ohne eine Begründung erfolgen kann, hat keinerlei Auswirkungen auf Ihre medizinische Betreuung.

VII. Datenschutzerklärung

Titel der Studie: Immunregulation bei aggressiver Parodontitis

Mir ist bekannt, dass bei dieser Studie personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde, über mich erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Angaben über meine Gesundheit erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor der Teilnahme an der klinischen Prüfung folgende freiwillig abgegebene Einwilligungserklärung voraus, d.h. ohne die nachfolgende Einwilligung kann ich nicht an der klinischen Prüfung teilnehmen.

Einwilligungserklärung zum Datenschutz (Arzneimittelgesetz)

1. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser klinischen Studie erhobene Daten, insbesondere Angaben über meine Mundgesundheit, in Papierform und auf elektronischen Datenträgern in der Poliklinik für Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie des Universitätsklinikums Leipzig, während der ambulanten Untersuchung aufgezeichnet werden. Soweit erforderlich, dürfen die erhobenen Daten verschlüsselt weitergegeben werden:
 - an das Max- Bürger- Forschungszentrum des Universitätsklinikums Leipzig.
 - Im Falle eines Antrags auf Medikamentenzulassung (entfällt, da keine Medikamentenstudie): an den Sponsor und die für die Zulassung zuständige Behörde (z.B. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte).
2. Außerdem erkläre ich mich damit einverstanden, dass autorisierte und zur Verschwiegenheit verpflichtete Beauftragte der genannten Institutionen sowie die zuständigen inländischen und ausländischen Überwachungsbehörden in meine personenbezogenen Daten, insbesondere meine Mundgesundheitsdaten, Einsicht nehmen, soweit dies für die Überprüfung der ordnungsgemäßen Durchführung der Studie notwendig ist. Für diese Maßnahme entbinde ich den/ die Untersucher/in der Studie von der ärztlichen Schweigepflicht.
3. Die Einwilligung zur Erhebung und Verarbeitung meiner personenbezogenen Daten, insbesondere der Angaben über meine Gesundheit, ist unwiderruflich. Ich bin bereits darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit die Teilnahme an der klinischen Prüfung beenden kann. Im Fall eines solchen Widerrufs meiner Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, erkläre ich mich damit einverstanden, dass die bis zu diesem Zeitpunkt gespeicherten Daten ohne Namensnennung weiterhin verwendet werden dürfen, soweit dies erforderlich ist, um
 - Wirkungen des zu prüfenden Arzneimittels festzustellen (entfällt, da keine Medikamentenstudie),
 - sicherzustellen, dass meine schutzwürdigen Interessen nicht beeinträchtigt werden, und
 - der Pflicht zur Vorlage vollständiger Zulassungsunterlagen zu genügen.
4. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Daten nach Beendigung oder Abbruch der Prüfung mindestens zehn Jahre aufbewahrt werden, wie es die Vorschriften über die klinische Prüfung von Arzneimitteln bestimmen. Danach werden meine personenbezogenen Daten gelöscht, soweit nicht gesetzliche, satzungsmäßige oder vertragliche Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.
5. Ich bin über folgende gesetzliche Regelung informiert: Falls ich meine Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, widerrufe, müssen alle Stellen, die meine personenbezogenen Daten, insbesondere Gesundheitsdaten gespeichert haben, unverzüglich prüfen, inwieweit die gespeicherten Daten für die in Nr. 3 genannten Zwecke noch erforderlich sind. Nicht mehr benötigte Daten werden unverzüglich gelöscht.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

_____, Leipzig, den 13. Juni 2012

Jana Schmidt

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Anschrift: Hohe Straße 32
 04107 Leipzig, Deutschland
 Tel: 0177/7121866
 E-Mail: jana.schmidt@medizin.uni-leipzig.de
 Geburtsdatum: 26.09.1985
 Geburtsort: Magdeburg, Deutschland

Ausbildung/Beruflicher Werdegang:

2011 – 2012	seit 09/2011	Assistenz Zahnärztin in der Klinik für Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie des Universitätsklinikums Leipzig
2011	03/11 – 09/11	Assistenz Zahnärztin in zahnärztlicher Praxis in Magdeburg
2010/2011	11/10 – 01/11	zahnärztliche Famulatur auf Rarotonga (Cook Islands)
2005 – 2010	Studium der Zahnmedizin an der Universität Leipzig	
	10/2010	Staatsexamen Zahnmedizin (Gesamtnote: „sehr gut“)
	12/09 – 11/10	Nebentätigkeit als studentische Hilfskraft im kieferchirurgischen Notdienst des Universitätsklinikums Leipzig
	seit 03/09	Mitarbeit an einer Studie über „Immunregulation bei Aggressiver Parodontitis“ im Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Leipzig
	08/08 - 09/08	Famulatur in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Otto- von Guericke-Universität Magdeburg
	2008	zahnärztliche Vorprüfung (Gesamtnote „sehr gut“)
1997 – 2005	Werner-von-Siemens-Gymnasium (Magdeburg)	
	07/05	Abitur

Danksagung

Ich bedanke mich für eine hervorragende Betreuung dieser Arbeit bei Herrn Professor Dr. Ulrich Sack und Herrn Professor Dr. Dr. Holger Jentsch.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Heike Knaack, Frau Katrin Bauer und Frau Dr. Franka Kahlenberg aus dem Team im Labor der Klinischen Immunologie und Transfusionsmedizin, die mich tatkräftig und sehr geduldig unterstützten.

Für die gute Zusammenarbeit danke ich Frau Dr. Stingu und den medizinisch-technischen Assistentinnen im Labor der medizinischen Mikrobiologie und Infektions-epidemiologie, insbesondere Frau Poeschel und Frau Henning-Rolle.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Peter Ahnert, Herrn Dr. Stephan Borte, Frau Dr. Manja Kamprath und Frau Dr. Purschwitz für die Unterstützung in der Planungsphase der Studie bedanken.

Allen Studienteilnehmern danke ich sehr herzlich für ihre Mithilfe, ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die aufbauenden und motivierenden Worte sowie das mir entgegengebrachte Verständnis.