

F. vom Orde¹, M. Rödiger², N. Gersdorff²

Vergleichende Microarray-Analysen von humanem Periimplantitis- und Parodontitis-Gewebe in vivo

Comparative microarray analyses of inflamed human periimplant and periodontal tissues in vivo

Zielsetzung: Ziel der vorliegenden in-vivo-Studie war die Durchführung einer vergleichenden Genexpressionsanalyse von entzündetem periimplantären und parodontalen Gewebe, um mögliche Unterschiede dieser beiden Krankheitsentitäten auf molekularbiologischer Ebene aufzuzeigen. Die hier zusammengefassten Ergebnisse wurden in zwei Publikationen veröffentlicht [7, 17].

Materialien und Methoden: Unter Verwendung der Microarray-Technologie wurden die Genexpressionsmuster von entzündetem periimplantären Gewebe, entzündetem sowie gesundem parodontalen Gewebe untersucht und mittels Real-time(RT)-PCR verifiziert. Der Schwerpunkt lag hierbei auf Komponenten der extrazellulären Matrix sowie deren abbauender Enzyme.

Ergebnisse: Für die Gruppe der Kollagene konnte gezeigt werden, dass die nicht-fibrillären Kollagene (Typ IV, VI, VII und XVII) ein erhöhtes Expressionsmuster und die fibrillären Kollagene (Typ III und XI) ein verringertes Expressionsmuster im entzündeten periimplantären Gewebe im Vergleich zum entzündeten parodontalen Gewebe aufweisen. Bei den Enzymen wiesen Cathepsin B und C, MMP-1 und MMP-9 eine erhöhte Genexpression auf. Des Weiteren waren die MMP-Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-3 signifikant erhöht.

Schlussfolgerungen: Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass die Periimplantitis auf der molekularbiologischen Ebene klar von der Parodontitis abgrenzbar ist. Der Vergleich dieser beiden oralen Erkrankungen ist neben dem Erkenntnisgewinn über die Funktion krankheitsspezifischer Gene für Diagnose, Verlaufskontrolle und Prognose sowie für die Entwicklung neuer Periimplantitis-Therapien nutzbar.

Purpose: The aim of the present in vivo study was a comparative gene expression analysis of inflamed periimplant and periodontal tissues to demonstrate potential differences between these two disease entities at the molecular level. The data presented here was combined from two published studies [7, 17].

Materials and methods: Using microarray technology, the gene expression profiles of inflamed periimplant tissue, inflamed and healthy periodontal tissue were analyzed and verified by real-time (RT) PCR. The main focus was on extracellular matrix components as well as on their degrading enzymes.

Results: In inflamed periimplant tissue, non-fibril-forming collagens types IV, VI, VII and XVII were up-regulated and the fibril-forming type III and XI collagens were down-regulated compared to inflamed periodontal tissue. In the group of matrix-degrading enzymes, the cathepsins B and C, the matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-9 were up-regulated and two tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP-1 and TIMP-3, were significantly up-regulated.

Conclusions: In summary, the results of the present study show that periimplantitis can be clearly differentiated from periodontitis at the molecular level. Comparison of these two oral diseases might be important for the objectification of disease-specific genes, and for the diagnosis, progress and prognosis as well as for the development of new periimplantitis therapies.

Keywords: periimplantitis; periodontitis; microarray; real-time (RT) PCR; extracellular matrix

Schlüsselwörter: Periimplantitis; Parodontitis; Microarray; Real-time(RT)-PCR; Extrazelluläre Matrix

¹ Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Arbeitsgruppe Geweberegeneration, Universitätsmedizin Göttingen, Robert-Koch-Str. 40, 37075 Göttingen

² Abteilung Prothetik, Arbeitsgruppe Geweberegeneration, Universitätsmedizin Göttingen, Robert-Koch-Str. 40, 37075 Göttingen

¹ Department of oromaxillofacial surgery, tissue regeneration research group, Göttingen University Medicine, Robert-Koch-Str. 40, 37075 Göttingen

² Department of prosthetics, tissue regeneration research group, Göttingen University Medicine, Robert-Koch-Str. 40, 37075 Göttingen
Übersetzung: LinguaDent

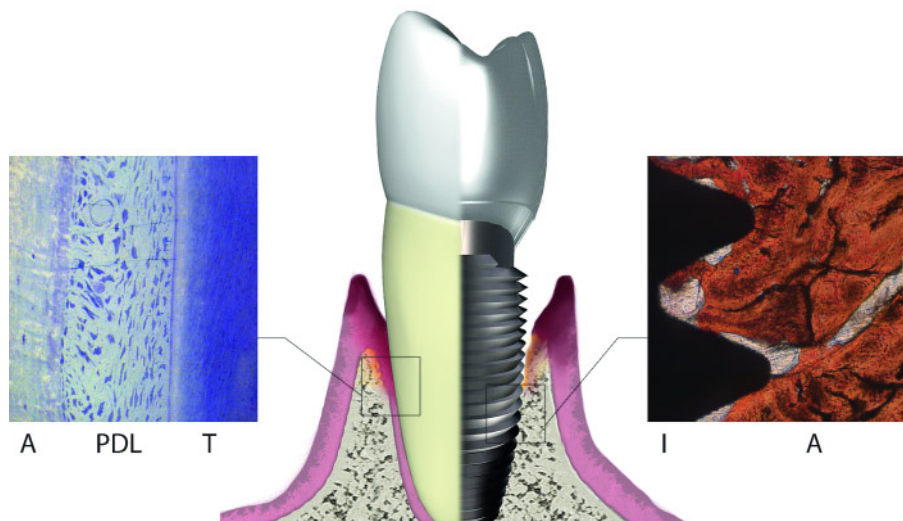


Abbildung 1 Übersicht über die histologischen Strukturen von parodontalem (links) und periimplantärem Gewebe (rechts). Bild I: Parodontalspalt mit PDL-Zellen, Maus, T = Tooth; A = Alveolarknochen.

Bild II: Knochen-Implantat-Interface, Schwein, I = Implant; A = Alveolarknochen.

Figure 1 Overview of the histological compositions from periodontal (left) and periimplant tissues (right). Left slice: Periodontal space with PDL-cells, mouse, T = tooth; A = alveolar bone. Right slice: bone-implant-interface; pig, I = implant; A = alveolar bone.

Abbildung: von Orde, Rödiger, Gersdorff

Hintergrund

In der modernen Zahnmedizin hat die orale Implantologie einen beachtlichen Stellenwert erlangt. Die klinische Langzeitprognose dentaler Implantate hängt von einer adäquaten Integration in die umgebenden Gewebe (Epithel, Bindegewebe und Knochen) ab.

An das periimplantäre Gewebe werden ähnliche Forderungen gestellt wie an das parodontale Gewebe: Stütz- und Verankerungsfunktion, Anpassungsfähigkeit der Gewebe gegenüber funktionellen Reizen und Schutzfunktion gegenüber Noxen der Mundhöhle. Im Gegensatz zu den Zähnen, die sich zusammen mit ihren Stützgeweben entwickeln, werden enossal Implantate in ein chirurgisch präpariertes Empfängerbett ausgereiften Gewebes inseriert (Abb. 1). Folglich sind die periimplantären Gewebe Resultat eines Wundheilungsprozesses. Dabei weisen die periimplantären anatomischen Strukturen – im Gegensatz zur gingivalen Situation – ein abwehrgeschwächtes Narbengewebe auf [3]. Trotz dieser Abwehrschwäche zeigen dentale Implantate hervorragende Langzeiterfolge auf. Jedoch lassen sich trotz bester Bemühungen biologische und technische Misserfolge vor und während der prothetischen Belastungsphase nicht in allen Fällen vermeiden [15]. In den letzten Jahren haben sich vor allem die biologischen Misserfolge, allen voran die periimplantären Infektionen (Periimplantitis), als wesentliches Problem herausgestellt [2]. Diese sind charakterisiert vor allem durch Zahnfleischtaschenbildung mit Entzündung um den Implantatstumpf, einhergehend mit progredienten Weichgewebs- und Alveolarknochenverlusten bis hin zu einer möglichen Implantatlockerung bzw. dessen Verlust.

Erstmals wurde im Jahre 1993 die Periimplantitis von der European Federation of Periodontology wie folgt klar definiert: Begrenzen sich pathologische Veränderungen osseointegrierter Implantate auf das Weichgewebe, spricht man von periimplantärer Mukositis; ist neben der Weichgewebsentzündung ein entzündlicher Knochenabbau zu verzeichnen, spricht man von Periimplantitis. Jedoch handelt es sich bei der Periimplantitis im Vergleich zur Parodontitis immer um eine lokale Ostitis, da das schützende und sehr immunkompetente Parodontium beim Implantat fehlt [10].

Background

Oral implantology has achieved a significant position in modern dentistry. The long-term clinical prognosis of dental implants depends on their adequate integration into the surrounding tissues (epithelium, connective tissue and bone).

Similar demands are made of periimplant tissue as of periodontal tissue: support and anchoring functions, tissue adaptability towards functional irritants and protection against harmful substances in the mouth. In contrast to the teeth, which develop together with their supporting tissues, endosteal implants are inserted in a surgically prepared recipient site (Fig. 1). In consequence, the periimplant tissues are the result of a wound healing process. Unlike the gingiva, the periimplant anatomical structures exhibit scar tissue with weakened defenses [3]. Despite this weakened resistance, dental implants demonstrate outstanding long-term results. Nevertheless, in spite of the best efforts, biological and technical failures before and during the prosthetic functional loading period cannot be avoided in every case [15]. In recent years, it has become apparent that biological failures in particular, especially periimplant infections (periimplantitis), are a significant problem [2]. These are characterized especially by the formation of gingival pockets with inflammation around the implant neck, associated with progressive loss of soft tissue and alveolar bone, possibly culminating in implant loosening or loss.

The European Federation of Periodontology for the first time defined periimplantitis clearly in 1993 as follows: if the pathological changes of osseointegrated implants are limited to the soft tissue, this is called periimplant mucositis; if inflammatory bone atrophy is found as well as soft tissue inflammation, this is known as periimplantitis. However, in contrast to periodontitis, periimplantitis is always a local osteitis, as the protective and highly immunocompetent periodontium is absent in the case of implants [10].

The problem of periimplantitis has become more and more important in recent years. This is due especially to the fact that cases of periimplant infection have increased as the number of implantations increased [15, 19]. In addition, it is known that the likelihood of failed implantation increases by 30 % if im-

Die Problematik der Periimplantitis hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Dies liegt vor allem daran, dass mit einer steigenden Anzahl von Implantationen auch die Fälle der periimplantären Infektionen zunehmen [15, 19]. Zudem ist bekannt, dass die Wahrscheinlichkeit des Misserfolgs der Implantation um 30 % ansteigt, wenn bereits zuvor ein Implantatverlust eingetreten war [24]. Eine weitere Problematik besteht darin, dass bei Vorlage einer Periimplantitis die Behandlung zeitaufwändig, teuer und der Erfolg sehr unsicher ist.

Die extrazelluläre Matrix (EZM)

Bei der EZM handelt es sich um den Anteil des Gewebes, der von Zellen in den Interzellularraum (Raum zwischen den Zellen) sezerniert wird. Oberflächlich betrachtet kommt der EZM die Aufgabe der Fixierung der in ihr eingebetteten Zellen zu. Betrachtet man die EZM jedoch genau, so kann man feststellen, dass die EZM mit den in ihr liegenden Zellen interagiert. Die Komponenten der EZM werden von Zellen synthetisiert und sezerniert, aber auch extrazellulär oder (nach Endozytose) intrazellulär abgebaut. Darüber hinaus wird durch die Bindung an bestimmte Komponenten der EZM durch Zellrezeptoren die Expression von Genen in den Zellen reguliert.

Die EZM setzt sich zum größten Teil aus verschiedenen Proteinen und Glykoproteinen sowie Polysacchariden zusammen. Dabei lässt sich die EZM in die Familie der Kollagene, in die Glykosaminoglykane sowie in nichtkollagene Glykoproteine unterteilen.

Die Familie der Kollagene umfasst zurzeit 27 verschiedene Kollagene (Kollagen I – Kollagen XXVII), welche den Hauptproteinanteil der EZM ausmachen [11]. Die große Vielfalt der Kollagentypen und die Anordnung und Vernetzung der Kollagenfibrillen bildet eine wesentliche Grundlage für die mechanische Stabilität der Gewebe. Neben Fibrillen-bildenden Kollagenen, wie Kollagen Typ I, II und III, lassen sich nicht-fibrilläre Kollagene unterscheiden. Als Beispiel für nicht-fibrilläre Kollagene sei das Kollagen Typ IV genannt, welches ein dreidimensionales Netzwerk bildet und so eine der wichtigsten Komponenten von Basalmembranen ist.

Alle Kollagene werden von einer Vielzahl von Zellen (Fibroblasten, Chondroblasten und Osteoblasten) synthetisiert und in die EZM sezerniert. Im Parodontium kommt den Kollagenfasern (Sharpey-Fasern) die Aufgabe der Verankerung des Zahnes im Alveolarknochen zu.

Die EZM unterliegt einem ständigen physiologischen Umbau, der durch proteolytische Enzyme bestimmt wird. Aber auch bei pathophysiologischen Prozessen können diese Enzyme aktiviert sein. Hierbei spielen Kollagenasen (u.a. MMPs) eine wichtige Rolle [22]. Sowohl entnommene Gewebeproben als auch kultivierte Gewebeproben aus entzündeter Gingiva zeigten eine erhöhte Kollagenaseaktivität im Vergleich zu Gewebeproben aus gesunder Gingiva. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass eine Zunahme der Kollagenaseaktivität in der Sulkusflüssigkeit bei Patienten, die an einer Gingivitis oder Parodontitis erkrankt sind, mit der Progredienz dieser Erkrankung korreliert [25]. Aufgrund dessen wurde in verschiedenen Studien angestrebt, aus der Gruppe der MMPs einzelne auffällige MMPs zu verifizieren [16]. Dabei lag das Augenmerk neben der Pathogenität auf dem sicheren Auftreten der verschiedenen MMPs bei der Parodontitis bzw. Periimplantitis. Im

plant loss occurred previously [24]. A further problem is that when periimplantitis is present, treatment is time-consuming and expensive and success is very uncertain.

The extracellular matrix (ECM)

ECM is the part of the tissue that is secreted by cells into the intercellular space. On a superficial level, the function of the ECM is to fix the cells embedded in it. However, if the ECM is considered precisely, it is found that the ECM interacts with the cells lying within it. The components of the ECM are synthesized and secreted by cells but are degraded extracellularly or intracellularly (after endocytosis). Moreover, expression of genes in the cells is regulated by binding of cell receptors to certain components of the ECM.

The ECM consists for the most part of different proteins and glycoproteins along with polysaccharides. The ECM can be subdivided into the collagen family, glycosaminoglycans and non-collagen glycoproteins.

The collagen family currently includes 27 different collagens (collagen I – collagen XXVII), which constitute most of the protein content of the ECM [11]. The great variety of collagen types and the arrangement and cross-linking of the collagen fibrils form an important basis for the mechanical stability of the tissue. Apart from fibril-forming collagens such as collagen type I, II and III, non-fibril-forming collagens can be distinguished. Collagen type IV is an example of a non-fibril-forming collagen; this forms a three-dimensional mesh and so is one of the most important components of basement membranes.

All collagens are synthesized by a number of cells (fibroblasts, chondroblasts and osteoblasts) and secreted into the ECM. In the periodontium the collagen fibers (Sharpey fibers) have the task of anchoring the tooth in the bony socket.

The ECM undergoes constant physiological remodeling and degradation, which is determined by proteolytic enzymes. However, these enzymes can also be activated in pathophysiological processes. Collagenases (including MMPs) play an important part in this [22]. Both biopsies and cultured tissue samples from inflamed gingiva showed increased collagenase activity compared with biopsies from healthy gingiva. In addition, it was shown that an increase in the collagenase activity in the crevicular fluid of patients with gingivitis or periodontitis correlates with progression of this disease [25]. On the basis of this information, attempts were made in different studies to find individual MMPs that stand out from the group of MMPs [16]. Apart from pathogenicity, attention was directed toward the definite occurrence of different MMPs in periodontitis or periimplantitis. In the course of these investigations, *Sorsa et al.* showed that MMP-8 plays a central role in periodontitis [22].

Apart from the MMPs, cathepsins B and C also play an important part in the inflammatory reaction [27]. The involvement of cathepsins in the destruction of periodontal structures

Zuge dieser Untersuchungen zeigten *Sorsa et al.*, dass MMP-8 eine zentrale Rolle bei der Parodontitis einnimmt [22].

Neben den MMPs spielen auch die Cathepsine B und C bei der Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle [27]. Durch den Nachweis einer Erhöhung von Cathepsin B, D, G und L bei der chronischen Parodontitis konnte die Beteiligung von Cathepsinen bei der Destruktion parodontaler Strukturen dargelegt werden [5]. Für die Periimplantitis konnte bereits eine Erhöhung von Cathepsin K in der Sulkusflüssigkeit nachgewiesen werden, jedoch konnte Cathepsin K nicht als Markerkeim identifiziert werden [23]. Ein möglicher Grund dafür liegt in der Pathogenese der Periimplantitis. So zeigten kontrollierte Tierstudien, dass es sich bei der Knochenresorption während der fortschreitenden Periimplantitis nicht um einen linearen Prozess handelt [29]. Infolgedessen könnten molekularbiologische Parameter (z. B. Cathepsin K) sowohl die aktive Phase der Gewebsauflösung als auch die ruhende Phase der Erkrankung widerspiegeln [23].

Der Abbau der EZM wird neben der Enzymaktivität auch von der Aktivität und Anzahl der Inhibitoren reguliert, zu denen die Gruppe der TIMPs (Tissue inhibitors of metalloproteinases) gezählt wird. Eine Reihe an Publikationen beschäftigt sich mit der genauen Funktion und Regulation der TIMPs bei der Parodontitis. Dabei kommen die Studien zu unterschiedlichen Vermutungen, wie die unterschiedlichen Genexpressionen der TIMPs zu interpretieren sind. So zeigen einige Studien, dass ein gestörtes Verhältnis zwischen MMPs und TIMPs (zugunsten der MMPs) zu einer Destruktion des Parodontalgewebes führen kann [26]. Daneben konnten einige Studien jedoch auch eine Erhöhung der TIMP-Expression im entzündeten Parodontalgewebe feststellen, was mit dem Bestreben nach einer Gewebemöostase erklärt wurde [1]. Hierbei scheint der Anstieg der TIMP-Expression bei der Parodontitis jedoch nicht ausreichend, um alle hochregulierten MMPs suffizient zu inhibieren [8].

Fragestellung

Aufgrund des hohen Anteils an extrazellulärer Matrix (EZM) sowohl im Parodontium als auch im periimplantären Knochen hat es sich diese Arbeit zur Aufgabe gemacht, die Genexpression einzelner EZM-Proteine sowie deren abbauender Enzyme mit Hilfe von Microarrays und Real-time(RT)-PCR zu vergleichen, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Parodontitis und Periimplantitis herauszuarbeiten.

Material und Methode

Patientenkollektiv

Die Gewebeproben entstammten von insgesamt 48 Patienten (21 Männer, 27 Frauen, im Alter zwischen 18 und 72 Jahren), die sich im Universitätsklinikum Göttingen in zahnärztlicher Behandlung befanden. Bei jedem Patienten wurde eine ausführliche Anamnese erhoben. Patienten, die Allgemeinerkrankungen wie koronare Herzerkrankungen, Diabetes mellitus oder Syndrome aufwiesen, wurden aus der Studie ausgeschlossen. Darüber hinaus war Nikotinkonsum ein weiteres Ausschlusskriterium. Die Gewebeproben für den gesunden mRNA-Pool wurden

was demonstrated by showing that cathepsins B, D, G and L are increased in chronic periodontitis [5]. An increase in cathepsin K was found in the crevicular fluid in periimplantitis but cathepsin K was not identified as a marker [23]. The pathogenesis of periimplantitis is a possible reason for this. Controlled animal studies showed that bone resorption during progressive periimplantitis is not a linear process [29]. As a result, molecular biological parameters (e. g. cathepsin K) can reflect both the active phase of tissue disintegration and also the resting phase of the disease [23].

Apart from enzyme activity, the breakdown of the ECM is also regulated by the activity and number of inhibitors, which include the group of the TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases). A series of articles deals with the precise function and regulation of the TIMPs in periodontitis. The studies arrive at different hypotheses as to how the different gene expressions of the TIMPs should be interpreted. Some studies show that a disturbed ratio between MMPs and TIMPs (in favor of the MMPs) can lead to destruction of the periodontal tissue [26]. However, some studies also found an increase in TIMP expression in the inflamed periodontal tissue, which was explained by attempted tissue homeostasis [1]. However, the increase in TIMP expression in periodontitis does not appear adequate to inhibit all up-regulated MMPs sufficiently [8].

Objective

Because of the high proportion of extracellular matrix (ECM) both in the periodontium and in the periimplant bone, the objective of this study was to compare the gene expression of individual ECM proteins and of the enzymes that degrade them using microarrays and real-time PCR in order to identify common features and differences between periodontitis and periimplantitis.

Materials and methods

Patients

The tissue samples were derived from 48 patients (21 men, 27 women, aged between 18 and 72 years), who were undergoing dental treatment in Göttingen University Hospital. A detailed medical history was obtained from each patient. Patients who had systemic diseases such as coronary heart disease, diabetes mellitus or syndromes were excluded from the study. Nicotine consumption was a further exclusion criterion. The tissue samples for the healthy mRNA pool were taken from healthy teeth (n = 16) extracted during orthodon-

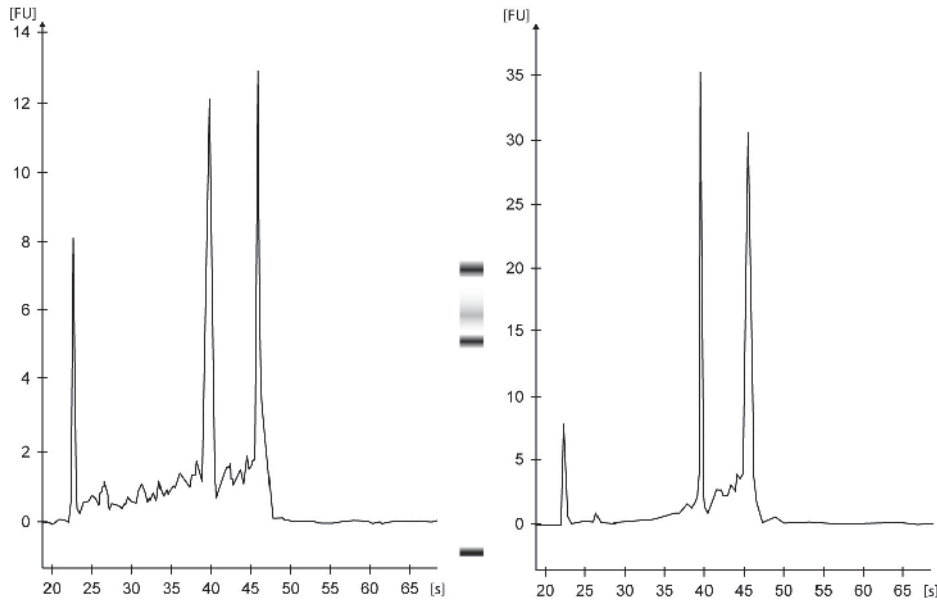


Abbildung 2 Die graphische Darstellung der Gelelektrophorese zeigt, dass die RNA eine ausreichende Güte aufweist.

Figure 2 Graphic presentation of the gel electrophoresis shows a sufficient RNA quality.

von extrahierten gesunden Zähnen ($n = 16$) entnommen, die im Rahmen einer kieferorthopädischen Behandlung bzw. aufgrund von kariösen Läsionen extrahiert worden waren. Parodontal erkranktes Gewebe wurde von nicht erhaltungswürdigen Zähnen ($n = 16$) entnommen, die aufgrund einer chronischen Parodontitis extrahiert werden mussten. Zur genauen Differenzierung der beiden Proben wurden die allgemein gültigen klinischen Parameter (Sondierungstiefen, BOP, Attachmentverlust, Zahnlockerung und radiologischer Knochenverlust) erhoben. Zudem wurde jede Probe mittels Real-time(RT)-PCR hinsichtlich der Konzentrationen von Nuclear Factor KappaB (NF- κ B) untersucht. NF- κ B ist ein Entzündungsmarker, welcher eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort bei Entzündungen spielt und bei diversen Entzündungsprozessen, wie auch bei der Parodontitis und Periimplantitis, aktiv ist [21]. Bei den periimplantären Gewebeproben handelte es sich um Gewebe von 16 enossalen Implantaten (Astra Tech, ITI Bonefit, Brånemark), die aufgrund fortgeschrittener Periimplantitis explantiert wurden. Auch hier wurden bei den Patienten neben einer ausführlichen Anamnese die bereits beschriebenen Befunde erhoben. Alle teilnehmenden Patienten wurden über die Hintergründe dieser Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung der Proben. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Göttingen genehmigt.

Molekularbiologische Methoden der Gewebepreparation

Bei der Gewebepreparation wurde vor allem Gewebe aus dem unteren Drittel der Wurzeloberfläche und Implantatoberfläche gewonnen, da sich hier vor allem bei parodontal geschädigten Zähnen noch PDL-Zellen vermuten lassen. Dies ist durch den

tic treatment or because of carious lesions. Periodontally diseased tissue was taken from teeth not worthy of preservation ($n = 16$) that had to be extracted because of chronic periodontitis. The generally accepted clinical parameters (probing depths, BOP, loss of attachment, tooth loosening and radiographic bone loss) were used for precise differentiation of the two samples. Each sample was also examined by real-time (RT) PCR with regard to the concentrations of nuclear factor kappa b (NF- κ B). NF- κ B is a marker of inflammation, which plays an important role in regulating the immune response in inflammation and is active in various inflammatory processes including periodontitis and periimplantitis [21]. The periimplant tissue samples consisted of tissue from 16 endosteal implants (Astra Tech, ITI Bonefit, Brånemark), which were explanted on account of advanced periimplantitis. In these cases, too, the findings described above were recorded for the patients, along with a detailed medical history. All participating patients were informed about the background to this study and gave written consent for use of the samples. The study was approved by the ethics committee of the medical faculty of Göttingen University.

Molecular biology methods of tissue preparation

Tissue from the lower third of the root surface and implant surface was obtained for tissue preparation, as PDL cells may still be present there especially in the case of teeth damaged by periodontal disease. This can be explained by the fact that bone atrophy has not yet occurred. The total RNA was isolated with

in dieser Region noch nicht eingetretenen Knochenabbau zu erklären. Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) isoliert. Der Ablauf der Isolierung erfolgte nach dem RNeasy-Mini-Protokoll des Herstellers. Um später eine genaue quantitative Bestimmung der Genexpression durchführen zu können, wurden die Proben mit DNase I (RNase-free) (Fa. Ambion, Austin, USA) behandelt [12].

Zur Qualitätssicherung wurden die RNA-Proben auf ihre Qualität/Güte mittels Agilent Bioanalyzer Chips (Agilent 2100 Bioanalyzer, Fa. Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) getestet (Abb. 2). Hierfür kam das RNA 6000 Nano LabChip kit (Fa. Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) zur Konzentrationsbestimmung zum Einsatz. Zudem erfolgte die quantitative Bestimmung der RNA-Konzentration durch geeignete Verdünnungen der Proben mit nukleasefreiem Wasser und photometrischer Messung (Photometer Gene Quant) bei einer Absorption von 260 nm. RNA-Lösungen mit einer Ratio von 1,8 bis 2,0 wurden als ausreichend rein angesehen, um sie in den weiteren Versuchen einzusetzen.

Durch das Advantage RT-for-PCR-Kit (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) erfolgte die Umschreibung der RNA in eine doppelsträngige cDNA durch eine im Kit enthaltene Moloney Murine Leukemia Virus reverse Transkriptase (RT), die an einen Oligo-(dT)-Primer mit modifizierter 5'-T7-RNA-Polymerase-Promoter-Sequenz bindet.

Im Folgenden wurden gleiche Mengen der Total-RNA-Lösungen aus den verschiedenen Gewebeproben in die drei zu untersuchenden Gruppen „gesundes PDL“ (Kontrollgruppe), „entzündetes PDL“ und „entzündetes periimplantäres Gewebe“ gepoolt.

Microarray-Untersuchung

Zur relativen mRNA-Bestimmung der drei beschriebenen Gruppen wurde der Affymetrix HG-U133A 2.0 GeneChip (Fa. Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) verwendet. Dieser untersucht 14.239 humane Gene mittels 22.283 auf dem GeneChip befindlichen Primern. Der GeneChip wurde mit cRNA-Fragmenten hybridisiert, welche eine maximale Länge von 100 bis 150 Basen aufwiesen. Die Hybridisierung erfolgte für 16 Stunden bei 45°C. Im Anschluss wurde der GeneChip in einer automatischen Affymetrix fluidic station gewaschen und durch Zugabe von Streptavidinphycoerythrin (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) fluoreszenzmarkiert. Für jeden Pool an cRNA wurden zwei GeneChips hybridisiert, sodass insgesamt sechs Chips verwendet wurden. Die markierten GeneChips wurden durch einen Hewlett-Packard-Gene-Array-Scanner (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) gescannt. Eine komplette Liste der auf dem HG-U133A präsentierten Gene kann in der Affymetrix-Datenbank (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>) eingesehen werden. Durch die Verwendung des Affymetrix Microarray Suite 5.0 wurden die Daten analysiert und mit Hilfe des Affymetrix Data Mining Tool evaluiert. Dabei wurden Gene mit einem mindestens zweifach höheren oder niedrigeren Unterschied in der Signalintensität von zwei unabhängigen Experimenten als reguliert bestimmt. P-Werte wurden für hoch regulierte Gene < 0,001 gesetzt und für herunter regulierte Gene auf > 0,999. Das niedrigere als auch das höhere Niveau der Signal-log-Ratio wurde mit einem 95%igen Konfidenzintervall angenommen.

the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The isolation was carried out according to the manufacturer's RNeasy Mini instructions. To allow subsequent precise quantitative determination of gene expression, the samples were treated with DNase I (RNase-free) (Ambion, Austin, USA) [12].

For quality assurance, the RNA samples were tested for quality using Agilent Bioanalyzer Chips (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) (Fig. 2). The RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was used to determine the concentration. The quantitative RNA concentration was determined by photometric measurement of suitable dilutions of the samples with nuclease-free water (Photometer Gene Quant) at an absorption of 260 nm. RNA solutions with a ratio of 1.8 to 2.0 were regarded as sufficiently pure for use in the subsequent tests.

The RNA was transcribed by the Advantage RT-for-PCR kit (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) into a double-stranded cDNA by a Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (RT) contained in the kit, which binds to an oligo (dT) primer with modified 5'-T7 RNA polymerase promoter sequence.

In the tests described below, equal quantities of the total RNA solutions from the different tissue samples were pooled into three groups: "healthy PDL" (control group), "inflamed PDL" and "inflamed periimplant tissue".

Microarray test

The Affymetrix HG-U133A 2.0 GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) was used to determine the relative mRNA of the three groups. This investigates 14,239 human genes by means of 22,283 primers located on the GeneChip. The GeneChip was hybridized with cRNA fragments, which had a maximum length of 100–150 bases. Hybridization took place for 16 hours at 45°C. The GeneChip was then washed in an automatic Affymetrix fluidic station and fluorescence-labeled by the addition of streptavidin phycoerythrin (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Two GeneChips were hybridized for each cRNA pool so that six chips were used in total. The labeled GeneChips were scanned by a Hewlett-Packard gene array scanner (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). A complete list of the genes presented on the HG-U133A can be found in the Affymetrix database (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>). The data were analyzed using the Affymetrix Microarray Suite 5.0 and evaluated using the Affymetrix Data Mining Tool. Genes with an at least two-fold higher or lower difference in signal intensity were determined as regulated by two independent experiments. P-values were set at < 0.001 for up-regulated genes and at > 0.999 for down-regulated genes. A 95 % confidence interval was accepted for the lower and higher level of the signal log ratio.

Transcript	Forward primer	Reverse primer	Länge/Length (Bp=Basen- paare/ base pairs)	Annealing temp.	Accession number
Col IV a1	TTC CCC CAG CCA CAA AGA GTC	CGT CAT CGC ACA ACA CCT	189 Bp	61.0°C	NM_001845
MMP-2	TGA CGG AAA GAT GTG GTG TG	CTC CTG AAT GCC CTT GAT GT	223 Bp	61.6°C	NM_004530
MMP-9	CAG AGA TGC GTG GAG AGT	AAT AGG TGA TGT TGT GGT	200 Bp	53.1°C	NM_004994
MMP-8	GCT CAT TTT GAT GCC GAA G	AGT AGT TGC TGG TTT CCC T	163 Bp	60.0°C	NM_002424
MMP-23B	CCT CCA CAA GAA AGG GAA	CTC GCC AGG AGT AGG TGG	184 Bp	57.9°C	NM_004659
CTSB	TAC TCC CCT TCC CAA CTG	CTT GTC ATC CTC CCA CCT	246 Bp	55.5°C	NM_001908
CTSC	GAG ACC CTT TCA ACC CCT T	GCT GCC ACT GCT ATG CTC T	190 Bp	60.0°C	NM_001814
NF- κ B	TCA ATG GCT ACA CAG GAC C	TCC CGC TTC TTC ACA CAC T	206 Bp	62.0°C	NM_021975
HPRT 1	TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA	GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT	94 Bp	61.0°C	NM_000194

Tabelle 1 Primerliste der verwendeten Primer [7].**Table 1** Primer list of the primers applied [7].

Real-time(RT)-PCR

Zur Verifizierung der in den Microarray-Analysen gewonnenen Ergebnisse wurde die Real-time(RT)-PCR herangezogen. Dabei liegt der Vorteil der Real-time(RT)-PCR in ihrer sehr hohen Sensitivität und ermöglicht eine quantitative Analyse. Dazu wurden exemplarisch ein bis zwei Gene aus jeder Hauptgruppe untersucht. Bei der hierfür verwendeten cDNA handelte es sich um dieselben Proben, die auch für die Hybridisierung der Microarray-Versuche eingesetzt wurden.

Die für die PCR notwendigen spezifischen Primersequenzen wurden der Datenbank von NCBI (NCBI Blast: Nucleotide-nucleotide Blast [blastn], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) entnommen. Die sich daraus ergebenden, für die Untersuchung spezifischen Primersequenzen wurden anschließend von der Firma Operon Biotechnologie GmbH (Köln, Deutschland) synthetisiert. Zur Bestimmung der für jeden Primer spezifischen Annealing-Temperatur wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Mittels einer Sequenzierung der Gradienten-PCR-Produkte wurden die verwendeten Primer reevaluiert und ihre Signifikanz nachgewiesen. Die Sequenzierung, unter der Verwendung der Methode nach Sanger [6], erfolgte durch die Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen, Deutschland). Die so erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit der NCBI-Nukleotiddatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) abgeglichen. Eine Übersicht über die verwendeten Primer findet sich in Tabelle 1.

Die Real-time(RT)-PCR wurde mit dem Mastercycler ep gradients, realplex² der Firma Eppendorf sowie mit SYBR Green I Master-Mix (Eppendorf Real Master Mix 2.5x, PCR Kit, FA, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) als fluoreszierendes Molekül durchgeführt. Während der DNA-Amplifikation wurde die Fluoreszenzintensität kontinuierlich durch eine im optischen Modul des Mastercycler integrierte CCD-Camera erfasst. Der verwendete Ansatz aus 12,5 μ l des SYBR Green I Master-Mix, 20 pmol Primer, sowie 250 ng cDNA wurden zu einem Gesamt-

Real-time (RT) PCR

Real-time (RT)PCR was performed to verify the results obtained in the microarray analyses. The advantages of real-time (RT) PCR are its very high sensitivity and that it allows quantitative analysis. One to two genes from each main group were investigated as an example. The same samples were used for the cDNA as were used for microarray hybridization.

The specific primer sequences necessary for PCR were obtained from the NCBI database (NCBI blast: Nucleotide-nucleotide blast [blastn], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The resulting specific primer sequences for the test were then synthesized by Operon Biotechnologie GmbH (Cologne, Germany). A gradient PCR was performed to determine the specific annealing temperature for each primer. The employed primers were reevaluated by sequencing of the gradient PCR products and their significance was demonstrated. The sequencing, using Sanger's method [6], was performed by Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen, Germany). The nucleotide sequences obtained were matched with the NCBI nucleotide database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Table 1 provides an overview of the primers used.

The real-time (RT) PCR was performed with the Eppendorf Mastercycler ep gradients, realplex² and with SYBR Green I Master-Mix (Eppendorf Real Master Mix 2.5x, PCR Kit, Eppendorf, Hamburg, Germany) as fluorescing molecule. During DNA amplification, the fluorescence intensity was recorded continuously by a CCD camera integrated in the optical module of the mastercycler. 12.5 μ l of the SYBR Green I Master-Mix, 20 pmol of primer, and 250 ng cDNA were made up to a total volume of 25 μ l with DEPC water and used for the PCR.

At the start of the PCR there was a single initial denaturing of the DNA for 2 min at 95°C. This was followed by a cycle repeated 45 times, consisting of an initial denaturing phase (2 min at 95°C), a denaturing phase (3 sec at 95°C), an annealing phase (20 sec at annealing temperature, see Table 1) and an

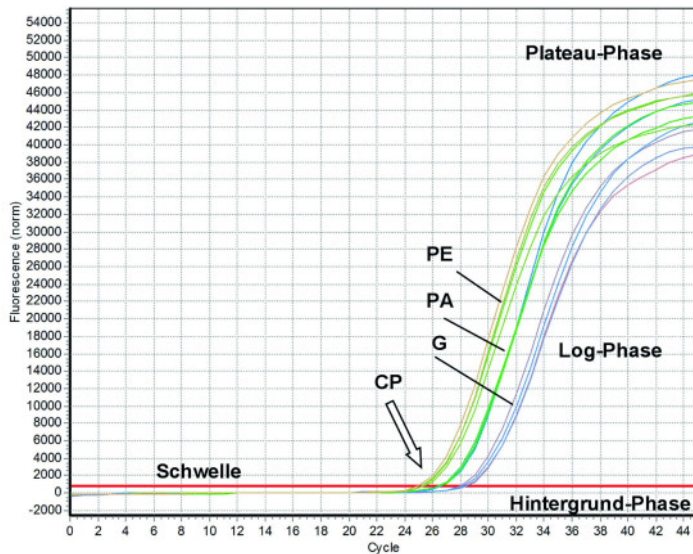


Abbildung 3 Darstellung der gemessenen Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl von MMP-2. Zu erkennen ist der frühere Anstieg bei der Periimplantitis (PE) und bei der Parodontitis (PA) im Vergleich zum gesunden Parodontium (G). Im Verlauf der PCR wird der Schwellenwert vom Programm berechnet. Erst beim Kreuzen der linearen Phase mit dem Schwellenwert (rote Linie) hebt sich die Fluoreszenz des spezifischen PCR-Produkts gegenüber der Hintergrundfluoreszenz ab. Dieser Punkt wird Crossing Point (cp) genannt.

Figure 3 Illustration of the measured fluorescence against the cycle number of MMP-2. The earlier increase of inflamed periimplant tissue (PE) and inflamed periodontal tissue (PA) in comparison to healthy periodontium (G) is visible. The computer program calculates the threshold during the PCR process. Not before the linear phase crosses the threshold (red line) the fluorescence of the specific PCR product is silhouetted against the background fluorescence. This spot is called crossing point (cp).

volumen von 25 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt und für die PCR verwendet.

Zu Beginn der PCR erfolgte eine einmalige Initialdenaturierung der DNA für 2 min bei 95°C. Daran schloss sich der 45-mal wiederholende Zyklus, bestehend aus einer Initialdenaturierungsphase (2 min bei 95°C), einer Denaturierungsphase (3 sec bei 95°C), einer Anlagerungsphase (20 sec bei Annealing-Temp – siehe Tab. 1) und einer Elongationsphase (29 sec bei 68°C) an. Am Ende der 45 Zyklen erfolgte die Generierung einer Schmelzkurve (Rampenzeiten: 20 sec bei 50°C–95°C in 0,3°C Schritten), die durch Messung der Extinktion des SYBR Greens I graphisch dargestellt wurde (Abb. 3). Die Real-time(RT)-PCR-Amplifikationseffizienz wurde durch die von der Mastercycler-ep-Realpex-S-Software dargestellten Kurven ermittelt und mit einer hohen Effizienz (Ratio 2.01) bewertet. Zur Qualitätssicherung wurden die Versuche in drei Durchgängen á drei Proben durchgeführt. Dabei lagen die Inter-test-Variationen bei $\leq 2\%$ und die Intra-test-Variationsbreite bei $\leq 1\%$. Die Berechnung der relativen Ratios erfolgte unter der Benutzung des Algorithmus nach Pfaffl [14]. Die Normalisierung der Real-time-Ergebnisse erfolgte über das Housekeeping-Gen-Hypoxanthine-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT-1).

Der Vergleich zwischen den Erkrankungen Parodontitis und Periimplantitis erfolgte über den Zwischenschritt des Vergleiches der jeweiligen Erkrankung mit dem Expressionsmuster des gesunden Parodontiums (neutraler Bezugspunkt). Zuerst wurden die beiden entzündeten Gewebe (parodontal und periimplantär entzündetes Gewebe) mit dem gesunden parodontalen Gewebe verglichen und in einem zweiten Schritt wurden die beiden Erkrankungen miteinander verglichen. Die so normalisierten Genexpressionswerte sind in Tabelle 2 zusammengefasst dargestellt und nach den Gesichtspunkten „erhöht“ (increased = I), „erniedrigt“ (decreased = D) und „keine Veränderung“ (no change = NC) bewertet. Dabei wurden Gene mit einem mindestens zweifach höheren oder niedrigeren (fold change Ratio ± 2) Unterschied in der Signalintensität als differenziert reguliert bestimmt. Dies entsprach einer ungefähren Abweichung von $\pm 0,5$ Punkten bei den CT-Werten (cycle thresholds) der Real-time(RT)-PCR, dies wurde als eine signifikante Veränderung definiert.

elongation phase (29 sec at 68°C). At the end of the 45 cycles, a melting curve was generated (ramp times: 20 sec at 50°C–95°C in 0.3°C increments), which was shown graphically by measuring the extinction of the SYBR Green I (Fig. 3). The real-time (RT) PCR amplification efficiency was found from the curves shown by the Mastercycler ep Realpex S software and assessed with high efficiency (ratio 2.01). For quality assurance, the tests were performed in three passages of three samples. The inter-test variations were $\leq 2\%$ and the intra-test variation range was $\leq 1\%$. The relative ratios were calculated using the Pfaffl algorithm [14]. The real-time results were normalized via the housekeeping gene hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT-1).

The diseases periodontitis and periimplantitis were compared by means of an intermediate stage of comparing the respective disease with the expression profiles of healthy periodontium (neutral reference point). The two inflamed tissues (periodontal and periimplant inflamed tissue) were first compared with the healthy periodontium and in a second step the two diseases were compared with one another. The normalized gene expression values are summarized in Table 2 and assessed as increased (= I), decreased (= D) and no change (= NC). Genes with an at least two-fold higher or lower (fold change ratio ± 2) difference in the signal intensity were determined as differently regulated. This corresponded to an approximate deviation of ± 0.5 points in the CTs (cycle thresholds) of the real-time (RT) PCR, and this was defined as a significant change.

Bezeichnung/Denotation	Transcript	Fold change ratio of the microarray results	Vergleich / Comparison of periimplantitis and periodontitis
COL3A1	Collagen, type III, alpha1	-7.21	D
COL4A1	Collagen, type IV, alpha1	4.5	I
COL6A1	Collagen, type VI, alpha1	4.691	I
COL8A1	Collagen, type VIII, alpha	-3.681	I
COL11A1	Collagen, type XI, alpha1	-7.26	D
COL17A1	Collagen, type XVII, alpha1	39.947	I
MMP-1	Matrix metalloproteinase-1	3.655	I
MMP-2	Matrix metalloproteinase-2	1.548	NC
MMP-8	Matrix metalloproteinase-8	12.38	NC
MMP-9	Matrix metalloproteinase-9	-10.411	I
MMP-23B	Matrix metalloproteinase-23B	3.16	NC
TIMP-1	Tissue inhibitor of MMP -1	-2.043	I
TIMP-3	Tissue inhibitor of MMP -3	1.464	I
CTSB	Cathepsin B	3.434	NC
CTSC	Cathepsin C	1.087	NC

Tabelle 2 Übersicht über die differentielle Expression der untersuchten Gene im Microarray. Vergleich Periimplantitis mit chronisch entzündetem Parodontium [17].

Table 2 Overview of the differential expression of the investigated genes in the microarray. Comparison of periimplantitis and chronic inflamed periodontium [17].

Ergebnisse

Probenverifizierung der gewonnenen mRNA

Die vor der Microarray-Analyse durchgeführte Real-time(RT)-PCR zur Bestimmung des Entzündungsmarkers (Transkriptionsfaktor) NF- κ B zeigte in den chronisch entzündeten Geweben (Parodontitis und Periimplantitis) im Vergleich zum gesunden PDL ein deutlich erhöhtes Expressionsmuster. Dieser Nachweis bestätigte neben der klinischen Diagnostik der Proben, dass es sich bei den Gewebeproben tatsächlich um chronisch entzündetes Gewebe (Parodontitis bzw. Periimplantitis) handelte. Das Expressionsmuster von NF- κ B zwischen den beiden chronisch entzündeten Geweben war wiederum sehr ähnlich.

Ergebnisse der Microarray-Analysen

Bei der Untersuchung von 22.283 humanen Genen konnten 2.079 Gene mit einer differenzierten Genexpression mit einem mindestens zweifach höheren oder niedrigeren Unterschied (fold change Ratio +/- 2) dargestellt werden.

Dabei waren die Expressionsdaten von 1093 Genen bei dem chronisch entzündeten periimplantären Gewebe im Vergleich zum chronisch entzündeten parodontalen Gewebe signifikant hoch reguliert (fold change Ratio +2) und die Expres-

Results

Sample verification of the obtained mRNA

The real-time (RT) PCR performed prior to microarray analysis to determine the inflammatory marker (transcription factor) NF- κ B showed a markedly increased expression profile in the chronically inflamed tissues (periodontitis and periimplantitis) compared with healthy PDL. Alongside the clinical diagnosis, this finding confirmed that the tissue samples actually consisted of chronically inflamed tissue (periodontitis or periimplantitis). The expression profile of NF- κ B between the two chronically inflamed tissues was again very similar.

Results of the microarray analyses

When 22,283 human genes were tested, 2,079 genes with a different gene expression with an at least two-fold higher or lower difference (fold change ratio +/- 2) were demonstrated. The expression data of 1,093 genes were significantly up-regulated in the chronically inflamed periimplant tissue compared with chronically inflamed periodontal tissue (fold change ratio + 2) and the expression of 986 genes was significantly down-regulated (fold change ratio - 2). Table 3 provides a summary of

Accession number	Denotation	Transcript	Ratio Parodontitis	Ratio Periimplantitis	Vergleich/ Comparison of periimplantitis and periodontitis
NM_001845	Col IV a1	Collagen IV a1	16.348	24.489	I
NM_004530	MMP-2	Matrix metalloproteinase 2	2.6856	3.802	NC
NM_002424	MMP-8	Matrix metalloproteinase 8	-0.4757	1.173	NC
NM_004994	MMP-9	Matrix metalloproteinase 9	30.13	25.368	D
NM_004659	MMP-23B	Matrix metalloproteinase 23B	1.281	0.706	NC
NM_001908	CTSB	Cathepsin B	18.522	25.599	I
NM_001814	CTSC	Cathepsin C	4.856	21.873	I
NM_021975	NF-B	Nuclear factor kappa B	2.608	3.7189	NC

Tabelle 3 Übersicht über die differentielle Expression der untersuchten Gene mit der Real-time(RT)-PCR. Vergleich Periimplantitis mit gesundem Parodontium (Ratio Periimplantitis) und gesundes Parodontium mit chronisch entzündetem Parodontium (Ratio Parodontitis). Der Vergleich Periimplantitis und Parodontitis zeigt die differentielle Expression zwischen chronisch erkranktem Parodontium und chronisch periimplantär entzündetem Gewebe.

Table 3 Overview of the differential expression of the investigated genes with the help of real-time(RT)-PCR. Comparison of periimplantitis and healthy periodontium (Ratio periimplantitis) as well as healthy and chronic inflamed periodontium (Ratio periodontitis).

The comparison of periimplantitis and periodontitis shows the differential expression of chronic inflamed periodontium and chronic inflamed periimplant tissue.

sion von 986 Genen signifikant herunter reguliert (fold change Ratio -2). In Tabelle 3 findet sich eine Übersicht über die von uns schwerpunktmäßig untersuchten Komponenten der EZM sowie deren abbauender Enzyme.

Ergebnisse der Real-time(RT)-PCR

Zur Verifizierung der aus den Microarray-Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse wurde eine Auswahl an Proteinen mit Hilfe der real-time (RT)-PCR untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Cathepsine B und C (CTSB und CTSC) bei der Real-time-PCR eine erhöhte Genexpression bei der Periimplantitis im Vergleich zum gesunden parodontalen Gewebe aufwiesen. Hierbei lagen die Ratios bei 25,599 und 21,873. Aus der Gruppe der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) wurden MMP-2, -8, -9 und -23B untersucht, wobei für MMP-2 und -9 im periimplantär entzündeten Gewebe ein erhöhtes Expressionslevel nachgewiesen werden konnte. Die Ratio betrug dabei 3.802 bzw. 25.368. Wiederum konnten bei MMP-8 und MMP-23B keine signifikanten Änderungen für die Periimplantitis im Vergleich zur Parodontitis festgestellt werden.

Aus der Gruppe der Kollagene wurde Kollagen IV (alpha1) untersucht und eine erhöhte Ratio (24,489) festgestellt.

Gegenüberstellung der Microarray- und Real-time(RT)-PCR-Ergebnisse

Aufgrund der größeren Sensivität der Real-time(RT)-PCR konnten bei einigen Genen Genexpressionsunterschiede festgestellt werden, die mit Hilfe der Microarray-Technologie

ECM components and their degrading enzymes on which our study focused.

Real-time (RT) PCR results

To verify the results obtained from the microarray tests, a selection of proteins was investigated using real-time (RT) PCR. This showed that cathepsins B and C (CTSB and CTSC) had increased gene expression on real-time PCR in periimplantitis compared with healthy periodontal tissue. The ratios were 25.599 and 21.873. From the matrix metalloproteinase group (MMPs) MMP-2, -8, -9 and -23B were tested and an increased expression level was found for MMP-2 and -9 in inflamed periimplant tissue. The ratio was 3.802 and 25.368 respectively. No significant changes were found in MMP-8 and MMP-23B for periimplantitis compared with periodontitis.

Out of the collagen group, collagen IV (alpha1) was tested and an increased ratio (24.489) was found.

Comparison of the microarray and real-time (RT) PCR results

Because of the greater sensitivity of the real-time (RT) PCR, gene expression differences were found with a few genes that could not be demonstrated using microarray technology

Accession number	Denotation	Transcript	Microarray Ergebnis/result	Real-time (RT) PCR-Ergebnis/result
NM_001845	Col IV a1	Collagen IV a1	I	I
NM_004530	MMP-2	Matrix metalloproteinase 2	NC	NC
NM_002424	MMP-8	Matrix metalloproteinase 8	NC	NC
NM_004994	MMP-9	Matrix metalloproteinase 9	I	D
NM_004659	MMP-23B	Matrix metalloproteinase 23B	NC	NC
NM_001908	CTSB	Cathepsin B	NC	I
NM_001814	CTSC	Cathepsin C	NC	I
NM_021975	NF-B	Nuclear factor kappa B	I	NC

Tabelle 4 Übersicht der Ergebnisse über den Vergleich Periimplantitis gegen Parodontitis für die beiden angewandten Methoden [17].

Table 4 Overview of the comparison of the microarray and real-time(RT)-PCR results [17].

nicht nachgewiesen werden konnten (MMP9, CTSB, CTSC). Ansonsten stimmten die Ergebnisse aus den beiden Methoden überein (Tab. 4).

(MMP9, CTSB, CTSC). Otherwise, the results of the two methods were in agreement (Table 4).

Diskussion

Das klinische Erscheinungsbild der chronischen Periimplantitis lässt eine ähnliche Ätiologie wie die der chronischen Parodontitis vermuten. Durch eine Reihe an Studien konnte diese Vermutung auch bestätigt werden [20]. Dabei basiert der primäre ätiologische Faktor der beiden Erkrankungen auf einer vermehrten Plaqueansammlung am Zahn bzw. Implantat, infolgedessen es zu destruktiven Veränderungen der umliegenden Hart- und Weichgewebe kommt. Bei dieser Betrachtung muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich um zwei verschiedene Gewebetypen (Zahn = Desmodont = Weichgewebe; Implantat = Knochen = Hartgewebe) handelt, was zu einer unterschiedlichen Pathogenese der beiden Erkrankungen führen kann. Eine klare Abgrenzung der Periimplantitis von der Parodontitis fehlt jedoch bislang.

In dieser Arbeit wurden mittels Microarray-Technologie 22.283 humane Gene im gesunden und im chronisch entzündeten Parodontalgewebe sowie im chronisch entzündeten periimplantären Gewebe vergleichend untersucht. Aufgrund der großen Datenmenge konzentrierte sich diese Arbeit auf die EZM-Komponenten sowie die abbauenden Enzyme. Zum einen deshalb, um signifikant differenziert exprimierte Gene innerhalb dieser beider wichtigen Gruppen herauszufiltern und zum anderen, um mögliche Unterschiede zwischen der Parodontitis und der Periimplantitis zumindest auf der mRNA-Ebene zu erarbeiten.

Da sowohl die angewandte Microarray-Technologie als auch die Real-time-RT-PCR ausschließlich mRNA untersucht, muss an dieser Stelle hinzugefügt werden, dass der alleinige Nachweis von mRNA nicht das Vorhandensein des dazugehörigen Proteins bzw. dessen Sekretion und damit seine biolo-

Discussion

The clinical features of chronic periimplantitis suggest a similar etiology to that of chronic periodontitis. This has also been confirmed by a series of studies [20]. The primary etiologic factor in both diseases is based on increased plaque accumulation on the tooth or implant, with resulting destructive changes in the surrounding hard and soft tissue. However, it must be borne in mind that there are two different types of tissue (tooth = desmodontium = soft tissue; implant = bone = hard tissue), which can lead to a different pathogenesis of the two diseases. However, there is as yet no clear demarcation between periimplantitis and periodontitis.

In this study 22,283 human genes in healthy tissue, chronically inflamed periodontal tissue and chronically inflamed periimplant tissue were compared by means of microarray technology. Because of the large amount of data, this study concentrated on the ECM components and their degrading enzymes, on the one hand in order to filter out significantly differently expressed genes within these two important groups and on the other hand, in order to identify possible differences between periodontitis and periimplantitis, at least at the mRNA level.

Since both the performed microarray technology and real-time PCR investigate mRNA exclusively, it must be added at this point that detection of mRNA alone does not signify the presence or secretion of the corresponding protein and thus its biological activity. Below we discuss the possible roles of the investigated genes, assuming that the amount of mRNA correlates with the amount of corresponding proteins in the periimplant tissue and in the periodontal tissue. This corresponds to current expert opinion.

gische Wirksamkeit bedeutet. Im Folgenden diskutieren wir die möglichen Rollen der untersuchten Gene in der Annahme, dass die mRNA-Menge mit der Menge an dazugehörigen Proteinen im periimplantären Gewebe und im parodontalen Gewebe korreliert. Dieses entspricht der heutigen Expertenmeinung.

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

Eine Reihe an Studien konnte die erhöhte Expression von MMP-8 sowohl bei der adulten als auch bei der juvenilen Parodontitis (aktuelle Nomenklatur: chronische bzw. aggressive Parodontitis) bestätigen [16]. Bei unseren Untersuchungen konnten keine signifikanten Änderungen von MMP-8 und MMP-23B für die Periimplantitis im Vergleich zur Parodontitis festgestellt werden. Dies heißt jedoch nicht, dass diese MMPs keine Rolle bei der Periimplantitis spielen, vielmehr bedeutet das, dass MMP-8 und MMP-23B bei der Periimplantitis im Vergleich zur Parodontitis nicht differenziert exprimiert werden. Jedoch war ein Anstieg der MMP-2- und MMP-9-Konzentrationen bei der Periimplantitis nachweisbar. Die Korrelation zwischen MMP-2-Anstieg und Destruktion der parodontalen Strukturen konnte bereits nachgewiesen werden [28].

Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen (TIMPs)

Im Vergleich zu der Fülle an Publikationen über die Expression von TIMPs bei der Parodontitis sind für die Periimplantitis zurzeit nur wenige Studien verfügbar. Eine Studie von *Nomura et al.* belegt den Anstieg der Konzentrationen an MMP-1, MMP-8 und TIMP-1 im Wundbereich nach Implantatinsertion [13].

Die vorliegende Studie zeigt, dass TIMP-1 bei der Periimplantitis im Vergleich zum Gesunden herunter reguliert ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von TIMP-1 und TIMP-3 im Vergleich zur Periimplantitis bei der Parodontitis stärker herunter reguliert ist. Dieses könnte bedeuten, dass eine im Verhältnis höhere Expressionsrate dieser beiden TIMPs bei der Periimplantitis zu einer besseren Inhibition der MMPs im periimplantär entzündeten Gewebe führt.

Cathepsine (CTS)

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine signifikante Erhöhung der mRNA für Cathepsin B und Cathepsin C sowohl bei der Parodontitis als auch bei der Periimplantitis. Zudem veranschaulichen die Ergebnisse den engen Zusammenhang zwischen Knochenresorption und dem Vorhandensein von Cathepsin B und C. So lassen sich bei der Periimplantitis ein ungefähr doppelt so hoher Anstieg von Cathepsin B und ein fünffach höherer Anstieg von Cathepsin C im Vergleich zur Parodontitis nachweisen. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die Cathepsine eine wichtigere Rolle bei dem hydrolytischen Abbau der EZM des periimplantären Gewebes im Vergleich zum parodontalen Gewebe haben.

Kollagene

Betrachtet man die Expression der Kollagene bei der Periimplantitis, so muss berücksichtigt werden, dass aufgrund des angestrebten Phänomens der Osseointegration im Bereich des enossalen Implantats primär keine Ausbildung eines Parodon-

Matrix metalloproteinases (MMPs)

A series of studies has confirmed the increased expression of MMP-8 in both adult and juvenile periodontitis (current nomenclature: chronic and aggressive periodontitis) [16]. In our investigations, no significant changes in MMP-8 and MMP-23B were found for periimplantitis compared with periodontitis. However, this does not mean that these MMPs do not play any role in periimplantitis; rather, it means that MMP-8 and MMP-23B are not expressed differently in periimplantitis compared with periodontitis. However, an increase in the MMP-2 and MMP-9 concentrations was demonstrated in periimplantitis. The correlation between the rise in MMP-2 and destruction of the periodontal structures has already been shown [28].

Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)

Compared with the large number of publications on the expression of TIMPs in periodontitis, only a few studies are currently available for periimplantitis. A study by *Nomura et al.* confirms the increase in the concentrations of MMP-1, MMP-8 and TIMP-1 in the wound region following implant insertion [13].

The present study shows that TIMP-1 is down-regulated in periimplantitis compared with healthy tissue. Moreover, it was shown that the gene expression of TIMP-1 and TIMP-3 is down-regulated more in periodontitis compared with periimplantitis. This might mean that a relatively higher rate of expression of these two TIMPs in periimplantitis leads to better inhibition of the MMPs in the inflamed periimplant tissue.

Cathepsins (CTS)

The results of this study show a significant increase in mRNA for cathepsin B and cathepsin C in both periodontitis and periimplantitis. In addition, the results illustrate the close association between bone resorption and the presence of cathepsin B and C. The increase in cathepsin B is about twice as high and the increase in cathepsin C is about five times greater in periimplantitis compared with periodontitis. These results suggest that the cathepsins appear to have a more important role in the hydrolytic degradation of the ECM of periimplant tissue compared with periodontal tissue.

Collagens

When the expression of the collagens in periimplantitis is considered, it must be remembered that no primary production of a periodontal ligament takes place because of the desired phenomenon of osseointegration in the region of the endosteal

talligaments stattfindet [9]. Demnach ist das dort primär nachzuweisende Kollagen vom Typ I. Dieser baut 90 % der organischen Matrix des Knochens auf. Weitere Kollagene lassen sich noch im supraalveolär gelegenen gingivalen Faserbündel nachweisen [20]. Im Vergleich zum Zahn zeigt diese Zone hinsichtlich ihrer Zusammensetzung ein vergleichbares Muster an Kollagen Typ I, III und IV auf, jedoch ist ein erhöhtes Vorkommen an Kollagen Typ V festzustellen [18]. Dieses supraalveoläre Bindegewebe scheint die Tiefenproliferation des Saumepithels zu limitieren [20]. Der durch unsere Ergebnisse dokumentierte Anstieg von Kollagen Typ IV bei der Periimplantitis kann im Zusammenhang mit der fortschreitenden Proliferation des Saumepithels und des restlichen Bindegewebes nach apikal in Verbindung stehen. So lässt sich Kollagen Typ IV als ein Hauptbestandteil der Basalmembran des Saumepithels verifizieren [4].

Während der Knochenheilung spielt die Synthese der verschiedenen Kollagene eine entscheidende Rolle. Die Knochenheilung wird durch Bildung von Osteoid und die darauf folgende Mineralisation abgeschlossen. Aufgrund ihrer supramolekularen Struktur wird die Gruppe der Kollagene in zwei Hauptgruppen unterteilt, und zwar in die fibrillären Kollagene (Kollagen Typ I, II, III, V, und XI) und in die nicht-fibrillären Kollagene (alle restlichen Kollagene). Die beiden Gruppen unterscheiden sich u. a. in der Fähigkeit zur Geweberegeneration. Der Gruppe der fibrillären Kollagene ist lediglich eine langsame Regeneration von Geweben möglich. Hingegen zeigen die nicht-fibrillären Kollagene eine heterogene Gruppe von supramolekularen Strukturen und Netzwerken, welche sie zu einer schnelleren Geweberegeneration befähigen.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass die mRNA-Expression von Kollagen Typ IV, VI, VII und XVII bei der Periimplantitis im Vergleich zur Parodontitis hoch reguliert ist und die mRNA-Expression von Kollagen Typ III und XI herunter reguliert ist. Demzufolge zeigen nur nicht-fibrilläre Kollagene (Typ IV, VI, VII und XVII) eine erhöhte Genexpression, wobei die fibrillären Kollagene (Typ III und XI) eine reduzierte Genexpression in der Periimplantitis aufweisen. Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass periimplantäres Gewebe im Vergleich zum parodontalen Gewebe zur schnelleren Geweberegeneration fähig ist und somit einem potenziell höheren Turnover unterliegt.

Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die vorliegende Arbeit unter Verwendung der Microarray-Technologie und der Real-time(RT)-PCR eindeutige Genexpressions-Unterschiede zwischen chronisch entzündeten periimplantären Geweben und chronisch entzündeten parodontalen Geweben aufzeigt. Beim Betrachten der untersuchten Gruppen der EZM und ihrer abbauenden Enzyme konnten eindeutige Unterschiede im Expressionslevel einzelner Gene festgestellt werden. Dieses lässt die Vermutung zu, dass trotz gleicher ätiologischer Genese die Periimplantitis auf genetischer Ebene klar von der Parodontitis abgrenzbar ist. Dabei lassen die gewonnenen Ergebnisse Vermutungen zu, welche Gene bei der vergleichenden Betrachtung der chronischen Parodontitis und der chronischen Periimplantitis eine gewichtigere bzw. geringere Rolle spielen

implant [9]. Accordingly, the primary collagen demonstrated there is type I. This builds up 90 % of the organic matrix of the bone. Other collagens can still be found in the supraalveolar gingival fiber bundles [20]. Compared with a tooth, the composition of this zone shows a similar pattern of collagen type I, III and IV but an increased presence of collagen type V is found [18]. This supraalveolar connective tissue appears to limit the deep proliferation of the marginal epithelium [20]. The increase in collagen type IV in periimplantitis documented by our results can be connected with the progressive proliferation of the marginal epithelium and remaining connective tissue in an apical direction. Collagen type IV is found to be a principal component of the basement membrane of the marginal epithelium [4].

Synthesis of the different collagens plays a crucial role during bone healing. Bone healing is completed by formation of osteoid and subsequent mineralization. The collagens are divided into two main groups on the basis of their supramolecular structure, namely the fibril-forming collagens (collagen type I, II, III, V and XI) and the non-fibril-forming collagens (all other collagens). The two groups differ in their capacity for tissue regeneration. Only slow tissue regeneration is possible for the group of fibril-forming collagens. In contrast, the non-fibril-forming collagens exhibit a heterogeneous group of supramolecular structures and meshes, which make them capable of faster tissue regeneration.

This study showed that the mRNA expression of collagen type IV, VI, VII and XVII is up-regulated in periimplantitis compared with periodontitis and that mRNA expression of collagen type III and XI is down-regulated. Accordingly, only non-fibril-forming collagens (type IV, VI, VII and XVII) demonstrate increased gene expression, while the fibril-forming collagens (type III and XI) have reduced gene expression in periimplantitis. This result suggests that periimplant tissue is capable of faster tissue regeneration compared with periodontal tissue and thus is subject to potentially greater turnover.

Summary and future prospects

In summary, it can be stated that this study demonstrates clear differences in gene expression between chronically inflamed periimplant tissue and chronically inflamed periodontal tissue using microarray technology and real-time (RT) PCR. When the investigated groups from the ECM and their degrading enzymes are considered, clear differences were found in the expression level of individual genes. This suggests that despite the same etiology, periimplantitis can be clearly distinguished from periodontitis on the genetic level. The results suggest which genes might play a more important or lesser role when comparing chronic periodontitis and chronic periimplantitis. Nevertheless, the results of this study can be regarded only as an indication of possible differences between the two diseases. Further studies are essential to obtain better understanding of periimplantitis, both with regard to its pathogenesis and to its similarities to and differences from periodontitis at the molecular level.

könnten. Dennoch lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit nur als ein Hinweis auf mögliche Unterschiede beider Krankheitsentitäten sehen. Es sind weitere Studien zwingend notwendig, um ein noch besseres Verständnis der Periimplantitis bezüglich ihrer Pathogenese sowie ihrer Zusammenhänge und Unterschiede zur Parodontitis auf molekularbiologischer Ebene zu erlangen.

Interessenskonflikt: Diese Arbeit wurde durch die Universitätsmedizin Göttingen (#140 1490) und die Deutsche Gesellschaft für Implantologie (DGI-13 4708 0) gefördert.

Conflict of interests: This study was supported by University Medicine Göttingen (#140 1490) and the German Society for Implantology (DGI-13 4708 0).

Korrespondenzadresse

Dr. Nikolaus Gersdorff
Kommissarischer Direktor der Abteilung Prothetik
Universitätsmedizin Göttingen
Robert-Koch-Str. 40, 37075 Göttingen
Tel.: +49 (0) 551 / 3922874, E-Mail: ngersdo@gwdg.de

Literaturverzeichnis

- Alpagot T, Bell C, Lundergan W, Chambers DW, Rudin R: Longitudinal evaluation of GCF MMP-3 and TIMP-1 levels as prognostic factors for progression of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28:353–359
- Behneke A, Behneke N: Recall und Nachsorge. In: Koeck B, Wagner W (Hrsg.): *Implantologie. Praxis der Zahnheilkunde*, 2. Auflage. Urban und Fischer, München, Jena 2004, 265–290
- Berglundh T, Lindhe J, Marinello C, Ericsson I, Liljenberg B: Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 1992;3:1–8
- Butler WT, Birkedal-Hansen H, Beegle WF, Taylor RE, Chung E: Proteins of the periodontium. Identification of collagens with the [alpha1(I)]2alpha2 and [alpha1(III)]3 structures in bovine periodontal ligament. *J Biol Chem* 1975; 250:8907–8912
- Chen HY, Cox SW, Eley BM: Cathepsin B, alpha2-macroglobulin and cystatin levels in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1998;25:34–41
- Franca LT, Carrillo E, Kist TB: A review of DNA sequencing techniques. *Q Rev Biophys* 2002;35:169–200
- Gersdorff N, Miro X, Roediger M et al.: Gene expression analysis of chronically inflamed and healthy human periodontal ligament cells in vivo. *Dent Res J* 2008;5:5–11
- Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, et al.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996;23: 1127–1132
- Jahangiri L, Hessamfar R, Ricci JL: Partial generation of periodontal ligament on endosseous dental implants in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:396–401
- Lang NP, Bragger U, Walther D, Beamer B, Kornman KS: Ligature-induced peri-implant infection in cynomolgus monkeys. I. Clinical and radiographic findings. *Clin Oral Implants Res* 1993; 4:2–11
- Leitinger B, Hohenester E: Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol* 2007; 26:146–155
- Matthews JL, Chung M, Matyas RJ: Persistent DNA contamination in competitive RT-PCR using cRNA internal standards: identity, quantity, and control. *Biotechniques* 2002;32:1412–1414, 1416–1417
- Nomura T, Ishii A, Shimizu H, et al.: Tissue inhibitor of metalloproteinases-1, matrix metalloproteinases-1 and -8, and collagenase activity levels in peri-implant crevicular fluid after implantation. *Clin Oral Implants Res* 2000; 11:430–440
- Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45
- Pjetursson BE, Tan K, Lang NP, Bragger U, Egger M, Zwahlen M: A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial dentures (FPDs) after an observation period of at least 5 years. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15:667–676
- Pozo P, Valenzuela MA, Melej C, et al.: Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Periodontol Res* 2005;40:199–207
- Roediger M, Miro X, Geffers R et al.: Profiling of differentially expressed genes in peri-implantitis and periodontitis in vivo by microarray analysis. *J Oral Biosci* 2009;51:31–45
- Romanos GE, Schroter-Kermani C, Weingart D, Strub JR: Health human periodontal versus peri-implant gingival tissues: an immunohistochemical differentiation of the extracellular matrix. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995;10:750–758
- Roos-Jansaker AM, Lindahl C, Renvert H, Renvert S: Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part II: presence of peri-implant lesions. *J Clin Periodontol* 2006;33:290–295
- Schwarz F, Becker J: Ätiologische Faktoren. In Schwarz F, Becker J (Hrsg): *Periimplantäre Entzündungen*. Berlin: Quintessenz Verlag 2007, 41–59
- Silva N, Dutzan N, Hernandez M, et al.: Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *J Clin Periodontol* 2008; 35:206–214
- Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T: Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis* 2004;10:311–318
- Strbac GD, Monov G, Cei S, Kandler B, Watzek G, Gruber R: Cathepsin K levels in the crevicular fluid of dental implants: a pilot study. *J Clin Periodontol* 2006;33:302–308
- Tonetti MS: Risk factors for osseointegration. *Periodontol* 2000 1998;17: 55–62
- Uitto VJ, Overall CM, McMulloch C: Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000 2003;32:77–104
- Verstappen J, Von den Hoff JW: Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J Dent Res* 2006; 85:12, 1074–1084
- Zavasknik-Bergant T, Turk B: Cysteine cathepsins in the immune response. *Tissue Antigens* 2006;67:349–355
- Zhou J, Windsor LJ: Porphyromonas gingivalis affects host collagen degradation by affecting expression, activation, and inhibition of matrix metalloproteinases. *J Periodont Res* 2006;41: 47–54
- Zitzmann NU, Berglundh T, Ericsson I, Lindhe J: Spontaneous progression of experimentally induced periimplantitis. *J Clin Periodontol* 2004;31:845–849