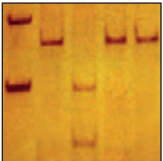


Zusammenhang zwischen Interleukin-6 -572C/G-Polymorphismus und chronischer Parodontitis



Liu Jingjin, MSc*/Guan Zemin, BSc**/Ma Xin, MSc***
 Wu Donghong, MSc****/Geng Jianhua, BSc**
 Yi Jie, BSc***/Wang Yonggong, MSc**

Genetische Polymorphismen im Interleukin-6-Gen (IL-6) stehen in Zusammenhang mit der Knochenhomöostase und Erkrankungen, die mit einem Knochenabbau einhergehen. Ziel dieser Studie war es, den Zusammenhang zwischen dem IL-6 -572C/G-Polymorphismus und dem Risiko einer chronischen Parodontitis in einer Han-chinesischen Bevölkerungsgruppe zu untersuchen. Der IL-6 -572C/G-Polymorphismus wurde mit dem Polymerase-Kettenreaktion-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-(RFLP)-Verfahren bei 93 Patienten genotypisiert, die an chronischer Parodontitis litten (Testgruppe), ebenso bei 96 Kontrollprobanden. Die DNA wurde aus dem peripheren Blut der Patienten und der Kontrollprobanden extrahiert und mit einer Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Die IL-6-Genotypen wurden mit der Gelelektrophorese identifiziert. Der IL-6 -572GG-Genotyp und das G-Allel waren in der Testgruppe häufiger vertreten als bei den Kontrollprobanden ($P < 0,05$). Im Vergleich zum CC-Genotyp betrug das Odds Ratio für chronische Parodontitis für den CG + GG-Genotyp 1,88 (95 % Konfidenzintervall, 1,04 bis 3,40; $P < 0,05$). Die Häufigkeit des -572CG + GG-Genotyps war bei der Test- und der Kontrollgruppe signifikant verschieden. Der IL-6 -572C/G-Polymorphismus könnte also in der Han-chinesischen Bevölkerungsgruppe zur Anfälligkeit für eine chronische Parodontitis beitragen. (Int J Par Rest Zahnheilkd 2010;30:293-297.)

- * Forscher, Dental College, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China.
- ** Professor, Department of Stomatology, Henan Provincial People's Hospital, Henan, China.
- *** Dozent, Department of Stomatology, Henan Provincial People's Hospital, Henan, China.
- **** Privatdozent, Department of Stomatology, Henan Provincial People's Hospital, Henan, China.

Korrespondenz an: Dr. Guan Zemin, Department of Stomatology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan, China 450003; Fax: 0371-65964376; E-Mail: gzm195005@126.com

In der Han-chinesischen Bevölkerung ist die Parodontitis sehr verbreitet. Sie ist eine wichtige Ursache für den Zahnverlust bei Erwachsenen. Es wird zwar angenommen, dass das Fortschreiten einer Parodontalerkrankung durch mikrobielle und andere Umweltfaktoren in Gang gesetzt und moduliert wird, aber es gibt deutliche Hinweise darauf, dass die Genetik bei der Anfälligkeit für eine Parodontalerkrankung und ihr Fortschreiten eine wichtige Rolle spielt¹. Die genetische Grundlage der chronischen Parodontitis wurde allerdings noch nicht eindeutig definiert.

Interleukin-6 (IL-6) ist ein multifunktionelles Zytokin, das bei der Knochenabsorption und beim Kollagenabbau sowie bei entzündlichen Reaktionen eine Rolle spielt²⁻⁶. Genetische Polymorphismen im IL-6-Gen stehen auch in Zusammenhang mit der Knochenhomöostase. Die polymorphen IL-6-Allele können unterschiedliche Mengen von IL-6-mRNA produzieren. Der polymorphe Bereich in der Position -572 des IL-6-Gens wurde umfassend erforscht und es gibt in Bevölkerungsstudien Berichte über einen Zusammenhang zwischen dem IL-6-Genotyp und dem Osteocalcinspiegel sowie über die Zusammenhänge mit der Knochenmineral-

dichte. Die entzündliche Reaktion ist eine der wichtigsten Komponenten der Pathogenese der chronischen Parodontitis und der Knochenabbau ist eine der wesentlichen pathologischen Veränderungen, die mit ihr einhergehen. Deshalb ist IL-6 ein Kandidatengen für die Untersuchung der Anfälligkeit für eine chronische Parodontitis.

Es wurden allerdings nur in begrenztem Umfang Studien zur Untersuchung der Rolle von genetischen Polymorphismen im IL-6-Gen durchgeführt. Genetische Polymorphismen im IL-6-Gen können als Marker von Nutzen sein, um die Anfälligkeit für eine Parodontitis zu diagnostizieren. Ziel dieser Studie war es, den Zusammenhang zwischen dem -572C/G-Polymorphismus des IL-6-Gens und dem Risiko einer chronischen Parodontitis in einer Han-chinesischen Bevölkerungsgruppe zu untersuchen.

Material und Methode

Studienpopulation

Die Studienpopulation bestand aus 93 Han-chinesischen Patienten mit einer chronischen Parodontitis (Testgruppe), die an die Klinik für Parodontologie des Henan Provincial People's Hospital überwiesen worden waren, und 96 gesunden Han-Chinesen, die für den Vergleich als Kontrolle (Kontrollgruppe) dienten. Die Probanden nahmen an der Studie teil, nachdem sie die Einwilligung nach Information unterzeichnet hatten. Das Studienprotokoll war vom Ethikkomitee des Henan Provincial People's Hospital geprüft und genehmigt worden. Die Einschlusskriterien besagten, dass alle Probanden mindestens 14 natürliche Zähne haben mussten. Außerdem mussten sie der Altersgruppe

von 25 bis 65 angehören, und die Klassifizierung der chronischen Parodontitis musste nach den von Armitage et al.⁷ beschriebenen Standards erfolgt sein. Die Testgruppe umfasste 52 Männer und 41 Frauen, die Kontrollgruppe 50 Männer und 46 Frauen. Das Durchschnittsalter betrug in der Testgruppe 48,6 Jahre, in der Kontrollgruppe 45 Jahre. Alle Teilnehmer waren Nichtraucher. Kein Teilnehmer hatte in der Vergangenheit oder aktuell Anzeichen einer systemischen Erkrankung gezeigt oder eine kieferorthopädische Apparatur getragen.

Analyse des IL-6 -572-Polymorphismus

Jedem Teilnehmer wurden 2 ml peripheres Blut entnommen. Die Leukozyten und Monozyten wurden mit einem speziellen Medium aus dem peripheren Blut separiert. Die DNA-Extraktion erfolgte mit einer Phenol-Chloroform-Methode.

Die IL-6-Sequenzen wurden mit einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die Genotypen für den -572G/C-Polymorphismus wurden anhand von Primern mit den Sequenzen 5'-GGAGACGCC-TTG-AAGTAACTGC-3' und 5'-GAGTTT-CCTCTGACTCCATC-GCAG-3'⁸ ermittelt, um ein PCR-Fragment von 163 bp zu generieren (Abb. 1). Dieses PCR-Produkt wurde anschließend mit dem Mbil-Restriktionsenzym verdaut. Die PCR-Mischung bestand aus 5 µl genomischer DNA, 12,5 µl 2 x Mastermix (Tiangen Bio), 0,5 µl von jedem Primer und 6,5 µl bidestilliertem Wasser. Das Thermocycling erfolgte in einem Thermocycler. Es bestand aus der anfänglichen Denaturierung bei 94 °C für drei Minuten, gefolgt von 35 Zyklen zu 40 Sekunden bei 94 °C, 40 Sekunden bei 55 °C, einer Minute bei 72 °C

Abb. 1 2 % Agarose-Gelelektrophorese, mit Ethidiumbromid gefärbt. Als Marker wurde DL2000 verwendet. Das PCR-Produkt war 163 bp.

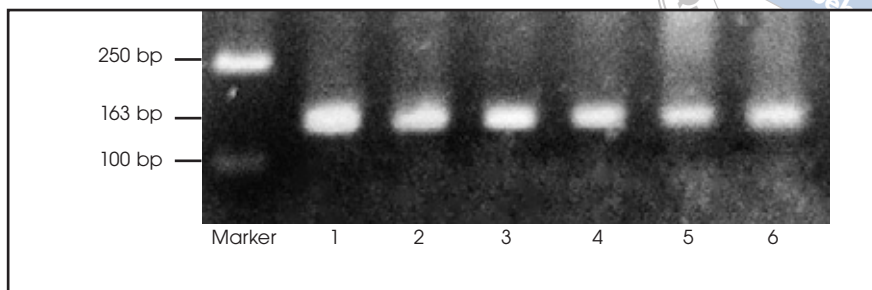
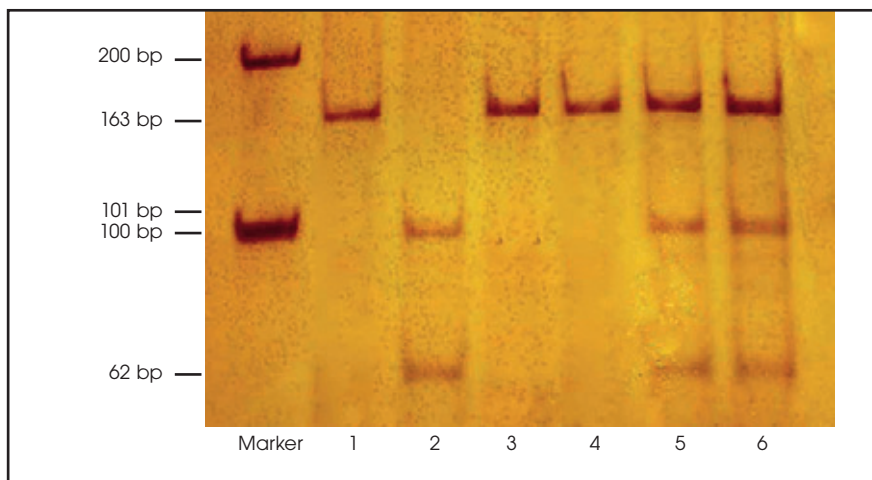


Abb. 2 10 % Acrylamid-Gelelektrophorese, mit Silber gefärbt. Der Marker ist DL100. Die Spuren 1, 3 und 4 enthalten Proben mit einem CC-Genotyp; die Spuren 5 und 6 enthalten Proben mit dem CG-Genotyp und Spur 2 enthält eine Probe mit dem GG-Genotyp. Die Spaltung mit Mbil führte zur Produktion von multiplen Fragmenten jedes Genotyps. Proben mit einem Fragment von 163 bp sind CC-; Proben mit drei Fragmenten der Größe 163 bp, 101 bp und 62 bp sind CG-; und Proben mit zwei Fragmenten der Größe 101 bp und 62 bp sind GG-Genotypen.



und der abschließenden Extension für fünf Minuten bei 72 °C. Anschließend wurden die PCR-Fragmente über Nacht von Mbil bei 37 °C verdaut und danach mittels Elektrophorese auf einem 10 % Polyacrylamidgel, das dann mit Silber gefärbt wurde, separiert (Abb. 2).

Ergebnisse

Bestimmung der Genotypen

In der Test- und der Kontrollgruppe wurden drei mögliche Genotypen

gefunden. Am häufigsten war der CC-Genotyp, gefolgt vom CG-Genotyp und vom GG-Genotyp. Die Häufigkeit des -572-Genotyps betrug bei der Testgruppe für CC 52,69 %, für CG 40,86 % und für GG 6,45 %. Bei der Kontrollgruppe betrug die Genotyphäufigkeit für CC 67,71 %, für CG 31,25 % und für GG 1,08 %. Die Verteilung der verschiedenen Genotypen stimmte in jeder Gruppe mit dem Hardy-Weinberg-Equilibrium überein ($P > 0,05$). Es gab allerdings signifikante Unterschiede in der Verteilung der IL-6-Genotypen zwischen den beiden

Gruppen ($P < 0,05$, Tabelle 1). Personen mit einer Form des G-Allels (GC- oder GG-Genotyp) waren 1,88-mal anfälliger für eine Parodontalerkrankung (Odds Ratio: 1,88; 95 % Konfidenzintervall: 1,12 bis 3,03), und die Chance für eine chronische Parodontitis nahm in dem Umfang zu, wie der prozentuale Anteil der G-Allele zunahm (χ^2 , 6,14; $P < 0,05$) (Tabelle 2).

In der Testgruppe betrug die Häufigkeit der G-Allele 26,88 % und der C-Allele 73,12 %. In der Kontrollgruppe waren es 16,67 % bzw. 83,33 %. Sowohl der IL-6 -572GG-Genotyp

Tabelle 1 Genotyphäufigkeit von IL-6 -572 in der Test- u. Kontrollgruppe

Genotyp	Test (%)	Kontrolle (%)	Odds Ratio	95% KI	P
CC	49 (52,69)	65 (67,71)	1,00		
CG	38 (40,86)	30 (31,25)			
GG	6 (6,45)	1 (1,08)	1,88	1,04–3,40	0,035
Gesamt	93 (100)	96 (100)			

Trend Test, $P < 0,05$.**Tabelle 2** Allelhäufigkeit von IL-6 -572 in der Test- u. Kontrollgruppe

Gruppe	Allel (%)		Odds Ratio	95% KI	P
	G	C			
Test	50 (26,88)	136 (73,12)	1,84	1,12–3,03	0,016
Kontrolle	32 (16,67)	160 (83,33)			

als auch das G-Allel waren in der Testgruppe häufiger vertreten in der Kontrollgruppe ($P < 0,05$). Das -572G-Allel war in beiden Gruppen weniger häufig vertreten als das C-Allel. Bei der Häufigkeit des G- und des C-Allels gab es einen statistischen Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen ($P < 0,05$). Im Vergleich zum C-Allel betrug das Odds Ratio des G-Allels 1,84.

Diskussion

Die chronische Parodontitis (CP) ist eine Erkrankung, die durch mikrobielle Plaque, immunologische Wirtsreaktionen, Umweltfaktoren und andere, unbekannte Faktoren ausgelöst wird. Die Autoren haben bereits früher den Nachweis des gehäuftten Auftretens von CP in Fami-

lien erbracht und gezeigt, dass die Schwere einer CP eng mit genetischen Faktoren zusammenhängt⁹.

Unterschiedliche Gene können unterschiedliche Aspekte einer Erkrankungspathologie beeinflussen¹⁰. Das humane IL-6-Gen ist auf 7p (15-21) lokalisiert. Es besteht aus fünf Introns und vier Exons. Genetische Polymorphismen wurden in der Promoter-Region in den Positionen -597G/A, -572G/C, -373AnTn und -174G/C11 gefunden. Alle diese Polymorphismen könnten die Sequenz verändern, an die Transkriptionsfaktoren sich binden. Sie könnten also potenziell die Genexpression verstärken oder reduzieren, und dies könnte zur Anfälligkeit für eine bestimmte Erkrankung beitragen¹².

In dieser Studie wurde der Zusammenhang zwischen Polymorphis-

men im IL-6 -572-Bereich und CP bei einer Han-chinesischen Bevölkerungsgruppe untersucht, und die Genotypen von 93 CP-Patienten (Testgruppe) wurden mit denen von 96 gesunden Kontrollprobanden verglichen. Dazu wurde ein Polymerase-Kettenreaktion-RFLP-Verfahren verwendet. Diese Ergebnisse zeigen, dass zwischen CP und dem genetischen Polymorphismus im IL-6 -572-Bereich ein Zusammenhang besteht und dass das -572-G-Allel ein Risikofaktor für CP sein kann.

Alle Teilnehmer dieser Studie waren Nichtraucher. Das war deshalb wichtig, weil es bekannte Interaktionen zwischen einer Parodontalerkrankung und dem Rauchen gibt. Wenn also Raucher und Nichtraucher teilgenommen hätten, wären die Ergebnisse möglicherweise verfälscht gewesen. Diese Ergeb-

nisse unterstützen die Hypothese, dass an der Parodontalpathogenese unterschiedliche Faktoren beteiligt sind.

Die in dieser Studie festgestellte Häufigkeit von IL-6-Genotypen und Allelen unterscheidet sich leicht von den Ergebnissen von Holla et al.¹³. In jener Studie war das C-Allel protektiv und die Autoren konnten bei einer tschechischen Population keinen CC-Genotyp finden. Diese Unterschiede bei der Verteilung der Genotypen können durch die ethnische Zugehörigkeit bedingt sein. Sie können aber auch darauf hinweisen, dass es bei der Ätiologie der Parodontitis unterschiedliche zugrundeliegende Wirtsmechanismen gibt. Insgesamt deuten die Ergebnisse jener und der aktuellen Studie darauf hin, dass Polymorphismen im IL-6-Gen verwendet werden können, um zwischen CP-Patienten und gesunden Probanden zu differenzieren.

Schlussfolgerungen

Es wurde festgestellt, dass 32,3 % der -572G-Träger keine CP hatten. Dies zeigte, dass ein Risikofaktor wie der IL-6-Genotyp vorhanden sein kann, ohne dass eine klinische Erkrankung auftritt. Personen, die die Risiko-Allele in sich tragen, müssen also nicht unbedingt eine schwere Parodontitis haben. Allerdings sollten sie unter zahnärztlicher Beobachtung stehen, um dem Auftreten einer CP vorzubeugen. Es kann von diagnostischem und therapeutischem Wert sein, die genetischen Grundlagen der Anfälligkeit für eine Parodontalerkrankung zu kennen.

Danksagung

Diese Forschungsarbeit wurde mit Mitteln des Forschungsfonds des Henan Provincial Health Department's Periodontal Research Fund finanziert.

Literatur

1. Michalowicz BS, Aeppli DP, Virag JG, et al. Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol* 1991;62:293-299.
2. Naruishi K, Takashiba S, Nishimura F, et al. Impairment of gingival fibroblast adherence by IL-6/sIL-6R. *J Dent Res* 2001;80:1421-1424.
3. Ling Y, Mingzhen X, Zhongying N. Experimental study on the growth of human pulpal cells and periodontal ligament cells by effects of IL-6. *Chinese J Conserv Dent* 1998;8:232-233.
4. O'Keefe RJ, Teot LA, Singh D, Puzas JE, Rosier RN, Hicks DG. Osteoclasts constitutively express regulators of bone resorption: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Lab Invest* 1997;76:457-465.
5. de la Mata J, Uy HL, Guise TA, et al. Interleukin-6 enhances hypercalcemia and bone resorption mediated by parathyroid hormone-related protein in vivo. *J Clin Invest* 1995;95:2846-2852.
6. Omori K, Naruishi K, Nishimura F, Yamada-Naruishi H, Takashiba S. High glucose enhances interleukin-6-induced vascular endothelial growth factor 165 expression via activation of gp130-mediated p44/42 MAPK-CCAAT/enhancer binding protein signaling in gingival fibroblasts. *J Biol Chem* 2004;279:6643-6649.
7. Armitage GC, Wu Y, Wang HY, Sorrell J, di Giovine FS, Duff GW. Low prevalence of a periodontitis-associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage. *J Periodontol* 2000;71:164-171.

8. Brull DJ, Montgomery HE, Sanders J, et al. Interleukin-6 gene -174g>c and -572g>c promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1458-1463.
9. Zemin G. Family survey of periodontitis (abstract). *J Huaxi Dent* 1999;3:217.
10. Inagaki K, Krall EA, Fleet JC, Garcia RI. Vitamin D receptor alleles, periodontal disease progression, and tooth loss in the VA dental longitudinal study. *J Periodontol* 2003;74:161-167.
11. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000;275:18134-18144.
12. Müller-Steinhardt M, Fricke L, Müller B, Ebel B, Kirchner H, Härtel C. Cooperative influence of the interleukin-6 promoter polymorphisms -597, -572 and -174 on long-term kidney allograft survival. *Am J Transplant* 2004;4:402-406.
13. Holla LI, Fassmann A, Stejskalová A, Zhojil V, Vaněk J, Vacha J. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2004;75:30-36.