

Neue Forschungsergebnisse und wissenschaftliche Nachwuchsförderung – 5. Workshop der Klinischen Forschergruppe 208 »Ursachen und Folgen von Parodontopathien«*

KLINISCHE FORSCHERGRUPPE 208, BONN

Mit dem 5. Workshop der Klinischen Forschergruppe 208 »Ursachen und Folgen von Parodontopathien« am 12. Juli im Gustav-Stresemann-Institut in Bonn hatten der Leiter (Prof. Dr. James Deschner) sowie die beiden Sprecher (Prof. Dr. Dr. Søren Jepsen und Prof. Dr. Andreas Jäger) sowohl die Präsentation neuer Forschungsergebnisse als auch die wissenschaftliche Nachwuchsförderung im Fokus.

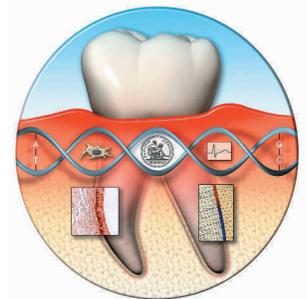


■ (von links nach rechts) Prof. Dr. James Deschner, Dr. Marjan Nokhbehsaim, Dr. Andressa Nogueira, ZÄ Anna Damanaki, Prof. Dr. Christoph Bourauel, Dr. Michael Wolf, ZA Tobias Waller, Dr. Lina Gözl, Cmd Peter Pütz, Dr. Svenja Memmert, Prof. Dr. Andreas Jäger, ZA Philipp Skora, Dr. Marco Favino, PD Dr. Henrik Dommisch, Prof. Dr. Dr. Søren Jepsen
Foto: ZÄ Anna Damanaki, Bonn

onkogens hBD₃ in oralen Plattenepithelkarzinomen und verschiedenen Speicheldrüsen-Tumorentitäten beitragen und die gewonnenen Ergebnisse auf die DEFAs und einige Gene der S100-Familie übertragen. Dadurch stärken die bisherigen Forschungsergebnisse und die aktuellen Arbeiten die Hypothese, dass es sich bei diesen Genen um potenzielle Schlüsselgene handelt, die im Rahmen chronisch entzündlicher Prozesse, wie etwa der chronischen Parodontitis, die Tumorentstehung im Kopf-Hals-Bereich begünstigen.

In dem sich anschließenden Übersichtreferat zur osteoimmunregulatorischen Kompetenz von parodontalen (PDL)-Zellen erläuterte **PD Dr. Stefan Lossdörfer** (Teilprojekt 8) aus der Poliklinik für Kieferorthopädie, Universität Bonn, das enge Zusammenspiel von Stromazellen und Immunzellen in der Regulation parodontaler Umbauvorgänge sowie die möglichen Folgen einer fehlgeleiteten beziehungsweise überschießenden zellulären Reaktion. Er zeigte auf, dass PDL-Zellen nicht nur als strukturelle Komponenten des Zahnhalteapparats anzusehen sind, sondern aktiv an der Steuerung der Wirtsantwort beteiligt sind und auch selbst durch immunologische Prozesse beeinflusst werden. Besonderes Forschungsinteresse richtet sich momentan auf das High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1), welches in dualer Funktion zunächst als Alarmin die Wirtsimmunantwort auf mechanische oder entzündliche Reize mit initiiert, aber auch spätere Regenerationsprozesse stimuliert.

Den Auftakt des ganztägigen Workshops bildete der Vortrag von **PD Dr. Dr. Matthias Wenghoefer** (Teilprojekt 10) aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, Universität Bonn, über den Einfluss parodontopathogener Faktoren auf die Entstehung oraler Neoplasien. Als Teile des Immunsystems leisten antimikrobielle Peptide (AMPs) wie die α - und β -Defensine (DEFAs und hBDs) sowie kalziumbindende Proteine der S100-Genfamilie einen wichtigen Beitrag zur lokalen Infektabwehr epithelialer Oberflächen im Bereich des gesamten Körpers. Darüber hinaus zeigt sich mehr und mehr, dass diese Proteine auch im Rahmen der Entstehung und Progression epithelialer Tumoren im Kopf-Hals-Bereich eine entscheidende Rolle einzunehmen scheinen. In den vergangenen Jahren konnte diese Arbeitsgruppe bereits zur Klärung der Funktion des putativen Tumorsuppressorgens hBD-1 und des putativen Proto-



* Erstveröffentlichung in der DZW 39/13 und 40/13.

Dr. Michael Wolf (Teilprojekte 8/9) aus der Poliklinik für Kieferorthopädie, Universität Bonn, belegte diese Ausführungen mit konkreten Untersuchungsergebnissen. Anhand von In-vitro- und In-vivo-Daten demonstrierte er sowohl die basale Expression von HMGB1 in PDL-Zellen als auch dessen mechanisch induzierte Translokation in den Extrazellularraum. In Kokulturversuchen wurde die physiologische Bedeutung von HMGB1 als Kofaktor für die Regulation der Migration und Differenzierung humaner Makrophagen herausgearbeitet. Erste In-vitro-Daten deuten die anabole Kapazität von HMGB1 an, das in Abwesenheit proinflammatorischer Mediatoren offenbar die Migration und osteoblastäre Differenzierung residueller PDL-Zellen zu fördern vermag. In Anlehnung an HMGB1-basierte Therapiekonzepte, die jüngst in anderen medizinischen Fachbereichen etabliert wurden, bietet demnach HMGB1 auch in der Zahnmedizin einen vielversprechenden Ansatzpunkt für präventive und therapeutische Interventionsstrategien zur Vermeidung negativer Begleiterscheinungen der kieferorthopädischen Zahnbewegung sowie entzündlicher Parodontalerkrankungen.

Dr. Moritz Kebschull (Teilprojekt 6) aus der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde, Universität Bonn, stellte daraufhin Ergebnisse aus seiner Zeit als Postdoktorand im Rahmen der Klinischen Forschergruppe vor. Seine Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, wie sich die seit 1999 weltweit verwendeten großen Unterformen der Parodontitis, die aggressive und chronische Parodontitis, auf molekularer Ebene unterscheiden. Dr. Kebschull und seine Ko-Autoren konnten in einem großen Patientenkollektiv charakteristische Unterschiede in der Pathobiologie beider Erkrankungen zeigen. Diese Unterschiede in der genomweiten Genexpression waren so prägnant, dass sie sich auch diagnostisch mit sehr hoher Erfolgsrate nutzen lassen. Allerdings zeigen die Daten auch eine nicht unerhebliche Heterogenität innerhalb der zurzeit verwendeten Klassen. In der Folge ist geplant, die klinische Nützlichkeit von nur durch die Pathophysiologie definierten Parodontitisformen zu erproben.

Im Anschluss referierte **Dr. Lina Gölz** (Teilprojekte 7/9) aus der Poliklinik für Kieferorthopädie, Universität Bonn, über oxidativen Stress und Entzündung in humanen PDL- und phagozytären Zellen. Oxidativer Stress ist gekennzeichnet durch eine vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und spielt im Rahmen inflammatorischer und hypoxischer Stoffwechsellagen eine wichtige Rolle. In-vitro-Arbeiten des Teilprojekts 7 haben zeigen können, dass PDL- und phagozytäre Zellen auf entzündliche und hypoxische Stimuli mit einer gesteigerten Expression inflammatorischer Mediatoren und Matrix-degenerierender Enzyme sowie ROS reagieren. Darüber hinaus konnte die Hochregulation protektiver Redox-Systeme in gesunden und pathologisch veränderten parodontalen Geweben, wie zum Beispiel bei Gingivitis, Parodontitis und Periimplantitis, als Antwort auf die erhöhte ROS-Bildung detektiert werden. Damit lieferte dieses Teilprojekt Hinweise auf die Bedeutung von oxidativem Stress im Parodont in vitro und in vivo. Im weiteren Verlauf sind Sauerstoffmessungen bei gesunden und parodontalerkrankten Patienten geplant sowie entsprechende In-vitro-Versuche an primären humanen Alveolarosteoblasten.

Thematisch wurde dieser Vortrag von **Dr. Svenja Memmert** (Teilprojekte 7/9) aus der Poliklinik für Kieferorthopädie, Universität Bonn, fortgesetzt. Nox-Proteine sind reaktive Kernproteine der NADPH-Oxidasen. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Reduzierung von Sauerstoff zu Superoxiden und damit der Generierung der ROS. Die Rollen von Nox und ROS sowohl in ihrer Abwehrfunktion als auch als Stressfaktoren im Parodont sind noch weitestgehend unbekannt. Die präsentierte Studie sollte die Funktion von Nox4, einem ubiquitär vorkommenden Mitglied der Nox-Familie, in PDL- und phagozytären Zellen näher beleuchten.

Eigene In-vitro-Versuche konnten eine Hochregulation der Nox4-Expression unter LPS-Stimulation sowohl in PDL-Zellen als auch in phagozytären Zellen (THP-1) nachweisen und diese auch auf Proteinebene durch Immunfluoreszenzfärbungen bestätigen. Befunde an immunhistologisch untersuchten humanen Gewebeprobe (zum Beispiel Gingivitis, Parodontitis, Periimplantitis) unterstützen diese Ergebnisse zusätzlich und könnten Hinweise auf eine wichtige immunologische Rolle von Nox-Proteinen im Parodont liefern. Eine erhöhte Nox4-Expressionsrate unter Hypoxie konnte bei PDL-, nicht jedoch bei phagozytären Zellen nachgewiesen werden. Dies kann mit den unterschiedlichen Eigenschaften beziehungsweise Aufgaben und der Lokalisation dieser Zellen im Parodont zusammenhängen.

Den Abschluss dieses thematisch zusammengehörenden Vortragsblocks bildete das Referat von **Cand. med. dent. Peter Pütz** (Teilprojekt 7), Universität Bonn, über p53 in humanen PDL-Zellen unter mechanischem, hypoxischem und inflammatorischem Stress. p53 hat nicht nur als Tumorsuppressor eine große biologische Bedeutung, sondern reguliert als Transkriptionsfaktor zahlreiche zelluläre Prozesse, auch in Zellen des stomatognathen Systems, wie zum Beispiel in PDL-Zellen.

Unter Stressbedingungen, wie zum Beispiel bei Hypoxie, mechanischer Belastung oder Entzündung, wird p53 aktiviert. Um die Rolle in humanen PDL-Zellen unter Stress zu studieren, wurde die p53-Expression in diesen Zellen nach hypoxischer (weniger als 3 Prozent O₂) beziehungsweise inflammatorischer Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) mittels PCR sowie Immunzytochemie untersucht. Zusätzlich wurde p53 immunhistochemisch in Gewebeprobe aus normalen und pathologisch veränderten Parodontien analysiert. Die Stimulationsversuche ergaben eine Aktivierung und teilweise zytoplasmatische Stabilisierung von p53 durch Hypoxie sowie in Kombination mit LPS. In entzündlich veränderten parodontalen Geweben konnte eine starke nukleäre p53-Immunfärbung nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen intrazellulären Nachweise von p53 werden mit stressbedingtem »trafficking« in Verbindung gebracht. Noch ausstehende Versuche werden sich mit dem Nachweis von p53 in PDL-Zellen unter mechanischem Stress sowie dessen Auswirkungen auf Apoptose beschäftigen.

Prof. Dr. Christoph Bourauel (Teilprojekt 5) aus der Oralmedizinischen Technologie, Universität Bonn, referierte im Anschluss zu Veränderungen der biomechanischen Eigenschaften des PDLs nach Parodontitis. Neueste Erkenntnisse zur Auswirkung der Parodontitis auf die biomechanischen Eigenschaften des PDLs werden in diesem Teilprojekt zur Berechnung von Finite-Elemente-Modellen von Patienten mit gesundem und erkranktem Parodont verwendet. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Parodontitis die biomechanischen Eigenschaften des PDLs verändern kann.

In enger Verbindung zu diesem Vortrag stand das Referat von **Marco Favino** (Teilprojekt 5) aus dem Institute of Computational Science, Universität von Lugano, Schweiz, über numerische Simulation und Parameterschätzung des PDL mit Finite-Elemente-Methoden unter Benutzung eines hyperporoelastischen Materialmodells. Die biphasische Natur des PDL (Matrix und Fluid) führt zu stark nichtlinearen Reaktionen des Materials. Die Schweizer Forscher haben nun Wege gefunden, beide Phasen bei ihren Versuchsmodellen zu berücksichtigen und fanden so optimale Daten für den Steifigkeitsparameter und die Permeabilität. Außerdem untersuchten sie den Einfluss des Flüssigkeitsaustritts am Rande des PDL. Insbesondere für die Permeabilität stimmen die gewonnenen Daten gut mit den Resultaten aus der Literatur überein.

An den biomechanischen Vortragsblock schlossen sich vier Referate an, die sich mit der Assoziation zwischen Parodontitis und Adipositas beziehungsweise Übergewichtigkeit befassten. Einzelstudien, aber auch Meta-Analysen, die solche Einzelstudien zusammenfassen und damit den höchsten Evidenzgrad besitzen, haben gezeigt, dass Parodontitis signifikant mit Adipositas und Übergewicht, Diabetes mellitus und metabolischem Syndrom assoziiert ist.

Obwohl die zugrundeliegenden Pathomechanismen für diese Assoziationen noch weitgehend unklar sind, wird angenommen, dass hierbei Adipokine eine Rolle spielen könnten. Adipokine sind Moleküle, die im Fettgewebe synthetisiert und ins Blut abgegeben werden. Die Serumspiegel zahlreicher Adipokine, wie zum Beispiel Visfatin, sind bei den oben genannten Erkrankungen erhöht. Diese Adipokine sind außerdem entzündungsfördernd und auch in der Sulkusflüssigkeit beziehungsweise in der Gingiva nachweisbar. **Dr. Andressa Nogueira** (Teilprojekt 4), Gastzahnärztin von der Universität Estadual Paulista (UNESP), Brasilien, zeigte, dass PDL-Zellen ebenfalls Visfatin synthetisieren können und dass dessen Produktion durch oralpathogene Bakterien, zum Beispiel *Fusobacterium nucleatum* und *Porphyromonas gingivalis*, durch Entzündungsmoleküle, wie Interleukin-1 β , gesteigert wird. Diese Ergebnisse legen nahe, dass parodontale Zellen zu den erhöhten Visfatinspiegeln in der Sulkusflüssigkeit und im Serum bei einer parodontalen Entzündung beitragen könnten. Weiterhin beschreiben diese Resultate einen möglichen Mechanismus, über den Parodontitis mit den oben genannten systemischen Erkrank-



■ *Sprecher, Referenten und Leiter der KFO 208 (von links): Prof. Søren Jepsen, Priv.-Doz. Matthias Wenghoefer, Prof. Andreas Jäger und Prof. James Deschner
Foto: ZÄ Anna Damanaki, Bonn*

kungen kausal assoziiert ist. Weitere Ergebnisse, die von der Referentin präsentiert wurden, zeigten zudem, dass die bakteriell stimulierte Produktion von Visfatin durch gleichzeitige biomechanische Belastung der Zellen reduziert werden konnte, das heißt, dass mechanische Kräfte eine anti-inflammatorische Wirkung ausüben können.

Danach präsentierte Zahnärztin **Anna Damanaki** (Teilprojekte 4/9), Experimentelle Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universität Bonn, Studien, die belegen, dass nicht nur PDL-Zellen, sondern auch gingivale Zellen Visfatin produzieren. Weiterhin wiesen Biopsien von parodontalerkrankten Patienten im Vergleich mit parodontalgesunden Individuen eine signifikant höhere Visfatinexpression auf. Diese Resultate unterstützen die Annahme, dass dieses Adipokin eine pathophysiologische Rolle bei der Entstehung und Progression von parodontalen Erkrankungen spielen könnte.

Prof. Dr. James Deschner (Teilprojekt 4), Experimentelle Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Universität Bonn, widmete sich der Frage, welche Effekte Visfatin auf das Parodont ausüben kann. Dafür wurden Mikroarray-Analysen durchgeführt, die darauf hindeuteten, dass Visfatin die Synthese von proinflammatorischen (CCL2) und matrixdegradierenden Molekülen (MMP1) in PDL-Zellen induziert. Diese Resultate konnten in Zellen von zahlreichen PDL-Zell-Spendern bestätigt werden. Insgesamt zeigen diese Daten einen möglichen Mechanismus auf, wie Adipositas und Übergewichtigkeit die parodontale Entzündung und Destruktion fördern beziehungsweise verstärken könnten.

Abschließend widmete sich **Dr. Marjan Nokhbehaim** (Teilprojekt 4), Experimentelle Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Universität Bonn, dem Einfluss von Visfatin auf die regenerative Heilung. Da regenerative Therapieverfahren, zum Beispiel die Applikation von Schmelzmatrixproteinen, auch bei adipösen und übergewichtigen Patienten durchgeführt werden, wurde in Zellversuchen untersucht, wie Visfatin auf die regenerationsfördernden Effekte von Schmelzmatrixproteinen in PDL-Zellen wirkt. Dabei zeigte sich, dass Visfatin zahlreiche positive Effekte von Schmelzmatrixproteinen, wie zum Beispiel die Stimulation der

Zellproliferation und -migration, der Synthese von Wachstumsfaktoren und Matrixmolekülen sowie der osteogenen Differenzierung, hemmte. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die regenerative parodontale Heilung bei adipösen und übergewichtigen Patienten eingeschränkt sein könnte und dass dabei Adipokine, wie zum Beispiel Visfatin, eine Rolle spielen.

Der Workshop fand seine Fortsetzung in dem Vortrag von **Dipl.-Biol. Gregor Bochenek** (Teilprojekt 3) aus dem Institut für Klinische Molekularbiologie, Universität zu Kiel. Ziel dieses Teilprojekts war es, die Funktionen des Gens ANRIL, des wichtigsten Risikogens des Herzinfarkts und der Parodontitis, zu entschlüsseln, dessen Wirkmechanismus bei der Ätiologie beider Krankheiten bislang völlig unbekannt war. Die Forscher konnten auf RNA- und Proteinebene nachweisen, dass Transkripte von ANRIL spezifische Gene regulieren, die weit von ihrem Ursprungsort im Erbgut des Menschen liegen. Diese Gene, ADIPOR1, VAMP3 und C11ORF10 genannt, sind wesentlich an der Steuerung des Fett- und Zuckerstoffwechsels beteiligt.

Durch anschließende Untersuchung der DNA von 870 Patienten der aggressiven Parodontitis und 2.700 gesunden Patienten im weltweit größten Patientenkollektiv der Parodontitis konnte die Existenz einer weiteren genetischen Risikovariante in einem der von ANRIL regulierten Gene (VAMP3/CAMTA1), die ebenfalls mit einer deutlich erhöhten Prävalenz pathogener Parodontalkeime assoziiert ist, nachgewiesen werden. Dieser Befund konnte in mehr als 21.000 Herzinfarktpatienten und 44.000 Kontrollen des größten europäischen Patientenkollektivs des Herzinfarkts (CARDIoGRAM) bestätigt werden.

Zusätzlich konnten weitere neue Risikovarianten der Parodontitis identifiziert werden, die innerhalb eines sich über C11ORF10 und den FADS-(Fettsäuren-Desaturase)-Gencluster erstreckenden Abschnitts im Genom liegen. Diese Varianten waren bereits zuvor als wichtige Risikofaktoren des metabolischen Syndroms und der chronisch entzündlichen Darmerkrankung beschrieben worden. Die Ergebnisse bestätigen laut Bochenek bisherige Befunde, dass Parodontitis und Atherosklerose einen gemeinsamen kausalen Zusammenhang zu haben scheinen, der möglicherweise in Prozessen des Fettstoffwechsels zu finden ist. Sie weisen darauf hin, dass ein gestörter Fett- und Zuckerstoffwechsel, vermutlich durch seine Effekte auf die Bildung von Entzündungsmediatoren, auch eine große Rolle bei der Entstehung der Parodontitis spielt. Die Ergebnisse wurden vor kurzem in der Fachzeitschrift *Human Molecular Genetics* veröffentlicht (*Hum Mol Genet* 2013; doi: 10.1093/hmg/ddt299).

Die nächsten beiden Vorträge dieses spannenden Workshops waren den antimikrobiellen Peptiden gewidmet. Antimikrobielle Peptide wirken einerseits direkt gegenüber Mikroorganismen, andererseits zeigen diese auch mediatorähnliche Eigenschaften im Rahmen der Vermittlung angeborener Immunreaktionen. Ziel der von **PD Dr. Henrik Dommisch** (Teilprojekt 2) aus der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde, Universität Bonn, präsentierten Studie war es, zu untersuchen, inwieweit die Expression der AMPs durch die Stimulation einer Kombination unterschiedlicher Oberflächenrezeptoren auf gingivalen Epithelzellen reguliert wird. Es zeigte sich, dass die simultane Stimulation von Toll-like Rezeptor 2 und 4 sowie dem Proteinase-aktivierten Rezeptor 2 die Expression der AMPs deutlich im Vergleich zur singulären Stimulation der genannten Rezeptoren hochregulierte. Der interne Mediator Histamin konnte den Effekt der kombinierten Rezeptorstimulation weiter verstärken.

Im Rahmen des Vortrags von Zahnarzt **Philipp Skora** (Teilprojekt 2) aus der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde, Universität Bonn, wurde eine klinische Studie vorgestellt, die aktuell dort durchgeführt wird. Ziel der Studie ist es, zu ermitteln, ob die Expression von AMPs durch therapeutische Interventionen bei Parodontitispatienten beeinflusst werden kann. Hierfür werden Patienten mit generalisierter chronischer Parodontitis im Rahmen der antiinfektiösen Therapiephase vor und nach dem subgingivalen Debridement bezüglich klinischer Parameter sowie mithilfe molekularbiologischer Labormethoden untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie könnten darüber Aufschluss geben, inwieweit die Veränderungen der klinischen Parameter mit der Expression spezifischer AMPs während der parodontalen Heilung korrelieren.

Den Abschluss des Workshops bildete der Vortrag von Zahnarzt **Tobias Waller** (Teilprojekte 2/9) aus der Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde, Universität Bonn, über die immunmodulatorischen Effekte von *P. gingivalis* outer membrane vesicles (OMV). *P. gingivalis*, eines der mit chronischen Parodontitis am stärksten assoziierten Bakterien, sezerniert konstant sogenannte OMV, die weit in das entzündliche Gewebe hinein penetrieren können und Effekte auf Epithelzellen sowie Lymphozyten ausüben. Sie sind offenbar in der Lage, TLR2, einen wichtigen »Pattern Recognition Rezeptor« des innate Immunsystems, stark zu aktivieren. Diese Immunantwort lässt sich durch kombinierte Stimulation mit Nukleinsäuren noch verstärken (Amplifikation). Ferner legen vorläufige Ergebnisse nahe, dass eine Vorstimulation mit OMV immunsuppressiv wirken könnte (Toleranz), was möglicherweise die Erkennung des Bakteriums erschwert und somit das Überleben von *P. gingivalis* in der entzündeten Tasche ermöglicht beziehungsweise erleichtert.

Wie in den Jahren zuvor gab auch dieser gelungene Workshop wieder zahlreiche Anregungen für neue spannende Forschungsprojekte. Der Workshop belegte zudem den unschätzbaren Nutzen einer interdisziplinären Zusammenarbeit, der für die Entschlüsselung der komplexen Vorgänge bei der Entstehung, Progression und Therapie von parodontalen Erkrankungen unabdingbar ist.