

**Aus der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie  
des Universitätsklinikums Halle (Saale)**  
(Direktor: Prof. Dr. med. dent. Hans-Günter Schaller)

**Die Polymorphismen Arg677Trp und Arg753Gln im TLR-2-Gen und der  
-94 ins/del ATTG Promotorpolymorphismus im NF- $\kappa$ B-Gen  
und deren Einfluss auf Parodontitis sowie die subgingivale Keimbesiedlung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)  
für das Fachgebiet Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Lisa Anne Waltraud Hierse

geboren am 08.09.1984 in Brandenburg

Betreuer: PD Dr. med. dent. Stefan Reichert

Gutachter:

1. PD Dr. med. dent. Stefan Reichert (Universität Halle-Wittenberg)
2. Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Ingo Hansmann (Universität Halle-Wittenberg)
3. Prof. Dr. med. dent. Dr. med. Søren Jepsen, M.S. (Universität Bonn)

Datum der öffentlichen Verteidigung: 02.03.2011



## Referat und bibliographische Beschreibung

Primärer ätiologischer Faktor der Parodontitis ist die mikrobielle Plaque. Ihre Pathogenese wird jedoch auch durch die individuelle wirtseigene Immunantwort beeinflusst. So stimulieren zum Beispiel bestimmte Zellwandkomponenten bakterieller Parodontopathogene unter anderem den transmembranös gelegenen Toll-like-Rezeptor-2 (TLR-2). Dieser aktiviert intrazellulär den nukleären Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), wodurch die Expression von Genen der Immunantwort getriggert wird. Diese Gene kodieren z. B. für proinflammatorische Zytokine, die gewebeabbauende Zellen aktivieren und daher auch mit dem Abbau von parodontalem Gewebe assoziiert sind. Die Aktivität des TLR-2 und Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B wird unter anderem von Varianten ihrer kodierenden Gene beeinflusst. Daher bestand das erste Ziel dieser Studie darin, eine mögliche Relation von Polymorphismen in den Genen für TLR-2 (Arg677Trp und Arg753Gln) und NF- $\kappa$ B (-94 ins/del ATTG) zur Parodontitis zu evaluieren. Ein weiteres Ziel war es zu überprüfen, ob auch ein Zusammenhang zum subgingivalen Nachweis von parodontalen Markerbakterien besteht.

In dieser Studie wurden 141 Parodontitispatienten (aggressiv n=78, chronisch n=63) und 81 parodontitisfreie Kontrollprobanden untersucht. Die Polymorphismen im TLR-2-Gen (Arg677Trp, Arg753Gln) und NF- $\kappa$ B-Gen (-94 ins/del ATTG) wurden durch die molekularbiologischen Methoden Polymerase-Ketten-Reaktion und Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus bzw. Fragment-Längen-Analyse bestimmt. Der Nachweis der parodontalen Leitkeime *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* und *T. denticola* aus gepoolten subgingivalen Plaqueproben erfolgte mittels DNA-STRIP®-Technologie (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland).

Unter allen Studienteilnehmern konnte nur der Arg/Arg-Wildtyp des Arg677Trp-Polymorphismus im TLR-2-Gen nachgewiesen werden. Für den Arg753Gln-Polymorphismus konnte keine Assoziation zur Parodontitis und Keimbesiedlung gezeigt werden. Dagegen war der del/del-Genotyp des -94 ins/del ATTG Polymorphismus im NF- $\kappa$ B-Gen sowohl zur aggressiven Parodontitis als auch zum Nachweis von *A. actinomycetemcomitans* assoziiert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Genpolymorphismen Arg677Trp und Arg753Gln im TLR-2-Gen keine Risikoindikatoren für Parodontitis und die subgingivale Keimbesiedlung darstellen. Dagegen ist der del/del-Genotyp des -94 ins/del ATTG Polymorphismus im NF- $\kappa$ B-Gen ein Risikoindikator sowohl für aggressive Parodontitis als auch die Infektion mit *A. actinomycetemcomitans*.

Hierse, Lisa: Die Polymorphismen Arg677Trp und Arg753Gln im TLR-2-Gen und der -94 ins/del ATTG Promotorpolymorphismus im NF- $\kappa$ B-Gen und deren Einfluss auf Parodontitis sowie die subgingivale Keimbesiedlung  
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2010

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

1.1	Einführung	1
1.2	Parodontitis	
1.2.1	Grundzüge der Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis	2
1.2.2	Mikrobiologie der Parodontitis	4
1.2.3	Immunologische Wirtsreaktion bei der Parodontitis	7
1.3	Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B	
1.3.1	Die Rolle von NF- $\kappa$ B in der Immunantwort	8
1.3.2	Die NF- $\kappa$ B-Familie	10
1.3.3	Die I $\kappa$ B-Familie	11
1.3.4	Aktivatoren und Inhibitoren von NF- $\kappa$ B	12
1.3.5	Aktivierungskaskade von NF- $\kappa$ B	12
1.4	Toll-like-Rezeptoren	
1.4.1	Entdeckung der Toll-like-Rezeptoren	14
1.4.2	Liganden von Toll-like-Rezeptoren	14
1.4.3	Toll-like-Rezeptor-2	16
1.4.4	Aktivierung von TLR-2 durch parodontopathogene Bakterien	16
1.4.5	Aktivierung von NF- $\kappa$ B über den MyD88-abhängigen TLR-2-Signalweg	18
1.5	Genpolymorphismen	19

## 2. Zielstellung 21

## 3. Materialien und Methoden

3.1	Patienten	
3.1.1	Auswahl der Patienten	23
3.1.2	Einschlusskriterien	23
3.1.3	Ausschlusskriterien	24
3.1.4	Erhebung der klinischen Daten	24
3.2	Methoden	
3.2.1	Genomische Untersuchungen	25
3.2.2	Subgingivale Bestimmung parodontopathogener Keime	30
3.2.3	Statistische Auswertung	32

## **4. Ergebnisse**

4.1	Statistische Untersuchungen der Studienprobanden	
4.1.1	Betrachtung demografischer Parameter in Abhängigkeit von der parodontalen Diagnose	34
4.1.2	Vergleich klinisch-parodontologischer Daten unter Berücksichtigung der parodontalen Diagnose	34
4.1.3	Auftreten subgingivaler Parodontopathogene in den einzelnen parodontalen Diagnosegruppen	35
4.2	Untersuchung zum Arg677Trp-Polymorphismus im TLR-2-Gen	36
4.3	Statistische Untersuchungen zum Einfluss des Arg753Gln- Polymorphismus im TLR-2-Gen	
4.3.1	Genotyp- und Allelverteilung des Arg753Gln-Polymorphismus unter Berücksichtigung der parodontalen Diagnose	36
4.3.2	Vergleich der Genotypen des Arg753Gln-Polymorphismus hinsichtlich der demografischen Daten	37
4.3.3	Vergleich der Genotypen des Arg753Gln-Polymorphismus unter Berücksichtigung der klinisch-parodontologischen Daten	38
4.3.4	Auftreten subgingivaler Bakterien unter Berücksichtigung der Genotypen des Arg753Gln-Polymorphismus	40
4.3.5	Binäre logistische Regression zur Beurteilung der Einflussnahme des Arg/Gln-Genotyps auf die Keimbesiedlung mit <i>A. actino- mycetemcomitans</i> und Bakterien des roten Komplexes im multivariaten Modell	41
4.4	Statistische Untersuchungen zum Einfluss des -94 ins/del ATTG Promotorpolymorphismus im NF-κB-Gen	
4.4.1	Genotyp- und Allelverteilung des -94 ins/del ATTG Poly- morphismus unter Berücksichtigung der parodontalen Diagnose	42
4.4.2	Demografische Daten in Abhängigkeit von der Genotyp- verteilung des -94 ins/del ATTG Polymorphismus	43
4.4.3	Klinisch-parodontologische Daten im Zusammenhang mit der Genotypverteilung des -94 ins/del ATTG Polymorphismus	44
4.4.4	Auftreten subgingivaler Bakterien unter Berücksichtigung der Genotypen des -94 ins/del ATTG Polymorphismus	46
4.4.5	Binäre logistische Regression zur Beurteilung des Einflusses des del/del-Genotyps für das Auftreten von aggressiver Parodontitis	47

4.4.6 Binäre logistische Regression zur Beurteilung des Einflusses des del/del-Genotyps auf eine subgingivale Besiedelung mit <i>A. actinomycetemcomitans</i>	48
4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse	
4.5.1 Arg677Trp-Polymorphismus im TLR-2-Gen	49
4.5.2 Arg753Gln-Polymorphismus im TLR-2-Gen	49
4.5.3 -94 ins/del ATTG Promotorpolymorphismus im NF-κB-Gen	49
<b><u>5. Diskussion</u></b>	
5.1 Einflussnahme genetischer Faktoren auf die Pathogenese der Parodontitis	51
5.2 Parodontaler Befund und Klassifizierung der Probanden	51
5.3 Klinische Daten der Probanden	52
5.4 Subgingivale bakterielle Besiedelung der Probanden	53
5.5 Vergleich zu anderen genetischen Assoziationsstudien	53
5.6 Auswertung des TLR-2 Arg677Trp-Polymorphismus	54
5.7 Auswertung des TLR-2 Arg753Gln-Polymorphismus	56
5.8 Auswertung des -94 ins/del ATTG Promotorpolymorphismus des NF-κB-Gens	59
5.9 Schlussfolgerung und Ausblick	61
<b><u>6. Zusammenfassung</u></b>	62
<b><u>7. Literaturverzeichnis</u></b>	64
<b><u>8. Anhang Chemikalien und Geräte</u></b>	
8.1 Chemikalien	76
8.2 Geräte	78
<b><u>9. Thesen</u></b>	79

## Abkürzungsverzeichnis

ATTG	Basen Adenin, Thymin, Guanin
<i>A. a.</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AP	aggressive Parodontitis
API	approximaler Plaque-Index
Arg	Arginin
bakt.	bakteriell
bp	Basenpaare
BOP	Bleeding on probing (Blutungsindex)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CAL	clinical attachmentlost (klinischer Attachmentverlust)
CD	cluster of differentiation
CP	chronische Parodontitis
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
del	Deletion
dest.	destilliert
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
g	Gramm
G	parodontitisfreie Kontrollgruppe
Gln	Glutamin
H <sub>2</sub> O	Wasser
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
Ig	Immunglobulin
IκB	Inhibitor κB
IKK	IκB-Kinase-Komplex
IL	Interleukin

INF	Interferon
ins	Insertion
IRAK	IL-1R-Associated Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leuzin-reiche Region
µl	Mikroliter
M	Mol
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteinase
MyD88	myeloid differentiation protein 88
n	Anzahl der Studienprobanden
NaBH <sub>4</sub>	Natriumborhydrid
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NEMO	NF-κB essential modulator
NES	nukleäres Exportsignal
n.s.	nicht signifikant
ng	Nanogramm
NF-κB	nukleärer Faktor-κB
NIK	NF-κB induzierende Kinase
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
nm	Nanometer
OR	Odds Ratio
PAMP	pathogen associated molecular patterns
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PD	pocket depth (Sondiertiefe)
<i>P. g.</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PGE	Prostaglandin
<i>P. i.</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
PNM	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PRR	pattern recognition receptor

RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
S	Gesamtstudiengruppe
SD	Standardabweichung
Ser	Serin
SNP	single nucleotid polymorphism
SSCP	single strand conformation polymorphism
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAB	TAK1 Binding Protein
TAK 1	transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
<i>T. d.</i>	<i>Treponema denticola</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
<i>T. f.</i>	<i>Tannerella forsythensis</i>
TGF	transforming growth factor
TIR	Toll-like/IL-1-Rezeptor
TIRAP	TIR-containing adaptor protein
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF 6	TNF Receptor-associated Factor 6
Tris-HCl	Tris-Hydroxymethylaminomethan-Chlorswasserstoff
Trp	Tryptophan
U	Units (Einheiten)
UV	Ultraviolett
V	Volt
vs.	versus
W	Watt

## 1. Einleitung

### 1.1 Einführung

Parodontitis als chronisch entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparats wird primär durch bakterielle Plaque verursacht. Jedoch gibt es diverse wirtsspezifische Faktoren, die entscheidend für die Entwicklung und Progression einer Parodontitis sind. Neben den nicht-genetischen Risikofaktoren wie Rauchen, negativem Stress, sozialem Umfeld und bestimmten Allgemeinerkrankungen, die wie z. B. beim Diabetes mellitus mit einer Beeinträchtigung des Immunsystems einhergehen, wird vermutet, dass genetische Risikofaktoren die Pathogenese der Parodontitis beeinflussen können. Von besonderem Interesse sind hierbei schon seit langem genetische Varianten von Genen, die für proinflammatorische Zytokine als Initiatoren des parodontalen Gewebeabbaus kodieren. 1997 konnte erstmals von Kornman et al. ein Zusammenhang von Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphism, SNP) in den Genen für Interleukin (IL)-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  und einem besonders schweren Verlauf der chronischen Parodontitis bei Nichtrauchern nachgewiesen werden (Kornman et al., 1997a). Diese Assoziation könnte auf einer überschießenden IL-1-Produktion durch Entzündungszellen als Reaktion auf bakterielle Lipopolysaccharide beruhen (Pociot et al., 1992).

Der Toll-like-Rezeptor-2 (TLR-2) dient unter anderem der Erkennung und Internalisierung parodontopathogener bakterieller Zellwandkomponenten. Die Aktivierung dieses Rezeptors löst intrazellulär eine Kaskade aus, die über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B zur Synthese entzündungsfördernder Immunmediatoren wie TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  führt und so den Verlauf der Parodontitis entscheidend beeinflusst.

Der TLR-2 und der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B spielen somit eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Parodontitis. Weiterhin sind Genpolymorphismen bekannt, die die Funktion bzw. Expression des TLR-2 und NF- $\kappa$ B beeinflussen. Dies ist klinisch relevant, denn in verschiedenen Studien konnten bereits Assoziationen des Arg677Trp- und Arg753Gln-Polymorphismus im Gen für TLR-2 und des -94 ins/del ATTG Promotorpolymorphismus im NF- $\kappa$ B-Gen zu verschiedenen Infektionserkrankungen gezeigt werden. Das lässt vermuten, dass diese Polymorphismen auch indikativ für Parodontitis bzw. die subgingivale Bakterienkolonisation sind.

Ziel der vorliegenden Studie war es deshalb zu überprüfen, ob eine Assoziation dieser Genpolymorphismen zur aggressiven und/oder chronischen Parodontitis vorliegt. Als weiteres Studienziel sollte untersucht werden, ob es eine Relation der verschiedenen Genotypen zum Nachweis der fünf parodontalen Markerbakterien *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A. a.), *Porphyromonas gingivalis* (P. g.), *Treponema denticola* (T. d.), *Tannerella forsythia* (T. f.) und *Prevotella intermedia* (P. i.) gibt. Die Auswertung der Studienergebnisse sollte

Aufschluss darüber geben, ob die Polymorphismen als Risikoindikatoren für Parodontitis und/oder die subgingivale Kolonisation von parodontalen Markerbakterien von Bedeutung sind.

## **1.2. Parodontitis**

### **1.2.1 Grundzüge der Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis**

Die plaqueverursachte Gingivitis beschränkt sich lediglich auf das marginale und suprakrestale Gewebe, wohingegen bei der Parodontitis auch tiefer liegende Strukturen des Zahnhalteapparates betroffen sind. Hier kommt es zum entzündlichen Abbau der Gingiva, des Wurzelzements, des Desmodonts und des Alveolarknochens.

Parodontitis ist bekanntermaßen eine multifaktorielle Erkrankung. Neben der Quantität und Qualität der subgingivalen Plaque als primäre Risikofaktoren sind genetische und erworbene (exogene und endogene) Risikofaktoren von krankheitsmodulierender Bedeutung. Hinsichtlich der therapeutischen Beeinflussbarkeit lassen sich die Faktoren auch in veränderbare (u. a. Rauchen, Stress, soziales Umfeld) und nicht veränderbare Risikofaktoren (Genetik, ethnische Zugehörigkeit, Alter, Geschlecht) einteilen (Genco, 1996; Salvi et al., 1997; Van Dyke und Sheiresh, 2005). Risikofaktoren beeinflussen u. a. die individuelle Wirtsreaktion und damit den Beginn und Verlauf der Erkrankung. So ist bekannt, dass die Immunantwort auf Parodontopathogene ausbleiben, verzögert oder überschießend sein kann (Ranney, 1991).

In der Mundhöhle leben über 19000 Phylotypen (Keijser et al., 2008). Nur ein Teil dieser Bakterien ist parodontopathogen (Socransky und Haffajee, 1994). Der mikrobielle Befund kann von Patient zu Patient differieren, aber auch innerhalb einer Mundhöhle variabel sein (Slots, 1977, 1979).

Die Bakterien besitzen zwar durch ihre vielfältigen Virulenzfaktoren auch gewebsschädigendes Potenzial, der klinisch feststellbare Knochen- und Bindegewebsabbau geht jedoch vorwiegend auf die Entzündungsreaktion des Wirts als Teil der Immunantwort auf die bakterielle Infektion zurück (Page et al., 1997; Page und Kornman, 1997).

Entscheidend für die destruktive Potenz der pathogenen Bakterien sind ihr prozentualer Anteil an der gesamten parodontal vorherrschende Keimflora und die von ihnen produzierten gewebeabbauenden Metaboliten. Orale Bakterien können durch bestimmte Enzyme extrazelluläre Wirtsproteine und andere Moleküle abbauen, wodurch sie sich Nahrung für ihren Stoffwechsel und ihr Wachstum sichern (Moore und Moore, 1994). Darüber hinaus produzieren sie toxische Metabolite wie Ammoniak, Schwefelwasserstoff und Buttersäure. Mittels proteolytischer Enzyme, vor allem Peptidasen, bauen die Bakterien das Kollagen und Elastin parodontaler Strukturen ab (Socransky und Haffajee, 1994). Virulent wirkende Bestandteile gram-positiver Kokken und Stäbchen (u. a. Streptokokken, Actinomyceten), die als parodontopathogene Erstbesiedler gelten, sind vor allem ihre Zellwandkomponenten Peptidoglykan, Teichonsäure und aus der Mureinschicht ragende Proteine. Gram-negative

Bakterien, die mit zunehmender Tiefe die subgingivale Tasche besiedeln, vermitteln ihre virulente Wirkung über Zellwandkomponenten wie das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS). Durch bakterielle Stimulation kommt es im parodontalen Gewebe zur Freisetzung von biologisch aktiven Substanzen, die der Immunabwehr dienen (Interferon- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, Sauerstoff- und Stickstoffradikale, Arachidonsäuremetaboliten) (Page, 1991; Page et al., 1997).

Durch die Vielzahl von Stoffwechselprodukten provoziert die bakterielle Flora das Gewebe zur verstärkten Exsudation und Migration von zur Phagozytose befähigten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) in den Sulkus. Ihre Migration aus parodontalen Blutgefäßen wird durch die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ELAM-1 (endothelial leucocyte adhesion molecule-1) und ICAM-1 (intercellular attachment molecule-1) ermöglicht und durch die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen verstärkt (Moughal et al., 1992). Nach Adhäsion der PMNs an die Gefäßwände kommt es zur Leukodiapedese (Kornman et al., 1997b). Die Leukozyten wandern dann entlang eines u. a. durch das Chemokin IL-8 aufgebauten chemischen Gradienten (Bickel, 1993) durch das Saumepithel hindurch und bilden einen Leukozytenwall zwischen Verbindungsepithel und Plaque. Zur Gewebsdestruktion kommt es vor allem durch die Abwehr- und Entzündungsreaktion des Wirts auf antigene Bakterienbestandteile. Abwehrzellen, aber auch Epithelzellen und Fibroblasten, reagieren mit einer erhöhten Sekretion entzündungsfördernder Zytokine, wobei IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  eine wichtige Rolle spielen, da sie die Freisetzung von IL-6 und weiterer Entzündungsmediatoren fördern. Der destruktive Effekt des von Makrophagen produzierten Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) entsteht indirekt durch die Aktivierung mehrkerniger Osteoklasten und der Hemmung von Osteoblasten, wodurch die Gewebemöostase in Richtung Knochenabbau verschoben wird. Weiterhin bewirken IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  die Produktion von Matrixmetalloproteinasen (MMP) durch Makrophagen und Fibroblasten, womit die Auflösung von extrazellulärer Matrix, Bindegewebe und Knochen getriggert wird (Page et al., 1997). Durch das Entzündungsgeschehen kommt es bei Unterlassung einer parodontalen Therapie zum weiteren Abbau des Zahnhalteapparates. Dies kann im Folgenden bis zum Zahnverlust führen.

Die chronische (CP) und die aggressive Parodontitis (AP) werden als verschiedene Erkrankungen angesehen, da sie sich durch das Alter bei Erkrankungsbeginn, die Progression des Attachmentverlustes, die Konfiguration des Knochenabbaus sowie die Plaqueakkumulation voneinander unterscheiden (Armitage, 1999). Die lokalisierte und generalisierte Form der CP teilen viele klinische, epidemiologische und ätiologische Charakteristika, so dass diese beiden Entitäten zwei klinische Manifestationen derselben Erkrankung darstellen.

Für die lokalisierte und generalisierte aggressive Parodontitis ist bislang allerdings noch nicht geklärt, ob es sich um verschiedene phänotypische Varianten einer Erkrankung, verschiedene Stadien einer Erkrankung oder um zwei eigenständige Parodontitisformen handelt (Tonetti und

Mombelli, 1999). Für die letzte These spricht, dass es Unterschiede in verschiedenen immunologischen und genetischen Parametern zwischen beiden Formen der aggressiven Parodontitis gibt. In der vorliegenden Studie wurden deshalb nur Patienten mit generalisierter aggressiver Parodontitis eingeschlossen und strikt von Patienten mit lokalisierter aggressiver Parodontitis getrennt.

Im Vergleich zur CP, die die häufigste Parodontitisform darstellt, tritt die AP wesentlich seltener auf (Albandar, 2005). Weiterhin konnte für die AP im Vergleich zu CP ein 3-4-fach schnellerer Attachmentverlust im Krankheitsverlauf festgestellt werden (Baer, 1971). Eine AP zeigt eine sehr hohe familiäre Häufung (u. a. Beaty et al., 1987; Long et al., 1987; Marazita et al., 1994). Dies könnte die These vom Einfluss übergeordneter genetischer Faktoren auf die individuelle Suszeptibilität für diese Parodontitisform unterstützen. Das Vererbungsmuster für die AP wird noch kontrovers diskutiert. So vermuten Melnick et al., 1976, einen x-chromosomal dominanten, Long et al., 1987, einen autosomal rezessiven und Marazita et al., 1994, einen autosomal dominanten Erbgang. Diese Differenzen können u. a. auf ethnischen Unterschieden in den untersuchten Populationen beruhen.

### **1.2.2 Mikrobiologie der Parodontitis**

Eine entscheidende Rolle in der Ätiologie der Parodontitis besitzt die bakterielle Mundhöhlenflora. Bereits 1965 konnten Loe et al. in einer klinischen Studie nachweisen, dass die Entwicklung der bakteriellen Plaque einer Gingivitis unmittelbar vorausgeht. Diese kann im weiteren Verlauf in eine Parodontitis übergehen (Lindhe et al., 1975), wobei die auslösenden Faktoren dafür noch nicht lückenlos geklärt sind. Intensive Forschungen über die mikrobielle Plaque zeigten, dass sowohl die Menge der Plaque als auch ihre Qualität, also die Besiedlung mit bestimmten Bakterienspezies, von entscheidender Bedeutung bei der Entstehung einer Parodontitis sind (u. a. Slots, 1979; Listgarten, 1988; Socransky et al., 1991).

Die Parodontitis wird von vielen Autoren als opportunistische Infektion angesehen (Listgarten, 1988; Marsh, 1994; Theilade, 1996), da die meisten parodontopathogenen Bakterien, wenn auch nur in geringerer Anzahl, ebenfalls bei parodontal Gesunden nachgewiesen werden können (Ximénez-Fyvie et al., 2000). Durch eine verminderte Abwehrleistung des Wirts infolge der schon beschriebenen Risikofaktoren oder Veränderungen der oralen Mikroökologie (z. B. durch veränderten pH-Wert oder Temperaturänderung) kommt es zur Verschiebung des Gleichgewichts der oralen Mischflora. Dies gibt parodontopathogenen gram-negativen fakultativen und obligaten Anaerobiern zuungunsten von parodontstabilisierenden Bakterien die Möglichkeit der Vermehrung.

Durch die 1979 von Socransky aufgestellten Postulate (Modifikation der Koch'schen Postulate von 1884) konnten potentielle Parodontitiserreger hinsichtlich ihrer Pathogenität bewertet werden (Socransky, 1979).

Postulate von Socransky:

1. Assoziation: Der Erreger muss in aktiven Taschen in höherer Anzahl gefunden werden als in Kontrolltaschen mit gesunden parodontalen Verhältnissen.
2. Elimination: Die Elimination des Erregers sollte den Verlauf der Erkrankung aufhalten.
3. Wirtsantwort: Der Erreger ruft eine zelluläre und humorale Reaktion des Immunsystems hervor.
4. Virulenzfaktoren: Der Erreger sollte Virulenzfaktoren besitzen, die für die Initiation und Progression der Erkrankung von Relevanz sind.
5. Tierversuch: Die Pathogenität des Erregers im Tierversuch muss darauf schließen lassen, dass sie am Menschen eine Parodontitis auslösen können.

Aufgrund ihrer biochemischen Fähigkeiten zur Adhärenz und Koloniebildung auf Wurzel- und Zelloberflächen etablieren und stabilisieren sich orale Bakterien zu einem Biofilm. Dieser mikrobielle Biofilm heftet sich über einer aus Proteinen und Glykoproteinen des Speichels bestehenden Pellikelschicht an desquamationsfreien Oberflächen wie Zahn, Restaurationen oder Implantaten an. Die Produktion von extrazellulären Polysacchariden durch parodontale Frühbesiedler (Kokken und Stäbchen) führt zum Andocken weiterer Spezies und dient der Vernetzung der Bakterien untereinander. Der Biofilm ist von zäher und klebriger Konsistenz, wodurch er sich nur mechanisch entfernen lässt. Weiterhin schützt er die Bakterien vor Austrocknung und der Immunantwort des Wirts. Zusätzlich ist auch die Penetration von Antibiotika erschwert (Caldwell et al., 1997; Marsh, 2004).

Die ersten Bakterien (Streptokokken, Actinomyceten), die sich an der Zahnoberfläche anlagern, sind meist gram-positive Bakterien. Durch eine Vielzahl von Stoffwechselprodukten wird das umliegende Gewebe zu einer verstärkten Exsudation und Migration von Abwehrzellen angeregt. Dies führt zur Auflockerung des Saumeithels und der Penetration von gram-negativen fakultativen und obligaten Anaerobiern in das subgingivale Parodont. *A. actinomycetem-comitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* und *T. denticola* scheinen dabei die virulentesten Bakterien zu sein und werden daher als parodontale Leitkeime bezeichnet (Socransky und Haffajee, 1994; Genco et al., 1996). Viele der oralen Bakterien sind zur Koaggregation befähigt. Das heißt, mehrere Bakterienspezies können so genannte Komplexe bilden (Socransky et al., 1998), in denen sich mit der Zeit ein stabiles ökologisches Gleichgewicht einstellt. Diese Komplexe können stark oder schwach pathogen sein. Die wichtigsten bisher bekannten Bakterien der subgingivalen Plaque wurden fünf Komplexen zugeordnet (Abb.1).

Die in der gesunden Mundflora auftretenden gram-positiven Bakterien wie Actinomyceten (blauer Komplex) und Streptokokken (gelber Komplex) werden von den gram-negativen Anaerobiern sukzessiv verdrängt, die sich mit zunehmender Taschentiefe und dem damit verbundenen sauerstoffarmen Milieu vermehren. Die Bakterien des grünen Komplexes treten

vermehrt in Erscheinung, wobei *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Serotyp b als Leitkeim mit hoher Pathogenität gilt. Zum orangen Komplex zählen vor allem pathogene Keime, die in geringer Anzahl in jeder Mundhöhle vorkommen und sich erst durch das veränderte Ökosystem stark vermehren. Die höchste Pathogenität weist der rote Komplex auf (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*) auf. Die Manifestation dieses Komplexes im parodontalen Gewebe ist abhängig von einer vorherigen Etablierung des orangen Komplexes, der somit das parodontale Mikromilieu für die Besiedlung mit den Bakterien des roten Komplexes vorbereitet. Socransky et al. konnten 1998 nachweisen, dass Bakterien des roten Komplexes die stärkste Korrelation zu den klinischen Parodontitisparametern Sondiertiefe und Sondierblutung besitzen.

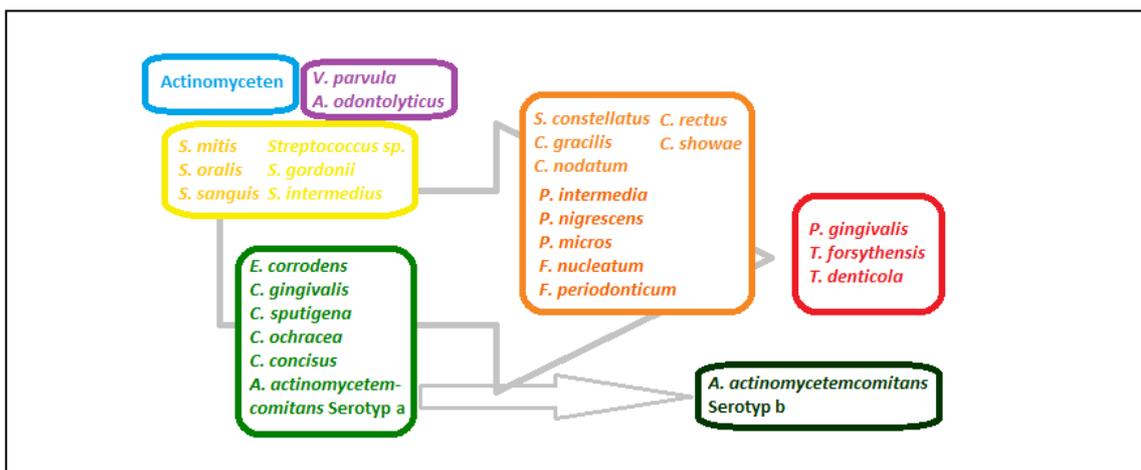


Abb. 1: Bildung von Bakterienkomplexen in der Mundhöhle (nach Socransky et al., 1998)

Erstbesiedler sind Actinomyceten und Streptokokken. Mit zunehmend verändertem Mundhöhlen-Ökosystem wird der Weg für weitere Bakterienkomplexe geebnet. Der blaue, violette, grüne und gelbe Komplex treten oft miteinander vergesellschaftet auf und scheinen stark untereinander zu interagieren. Die Besiedlung mit den Bakterien des orangen Komplexes nimmt mit entzündungsbedingt verändertem Mikromilieu zu und ermöglicht die Etablierung des roten Komplexes.

Parodontopathogene Bakterien besitzen die Fähigkeit, die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen sowie gewebeabbauenden Enzymen (z. B. Kollagenasen, MMPs) und Mediatoren (z. B. PGE<sub>2</sub>) im parodontalen Gewebe zu triggern, wodurch es zur entzündlichen Destruktion des Parodonts kommen kann. Weiterhin können Parodontopathogene die Immunabwehr des Wirts umgehen, indem sie spezifische Antikörper deaktivieren oder die Aktivität phagozytierender Zellen hemmen (Williams, 1990).

Die Kenntnis über die Zusammensetzung der subgingivalen Plaque führte zur Entwicklung von kommerziell verfügbaren Testsystemen zum Nachweis parodontaler Markerbakterien. Dadurch

ist bei entsprechendem klinischen Bild eine gezielte Antibiotikatherapie möglich. Eine Unterscheidung zwischen der chronischen und aggressiven Parodontitis lässt sich jedoch mit den heute verfügbaren mikrobiologischen Tests nicht treffen (Mombelli et al., 2002). Elektronenmikroskopische Untersuchungen an aufgrund von AP extrahierten Zähnen zeigten einen dünnen Biofilm und nur wenig mineralisierte Plaque. Bei Individuen mit CP ist dagegen ein dicker und komplexer Biofilm mit vielen mineralisierten Auflagerungen typisch (Listgarten, 1976).

### **1.2.3 Immunologische Wirtsreaktion bei der Parodontitis**

Zur Bekämpfung parodontopathogener Bakterien aktiviert der Wirt das angeborene und erworbene Immunsystem. Die angeborene Immunabwehr beinhaltet verschiedene Zelltypen wie Epithel- und Langerhans-Zellen der Mukosa, Gewebsmakrophagen, PMNs und dendritische Zellen der gingivalen/parodontalen Lamina propria sowie parodontale Fibroblasten und mesenchymale Zellen. Die Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen durch keimlinienkodierte Rezeptoren (z. B. Toll-like-Rezeptoren [TLR]) unspezifische pathogene Strukturen und können diese von körpereigenen Zellen unterscheiden. Die Aktivierung dieser Rezeptoren vermittelt die Phagozytose der Pathogene oder triggert die Produktion proinflammatorischer und regulatorischer Zytokine (Teng, 2006). Beispielsweise assoziiert zellwandungebundenes LPS gram-negativer Bakterien via LPS-bindendem-Protein (LBP) mit dem CD14-Rezeptor auf der Zelloberfläche von Monozyten und Makrophagen. Dadurch werden diese Zellen TLR-4-abhängig aktiviert und es kommt zur Produktion und Sekretion von biologisch aktiven Substanzen, die der bakteriellen Abwehr dienen (Zytokine, Sauerstoff- und Stickstoffradikale, Arachidonsäuremetaboliten, Bradykinin, Histamin) (Page, 1991; Page et al., 1997). Durch das LPS und andere bakterielle Virulenzfaktoren wird das Komplementsystem als weitere Einheit der Immunabwehr aktiviert, wodurch es zur Opsonierung pathogener Strukturen, Lyse bakterieller Zellwände und Freisetzung von Entzündungsmediatoren kommt (Socransky et al., 1991). Eine entscheidende Rolle spielen die PMNs als Zellen der ersten Linie der parodontopathogenen Abwehr. Der antimikrobielle Effekt der PMNs besteht in der Phagozytose der Bakterien und der Freisetzung lysosomaler Enzyme und Entzündungsmediatoren wie Prostaglandinen, Leukotrienen und Zytokinen. Für verschiedene Formen der AP konnte eine verringerte Chemotaxis und Phagozytosefähigkeit der PMNs auf mikrobielle Stimulation nachgewiesen werden (Clark et al., 1977; Van Dyke et al., 1987; Kimura et al., 1992).

Ebenfalls zur angeborenen, unspezifischen Abwehr zählen die Natürlichen-Killer-(NK)-Zellen, die nach Aktivierung zytotoxisch wirken und proinflammatorische Zytokine produzieren. Es konnte eine vermehrte Anwesenheit von NK-Zellen im parodontalen Gewebe von Parodontitispatienten im Vergleich zu parodontitisfreien Kontrollprobanden nachgewiesen werden (Yamazaki et al., 2001). Dieser Unterschied wurde auch bei schweren Formen der Parodontitis im Vergleich zu milden beobachtet (Fujita et al., 1992).

Zusätzlich werden Makrophagen und Monozyten zur Abwehr bakterieller Parodontopathogene rekrutiert (Kornman et al., 1997b).

Die Reaktion des angeborenen Immunsystems kann häufig schon eine Ausbreitung der Infektion verhindern. Anderenfalls aktivieren die Immunzellen der unspezifischen Abwehr durch die Sekretion von inflammatorischen Mediatoren und Zytokinen, durch Antigenpräsentation mittels Haupthistokompatibilitätskomplex-(MHC)-Molekülen und durch die Expression co-stimulierender Moleküle die adaptive Immunantwort. Das adaptive Immunsystem besteht aus der humoralen (Antikörper-gestützten) und der zellulären Abwehr (T- und B-Lymphozyten). T-Lymphozyten erkennen und binden auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen (dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen) prozessierte antigene Peptide, die an MHC-Moleküle gebunden sind. T-Helferzellen, die auf ihrer Oberfläche das Glykoprotein CD4 exprimieren, werden auch als CD4<sup>+</sup> T-Zellen bezeichnet. Sie erkennen prozessierte Antigene nur über das MHC-II-Molekül und besitzen die Fähigkeit, die Differenzierung naiver B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen einzuleiten (Mathur und Michalowicz, 1997). Die nun aktivierten B-Zellen bilden gegen parodontale Bakterien gerichtete Immunglobuline (hauptsächlich IgG und IgA) (Kinane und Lappin, 2002). Die gebildeten Antikörper opsonieren Parodontopathogene, was zur Aktivierung des Komplementsystems und zur Erleichterung der Phagozytose führt. Weiterhin inaktivieren sie bakterielle Virulenzfaktoren wie LPS, Leukotoxin, äußere Membranproteine oder Fimbrien (Ebersole, 2003). T-Zellen, die auf ihrer Zelloberfläche CD8 tragen und prozessierte Antigene über das MHC-I-Molekül erkennen, werden als zytotoxische Zellen bezeichnet, da sie bei Aktivierung Perforine und Granzyme ausschütten. Dies führt bei ihren Zielzellen, den MHC-I-tragenden Zellen, zur Apoptose (Trapani, 1995).

### **1.3 Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B**

#### **1.3.1 Die Rolle von NF- $\kappa$ B in der Immunantwort**

Als sofortige Abwehrreaktion auf verschiedene Stimuli antworten das angeborene und erworbene Immunsystem mit der Sekretion von Zytokinen und anderen Mediatoren, die zu einer entzündlichen Reaktion mit antimikrobiellem Effekt führen. Eine entscheidende Schlüsselrolle nimmt dabei der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B ein. NF- $\kappa$ B wurde 1986 erstmals als Faktor für die Regulierung der Gentranskription von Immunglobulin- $\kappa$  entdeckt (Sen und Baltimore, 1986). Heute wird NF- $\kappa$ B als bedeutender Transkriptionsfaktor für die Immun- und Entzündungsantwort angesehen (Baldwin, 2001). NF- $\kappa$ B wird über viele verschiedene Stimuli aktiviert, wie z. B. virale und bakterielle Produkte, aber auch proinflammatorische Mediatoren. Nach seiner Aktivierung bindet der Transkriptionsfaktor an spezifische DNA-Sequenzen und induziert dort die Transkription zahlreicher Zielgene. Diese Gene kodieren z. B. für Zytokine,

Wachstumsfaktoren, Akute-Phase-Proteine, Zelladhäsionsmoleküle oder MHC-Moleküle. Somit nimmt NF- $\kappa$ B einen Einfluss auf Entzündungsvorgänge, Karzinogenese sowie pro- und antiapoptotische Reaktionen. Eine der besonderen Eigenschaften von NF- $\kappa$ B ist seine schnelle Aktivierbarkeit, wodurch den Zellen durch vermehrte Zielgenexpression ermöglicht wird, sofort auf gefährliche Erreger oder Stress zu reagieren. NF- $\kappa$ B kodiert für zahlreiche Entzündungsmediatoren (Tab. 1) (Baldwin, 2001). Eine starke NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist daher auch bei vielen chronischen Entzündungserkrankungen wie rheumatischer Arthritis (Handel et al., 1995), entzündlichen Darmkrankheiten (Atreya et al., 2008) und Asthma (Hart et al., 1998) zu beobachten. Viele NF- $\kappa$ B-regulierte Gene kodieren für Entzündungsmediatoren, die ebenfalls für die Entstehung einer Parodontitis von Bedeutung sind (Tab. 1).

Tab. 1: Durch NF- $\kappa$ B-regulierte Proteine, die bei Entzündungen eine wichtige Rolle spielen (nach Rahman und Mac Nee, 1998).

<b>Zytokine</b>	TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-6, IL-12
<b>Wachstumsfaktoren</b>	GM-CSF, G-CSF, M-CSF
<b>Chemokine</b>	IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, Gro- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , Eotaxin, RANTES
<b>Adhäsionsmoleküle</b>	ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin
<b>Immunrezeptoren</b>	IL-2 Rezeptor ( $\alpha$ -Kette), T-Zell Rezeptor ( $\beta$ -Kette), PAF-Rezeptor, CD11b, CD48
<b>Weitere Entzündungsmediatoren</b>	iNOS, COX-2, 5-Lipoxygenase, 12-Lipoxygenase, zytoplasmatische Phospholipase A2, C-reaktives Protein
<b>Protoonkogene</b>	p53, c-myc, ras

Einige Studien belegen die Einflussnahme des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B auf die Pathogenese der Parodontitis. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass während der LPS-stimulierten Maturation von Monozyten zu Makrophagen NF- $\kappa$ B im Zytoplasma aktiviert wird und es so zu einer schnellen und hohen Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  kommt (Takashiba et al., 1999). Des Weiteren konnten Ambili et al., 2005, in einer *in vivo* Studie unter Verwendung von Gingivabiopsien immunhistochemisch eine erhöhte NF- $\kappa$ B-Aktivität bei Patienten mit chronischer Parodontitis im Vergleich zu parodontitisfreien Kontrollprobanden nachweisen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass viele Aktivatoren des NF- $\kappa$ B wie bakterielle Produkte und proinflammatorische Zytokine (siehe Abschnitt 1.3.4) in großem Maße im entzündeten parodontalen Gewebe vorzufinden sind.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die IL-1-induzierte Produktion von parodontalen Entzündungsmediatoren wie Cyclooxygenase-2, Interleukinen, PGE<sub>2</sub> und MMP durch humane gingivale Fibroblasten über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B erfolgt (Nakao et al., 2000; Kida et al.,

2005). Weiterhin blockiert NF- $\kappa$ B IL-1 $\beta$ -getriggert Apoptosevorgänge und stabilisiert gingivale Fibroblasten während der parodontalen Inflammation, wodurch die Entzündungsantwort aufrechterhalten wird (Vardar-Sengul et al., 2009).

NF- $\kappa$ B bewirkt die Expression von Genen, die für proinflammatorische Mediatoren wie IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  kodieren. Die erhöhte Produktion dieser Zytokine induziert die Freisetzung weiterer Botenstoffe wie Eikosanoide (Prostaglandine, Leukotriene) und Enzyme (u. a. MMPs), wodurch es zur Verschiebung der Gewebshomöostase in Richtung Abbau parodontaler Strukturen kommen kann (Page et al., 1997).

### **1.3.2 Die NF- $\kappa$ B-Familie**

Die beim Menschen vorkommende NF- $\kappa$ B-Familie tritt immer als Dimer-Komplex auf und besteht aus fünf Mitgliedern: Rel-A (p65), NF- $\kappa$ B1 (p50 bzw. sein Präkursor p105), NF- $\kappa$ B2 (p52 bzw. sein Präkursor p100), Rel-B und c-Rel. Die Proteine p50 und p52 entstehen durch proteolytische Prozesse aus p105 und p100. Alle Mitglieder der NF- $\kappa$ B-Familie besitzen eine aus rund 300 Aminosäuren bestehende Rel-Homologiedomäne. Diese Region ist verantwortlich für die Bindung von NF- $\kappa$ B an eine spezifische DNA-Sequenz, die Dimerisation und die Interaktion mit I $\kappa$ B, dem intrazellulären Inhibitor von NF- $\kappa$ B. Auf der Rel-Homologiedomäne befindet sich zusätzlich die nukleäre Lokalisationssequenz NLS (Siebenlist et al., 1994). Nahezu jedes Mitglied der NF- $\kappa$ B-Familie kann mit sich selbst oder anderen Mitgliedern Homo- bzw. Heterodimere bilden. Ob alle möglichen Kombinationen natürlicherweise vorkommen, welche intrazellulären Funktionen sie übernehmen und ihre Bedeutung für den Organismus ist noch nicht lückenlos geklärt. Die klassische und in vielen verschiedenen Zelltypen vorkommende Form des NF- $\kappa$ B ist das Heterodimer aus Rel-A (p65) und NF- $\kappa$ B1 (p50). Rel-B hingegen wird wahrscheinlich nur in immunologisch wirksamen Zellen im Thymus, Lymphknoten und in den Peyer-Plaques exprimiert. Die Expression von c-Rel beschränkt sich auf hämatopoetische Zellen und Lymphozyten (Li und Verma, 2002). Rel-A, Rel-B und c-Rel besitzen eine c-terminale Transaktivierungsdomäne, die entscheidend für die NF- $\kappa$ B-vermittelte Transkription der Zielgene ist. Sowohl bei p50 als auch bei p52 ist diese Domäne nicht vorhanden. Daher können Homodimere aus p50 bzw. p52 zwar an die spezifische DNA-Stelle binden, jedoch allein nicht die Transkription einleiten. p50 und p52 binden daher an das I $\kappa$ B-Protein B-cell leukemia/lymphoma (Bcl)-3, welches eine funktionelle Transkriptionsdomäne besitzt und somit als Transkriptions-Co-Aktivator für p50 und p52 wirkt (Nolan et al., 1993; Franzoso et al., 1997).

### 1.3.3 Die IκB-Familie

Das NF-κB-Protein geht mit dem Inhibitorprotein IκB einen Komplex ein, der das Protein in einer inaktiven Form im Zytoplasma hält. Aus der IκB-Familie sind derzeit neun Mitglieder identifiziert, die wiederum in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Die zytoplasmatischen Inhibitorproteine sind IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBε und die NF-κB Vorstufen p105 und p100. Zu den nukleären IκB-Proteinen gehören Bcl-3, IκBζ and IκB<sub>NS</sub> (Yamamoto und Takeda, 2008). Allen IκBs gemeinsam sind zwei Serin-Reste an ihrem N-terminalen Ende und 5-7 Ankyrin-Repetitionen, die zusammen eine Domäne bilden. Eine Ankyrin-Repetition umfasst dabei 33 Aminosäuren. Da sich diese Ankyrin-Wiederholungen auch auf der Molekülstruktur der NF-κB Proteine p100 und p105 befinden, sind sie somit ebenfalls zu den IκB-Proteinen zu zählen. Über die Ankyrin-Domäne wird eine Protein-Protein-Interaktion ermöglicht, also die Bindung von IκB an NF-κB (Verma et al., 1995).

Die Aufgabe der Inhibitorproteine besteht darin, NF-κB in inaktiver Form im Zytoplasma zu halten und so dessen Translokation zum Zellkern zu vermeiden. Dies erfolgt durch das Binden von IκBα an die Rel-Homologiedomänen der NF-κB-Untereinheiten. So kommt es zur Maskierung der auf dieser Domäne befindlichen nukleären Lokalisationssequenz NLS, woraufhin NF-κB nicht mehr in den Zellkern translozieren und sich an die spezifische DNA-Bindungsstelle lagern kann (May und Gosh, 1997).

Durch IκBα ist jedoch nur eine der beiden NLS des NF-κB-Dimers verdeckt und so zu einem NF-κB-IκBα-Komplex gebunden. Auf einem Amino-Ende des IκBα ist das nukleäre Export-Signal NES, eine leuzinreiche Sequenz, lokalisiert. Die Aufgabe des NES ist es, den NF-κB-IκBα-Komplex aus dem Zellkern zu befördern. Dadurch befindet sich der NF-κB-IκBα-Komplex in einer ständigen Pendelbewegung zwischen Zytoplasma und Nukleus. Da der Exportprozess wirksamer als das Importsignal ist, ist der Komplex nur dann dauerhaft im Zellkern lokalisiert, wenn der Export durch einen Inhibitor blockiert ist. Im Gegensatz zum pendelnden NF-κB-IκBα-Komplex bleibt der NF-κB-IκBβ-Komplex vollständig im Zytoplasma, da hier die NLSs beider Untereinheiten des NF-κB-Dimers durch IκBβ blockiert sind.

Auf potente Stimuli wie LPS, TNF-α oder IL-1 wird IκB als Antwort abgespalten. IκBα ist für die schnelle Aktivierung von NF-κB zuständig, während IκBβ die dauerhafte NF-κB-Antwort reguliert (Li und Verma, 2002).

### 1.3.4 Aktivatoren und Inhibitoren von NF-κB

Es gibt viele verschiedene Stimuli durch die NF-κB aktiviert werden kann. Das sind neben UV-Strahlung und oxidativem Stress auch Infektionen mit Pathogenen wie Viren und Bakterien. Gram-positive Bakterien aktivieren beispielsweise die intrazelluläre NF-κB-Signalkaskade vorwiegend über einen Membranrezeptor, der das Peptidoglykan ihrer Zellwand bindet. Bei gram-negativen Bakterien reagiert hingegen u. a. ein Rezeptor mit dem Lipopolysaccharid ihrer Zellwand. Auch Entzündungsmediatoren wie TNF-α oder IL-1β aktivieren NF-κB über spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Weitere Aktivatoren von NF-κB sind in der Tabelle 2 zusammengefasst.

Die NF-κB-Aktivierung wird jedoch nicht nur positiv reguliert. Inhibitoren wie z. B. Glukokortikosteroide, bestimmte Interleukine oder entzündungshemmende Stoffe wie Acetylsalicylsäure oder Cyclosporin A können die NF-κB-Aktivierungskaskade an jeder Stelle stoppen (Tabelle 3). Die Wirkungsweise der Inhibitoren beruht meist auf der Hemmung der Degradation von IκB oder auf der Induktion der Neusynthese von IκB.

Tab. 2: Aktivatoren von NF-κB (nach Rahman und MacNee, 1998; Pahl, 1999)

<b>Entzündungsmediatoren</b>	TNF-α, TNF-β, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, Leukotriene
<b>Wachstumsfaktoren</b>	GM-CSF, G-CSF, M-CSF
<b>Bakterien und Viren</b>	Bestandteile vieler gram-positiver und gram-negativer Bakterien ( Peptidoglykan, LPS), Influenza-, Adenovirus
<b>Immunrezeptoren</b>	T-Zell- und IL-2-Rezeptoren, MHC-Moleküle der Klasse I, II
<b>Physiologische Mediatoren</b>	Erythropoetin, Bradykinin, Angiotensin II
<b>Chemische und physikalische Einflüsse</b>	UV-Strahlung, Hypoxie, freie Radikale, Oxidantien, Wasserstoffperoxid, Ozon
<b>Allergene</b>	Nickel, Blei, Chrom

Tab. 3: Inhibitoren von NF-κB (nach Rahman und MacNee, 1998)

<b>Glukokortikoide</b>	Dexamethason
<b>Antioxidantien</b>	Glutathion, Thioredoxin, Vitamin E
<b>Zytokine</b>	IL-4, IL-10
<b>Antiinflammatorische Substanzen</b>	Acetylsalicylsäure, Cyclosporin A, Natriumsalicylat

### 1.3.5 Aktivierungskaskade des NF-κB

Eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von NF-κB spielt die Abspaltung des Inhibitorproteins IκBα vom im Zytoplasma angereicherten NF-κB-IκBα-Komplex. So kann NF-κB in den

Zellkern translozieren, um dort an seine DNA-Zielsequenz zu binden und die Transkription der kodierten Gene zu bewirken. Die I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation wird durch eine von exogenen Stimuli in Gang gesetzte Signalkaskade induziert. Hierbei lösen z. B. bakterielle Produkte, Zytokine oder Wachstumsfaktoren durch die Assoziation an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche intrazelluläre Prozesse aus.

Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B kann nur dann stattfinden, wenn sein Inhibitor, das I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein, phosphoryliert und so aus dem gemeinsamen Komplex gelöst wird. Dies ist die Aufgabe des I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes (IKK), der eine weitere, entscheidende Rolle bei der NF- $\kappa$ B-Aktivierung spielt. Der IKK besteht aus einem 700-900 kDa Komplex, der aus mehreren Proteinen zusammengesetzt ist. IKK besitzt zwei katalytische Untereinheiten, IKK $\alpha$ , das den Hauptteil des Komplexes darstellt, und IKK $\beta$ . Beide sind für den Phosphorylierungsprozess zuständig. Der dritte Bestandteil ist die regulatorisch wirksame IKK $\gamma$ -Untereinheit, die auch als NEMO, NF- $\kappa$ B essential modulator, bezeichnet wird. Der IKK wird durch die gleichen Hauptstimuli, die auch auf NF- $\kappa$ B wirken, aktiviert. IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  weisen eine große strukturelle Homologie auf, da 50% ihrer Aminosäuresequenzen identisch sind. Trotzdem besitzt der durch proinflammatorische Stimuli aktivierte IKK $\beta$  eine größere Potenz, I $\kappa$ B $\alpha$  an dessen Serin-Resten Ser32 und Ser36 zu phosphorylieren.

Das phosphorylierte I $\kappa$ B $\alpha$  wird nun an seinen Lysin-Resten Lys21 und Lys22 durch das Enzym  $\beta$ -TRCP ( $\beta$ -transducin-repeat-containing protein) Ubiquitin-konjugiert. Im Anschluss wird der Polyubiquitin-markierte NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplex vom 26-S Proteasom erkannt und proteolytisch verdaut, wodurch das NF- $\kappa$ B-Dimer nun von seinem Zytoplasma-gebundenen Komplex befreit wird und NF- $\kappa$ B dank seiner NLS in den Nukleus translozieren kann, um dort an die DNA-Erkennungssequenz zu binden (Karin und Ben-Neriah, 2000; Gosh und Karin, 2002).

Auf dem klassischen Weg der NF- $\kappa$ B-Aktivierung wird der Transkriptionsfaktor als Folge jeglichen proinflammatorischen Stimulus (vor allem LPS, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) über IKK $\beta$  und anschließender Phosphorylierung von I $\kappa$ B aktiviert.

Anders verläuft die NF- $\kappa$ B-Aktivierung jedoch beim zweiten möglichen, nicht-klassischen Weg. Hier erfolgt zunächst eine Phosphorylierung der IKK $\alpha$ -Untereinheit durch die NF- $\kappa$ B induzierende Kinase (NIK). Der nun aktivierte IKK $\alpha$  kann p100, das im Zytoplasma als Rel-B/p100-Komplex vorliegt, phosphorylieren. Daraufhin wird p100 zu p52 prozessiert und der nun entstandene Rel-B/p52-Komplex kann in den Nukleus translozieren, um dort an die NF- $\kappa$ B-spezifische Promotorsequenz zu binden. Dieser Aktivierungsweg erfolgt unter anderem durch das Binden von Lymphotoxin  $\beta$  an einen bestimmten Rezeptor in nicht lymphatischen Bindegewebszellen, wodurch es zur Produktion von Chemotaxinen für B-Lymphozyten kommt (Dixit und Mak, 2002).

## **1.4 Toll-like-Rezeptoren**

### **1.4.1 Entdeckung der Toll-like-Rezeptoren**

Toll-like-Rezeptoren (TLR) sind transmembranös gelegene Proteine, die von Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert werden. Die Spezifität der TLR für mikrobielle Bestandteile erlaubt ihnen, eine Infektion zu erkennen und das Immunsystem gegen die eingedrungenen Pathogene zu mobilisieren.

Auch dendritische Zellen als Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr exprimieren TLRs. Nach Ligandenbindung an den jeweiligen TLR kommt es zur Maturation der dendritischen Zellen, die daraufhin MHC-Moleküle und co-stimulierende Moleküle wie CD80 und CD86 exprimieren und in einen Lymphknoten wandern. Dort präsentieren sie dann naiven T-Zellen das gebundene Antigen. Weiterhin wird über die durch pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) aktivierten TLRs in den dendritischen Zellen die Expression verschiedener Zytokine induziert. Dadurch differenzieren natürliche T-Zellen ( $T_H0$ ) direkt zu  $T_{H1}$ - und  $T_{H2}$ -Zellen. Aber auch Zellen der rein adaptiven Abwehr (B- und T-Lymphozyten) sowie Zellen ohne immunologische Aktivität wie Epithelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten besitzen TLRs (Medzhitov, 2001).

1984 wurde das für die dorso-ventrale Ausrichtung des *Drosophila Melanogaster* Embryos verantwortliche Gen namens Toll von der Biologin Nüsslein-Volhard entdeckt (Anderson und Nüsslein-Volhard, 1984). Darüber hinaus konnte einige Zeit später herausgefunden werden, dass Toll ebenfalls eine Rolle bei Pilzinfektionen mit Aktivierung von NF- $\kappa$ B spielt (Lemaitre et al., 1996). Diese Signaltransduktionskaskade wies eine große Ähnlichkeit zum IL-1-Signaltransduktionsweg der Säugetiere auf. Aufgrund der großen Homologie des IL-1-Rezeptors der Säugetiere und der intrazellulären *Drosophila*-Toll-Domäne wird dieser auch Toll/IL-1-Rezeptor (TIR) bezeichnet (Belvin und Anderson, 1996). Ein Jahr nach der Entschlüsselung der Rolle des *Drosophila*-Tolls wurde ein menschliches Homolog zu diesem Toll-Rezeptor gefunden und deshalb als Toll-like-Rezeptor bezeichnet. Schließlich wurde eine ganze Familie von Rezeptoren, die dem *Drosophila*-Toll strukturell ähneln, entdeckt. Bis heute sind 13 Mitglieder dieser Transmembran-Rezeptorfamilie bekannt (10 humane und 13 murine), denen die extrazellulär lokalisierte leuzinreiche Region (LRR-Domäne) und die intrazelluläre Toll/IL-1-Rezeptordomäne (TIR) gemeinsam ist (Medzhitov et al., 1997; Takeda et al., 2003, West et al., 2006).

### **1.4.2 Liganden von Toll-like-Rezeptoren**

TLRs gehören zu den PRRs, den pattern-recognition receptors, die mikrobielle Strukturen, PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), erkennen und somit mit dazu beitragen, die zentrale Aufgabe des Immunsystems, die Unterscheidung zwischen fremd und eigen,

umzusetzen. Es gibt zwei Arten der PRRs. Eine PRR-Gruppe vermittelt die Phagozytose, die andere Gruppe triggert die Produktion proinflammatorischer und regulatorischer Zytokine und ist für die Induktion co-stimulatorischer Moleküle verantwortlich. Toll-like-Rezeptoren gehören zu den Mitgliedern der zweiten Gruppe.

Die PRRs des angeborenen Immunsystems erkennen wiederkehrende Strukturmerkmale eingedrungener Mikroorganismen als körperfremd und melden eine Infektion. Zum Beispiel sind LPS gram-negativer oder Peptidoglykane und Lipoteichonsäure gram-positiver Bakterien ausschließlich bakterielle Moleküle, die nicht in eukaryoten, wirtseigenen Zellen produziert werden. Daher können diese Produkte als molekulare Signatur von mikrobiellen Erregern angesehen werden.

PAMPs sind von den Virulenzfaktoren abzugrenzen. Virulenzfaktoren werden von Pathogenen als Anpassung an ein bestimmtes Wirtsmilieu gebildet und sind sehr variabel, womit sie für das angeborene Immunsystem schwierig zu detektieren sind. PAMPs hingegen sind von relativ konstanter Struktur und variieren nur geringfügig unter Mikroorganismen einer Klasse. Dies erlaubt eine feststehende Anzahl von keimlinienkodierten PRRs zur Pathogenerkennung im angeborenen Immunsystem. So kann z. B. durch das im LPS enthaltene Lipid-A ein pattern-recognition receptor wie TLR nahezu jede Infektion mit gram-negativen Bakterien erkennen (Medzhitov, 2001). Eine Auswahl der zu jedem humanen TLR spezifischen Liganden ist in der Tabelle 4 aufgezählt.

Tab. 4: Toll-like-Rezeptoren und eine Auswahl ihrer Liganden (nach West et al., 2006)

<b>TLR</b>	<b>Ligand</b>	<b>Ligandenursprung</b>
TLR-1	triacylierte Lipoproteine	Bakterien, Mykobakterien
TLR-2	Peptidoglykan	bakterielle Zellwandkomponente
	Lipoteichonsäure	Zellwandkomponente gram-positiver Bakterien
	di-, triacylierte Lipopeptide	bakterielle Zellwandkomponente, Mykoplasmen
TLR-3	doppelsträngige RNA	Viren
TLR-4	Lipopolysaccharid	Zellwandkomponente gram-negativer Bakterien
TLR-5	Flagellin	bakterielle Flagellen
TLR-6	MALP (macrophage activating lipopetide)-2, diacylierte Lipopeptide	bakterielle Zellwandkomponenten
TLR-7	einzelsträngige RNA Imidazolquinoline	Virus synthetisches antivirales Molekül
TLR-8	einzelsträngige RNA Imidazolquinoline	Virus synthetisches antivirales Molekül
TLR-9	Hypomethylierte CpG-DNA virale DNA	Bakterien Herpes Virus
TLR-10	Ligand unbekannt	Ursprung unbekannt

### **1.4.3 Toll-like-Rezeptor-2**

Das Gen für den Toll-like-Rezeptor-2 befindet sich auf Chromosom 4q32. Seine extrazelluläre Domäne (LRR-Domäne) wird von den Aminosäuren 1 bis 588, die transmembranöse Domäne von den Aminosäuren 589 bis 609 und die zytoplasmatische Domäne (TIR-Domäne) von den Aminosäuren 610 bis 784 gebildet. TLR-2 besteht aus 3 Exons. Jedoch umfasst nur das 3. Exon den gesamten kodierenden Bereich. Die ersten beiden Exons sind nicht-kodierend (Haehnel et al., 2002).

Neben Zellen des Immunsystems (Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten) wird TLR-2 auch von Fibroblasten und Zellen des Parodonts exprimiert. TLR-2 erkennt eine Vielzahl pathogener Komponenten von Mykoplasmen, Spirochäten und die Lipoteichonsäure und Peptidoglykane gram-positiver Bakterien (Lien et al., 1999) (Tab. 4). TLR-2 wirkt synergistisch mit TLR-1 und TLR-6. TLR-2 und TLR-6 bilden ein Heterodimer, um diacylierte Lipopeptide, Mykoplasma-Lipopeptide und Peptidoglykan zu erkennen (Takeuchi et al., 2001, 2002). Der TLR-2/TLR-1-Komplex bindet triacylierte Lipopeptide (Buwett-Beckmann et al., 2006). Aliprantis et al., 2000, zeigten in Zellversuchen, dass die Aktivierung des TLR-2 durch bakterielle Lipoproteine sowohl zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B als auch zur Apoptose der antigen-bindenden Zelle führen kann.

Die Toll-like-Rezeptoren gelten als die Hauptrezeptoren der Pathogenenerkennung. Es konnte in Studien nachgewiesen werden, dass TLR-2 und -4, deren Liganden bakterielle Produkte wie LPS, Lipoteichonsäure oder bakterielle DNA sind, auch in oralen Epithel- und Gewebezellen vorkommen (Mori et al., 2003; Ren et al., 2005) und eine enge Beziehung zur Pathogenese der Parodontitis aufweisen. Hatakeyama et al., 2003, zeigten, dass der TLR-2 bei Fibroblasten des parodontalen Ligaments deutlicher exprimiert ist im Vergleich zu gingivalen Fibroblasten. In weiteren Studien wurde nachgewiesen, dass der TLR-2 im entzündeten parodontalen Gewebe häufiger im Vergleich zum gesunden Gewebe exprimiert ist (Sarah et al., 2006; Sugawara et al., 2006).

### **1.4.4 Aktivierung von TLR-2 durch parodontopathogene Bakterien**

Bestimmte bakterielle Antigene werden durch Toll-like-Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle erkannt. Über eine Signalkaskade wird dann die Immunantwort ausgelöst.

Es ist bekannt, dass Peptidoglykane und Lipoproteine als Zellwandbestandteile gram-positiver und gram-negativer Bakterien TLR-2 aktivieren (Takeuchi et al., 1999; Yoshimura et al., 1999) und LPS als Komponente der äußeren Membran gram-negativer Bakterien als Ligand des TLR-4 fungiert (Hoshino et al., 1999; Akira und Takeda, 2004).

Für eine Vielzahl gram-negativer Bakterien (u. a. Parodontopathogene) konnte jedoch gezeigt werden, dass ihre Bestandteile sowohl den TLR-2 als auch TLR-4 aktivieren. Zum Beispiel

konnten isolierte Komponenten des gram-negativen parodontalen Markerkeims *P. gingivalis* sowohl TLR-4 als auch TLR-2 bei einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen aktivieren. Natürliche und rekombinante Oberflächenfimbrien von *P. gingivalis* induzierten über die TLR-2-Aktivierung die Expression des Zytokins IL-8 in gingivalen Epithelzellen (Asai et al., 2001). In peripheren Monozyten wurden nach Stimulation mit Fimbrien von *P. g.* TLR-2-vermittelt verschiedene Chemokine und Zytokine exprimiert (Hajishengallis et al., 2004). Interessanterweise konnte das von *P. gingivalis* gebildete LPS auch den TLR-2 sowohl in murinen als auch humanen Makrophagen stimulieren (Hirschfeld et al., 2001; Martin et al., 2001) und die Aktivierung anderer TLR-Agonisten supprimieren (Yoshimura et al., 2002; Coats et al., 2003). Auch andere, noch unbekannt Komponenten von *P. gingivalis* können humane gingivale Epithelzellen zur Produktion der chemotaktischen Faktoren IL-8 und MCP-1 (monocyte chemoattractant protein) via TLR-2 aktivieren (Kusumoto et al., 2004). Eine weitere Forschergruppe konnte nachweisen, dass auch *in vivo* der TLR-2 für die Wirtsantwort auf *P. gingivalis* verantwortlich ist (Burns et al., 2009).

Sowohl Kikkert et al., 2007, als auch Gelani et al., 2009, konnten in Zell- bzw. Mäuseversuchen die Beteiligung des TLR-2 bei der Erkennung von *A. actinomycetemcomitans* hervorheben und ihm so eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle einer Infektion mit diesem parodontalen Leitkeim zuordnen. Der genaue Pathomechanismus der Erkennung konservierter pathogener Strukturen von *A. a.* durch TLR-2 konnte jedoch bislang noch nicht geklärt werden.

Der TLR-2 ist auch entscheidend für die Erkennung von *T. denticola* in gingivalen Epithelzellen (Asai et al., 2003) und humanen Makrophagen. Die Aktivierung von Makrophagen-TLR-2 führt dabei über verschiedene Zwischenschritte zu einer Hochregulierung pro- und antiinflammatorischer Zytokine (Ruby et al., 2007). Der spezifische von *T. denticola* produzierte Ligand, der über TLR-2 zur Makrophagenaktivierung führt, ist jedoch noch unbekannt.

Sugawara et al., 2001, zeigten, dass die Aktivierung von Monozyten unter anderem auch durch die Stimulation des TLR-2 über das von *Prevotella intermedia* produzierte nonendotoxische Glykoprotein erfolgt.

Auch für das letzte in der vorliegenden Assoziationsstudie untersuchte parodontopathogene Bakterium *T. forsythia* konnte nachgewiesen werden, dass es Liganden für die Aktivierung von TLR-2 besitzt. BspA, ein von *T. forsythia* produziertes leuzinreiches Oberflächenprotein, induziert TLR-2-abhängig die Produktion des Zytokins IL-8 (Hajishengallis et al., 2002; Onishi et al., 2008). Weithin wird vermutet, dass das von *T. forsythia* gebildete Lipoprotein durch TLR-2, nicht jedoch durch TLR-4 oder CD14, erkannt wird (Hasebe et al., 2004).

#### 1.4.5 Aktivierung von NF- $\kappa$ B über den MyD88-abhängigen TLR-2-Signalweg

Die Signalwege aller TLRs führen intrazellulär zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Im Folgenden soll nun der TLR-2-abhängige Aktivierungsweg näher erläutert werden (Abb. 2).

Um PAMPs erkennen und die Immunantwort einleiten zu können, muss der Toll-like-Rezeptor über seine intrazellulär gelegene TIR-Domäne eine spezifische Bindung zu bestimmten zytoplasmatischen Molekülen herstellen. TLR-2 benutzt hierfür MyD88 (myeloid differentiation protein 88), benötigt dazu aber das als Bindeglied zwischen TLR-2 und MyD88 fungierende TIRAP (TIR-containing adaptor protein). Das Protein MyD88 setzt sich aus einer TIR-Domäne am Carboxyl-Ende und einer "Death-Domäne" am Amino-Ende des Moleküls zusammen. Nachdem TLR-2 durch einen Liganden aktiviert wurde, interagiert MyD88 mit seiner "Death-Domäne" mit Mitgliedern der IRAK-(IL-1R-Associated Kinase) Familie. Es sind vier Mitglieder dieser IRAK-Familie bekannt. IRAK1 und 4 besitzen eine intrinsische Kinaseaktivität, während IRAK2 und IRAK-M keine nachweisbare Kinaseaktivität zeigen. Alle IRAKs besitzen eine terminale „Death-Domäne“ und eine zentrale Serin/Threonin-Kinase-Domäne.

Durch die Bindung der beiden „Death-Domänen“ des MyD88 und IRAK4 nach TLR-2-Stimulation wird IRAK4 aktiviert. IRAK4 assoziiert mit IRAK1, woraufhin dieses phosphoryliert und aktiviert wird. Der IRAK-Komplex spaltet sich vom MyD88 ab und interagiert mit TRAF6 (TNF Receptor-associated Factor 6). TRAF6 wirkt als Signalmediator sowohl für die TNF-Rezeptor-Familie als auch für die TLR-Familie. TRAF6 ist eine Ubiquitin-Ligase und beinhaltet eine RING-Finger-Zinkfinger-Domäne. Zusammen mit anderen Ubiquitin-Konjugationsenzymen führt TRAF6 zu einer Lys63-vermittelten Polyubiquitin-Konjugation seiner selbst. Das nun Ubiquitin-markierten TRAF6 rekrutiert einen Proteinkinasekomplex bestehend aus TAK1 (transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase-1) und TABs (TAK1 Binding Protein 1-3). Über diesen Proteinkomplex wird der I $\kappa$ B-Kinase-Komplex aktiviert, wodurch es zur Abspaltung des Inhibitors I $\kappa$ B vom I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B-Komplex kommt. Der nun ungebundene NF- $\kappa$ B kann in den Zellkern translozieren, um dort die Transkription vieler Gene der Immunantwort zu veranlassen (Akira und Takeda, 2004; Kawai und Akira, 2007).

Für TLR-2 sind noch zwei weitere Signalwege beschrieben. Zum einen bewirkt die GTPase Rac1 TLR-2-vermittelt eine I $\kappa$ B-unabhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Arbibe et al., 2000). Zum anderen wird durch die Bindung bakterieller Lipoproteine an TLR-2 MyD88-abhängig über das FAS-associated death domain protein (TADD) und Caspase 8 sowohl NF- $\kappa$ B aktiviert als auch die Apoptose eingeleitet (Aliprantis et al., 2000).

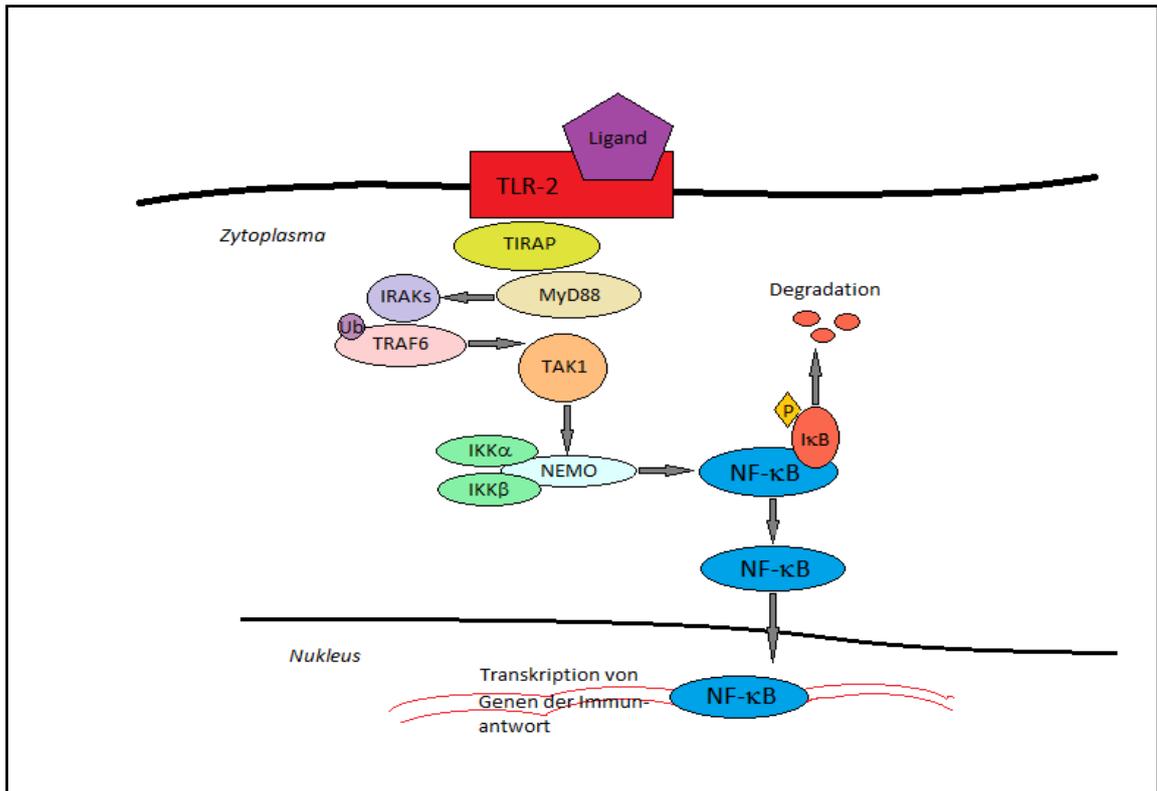


Abb. 2: Aktivierungskaskade von NF-κB über TLR-2

Die konservierte pathogene Struktur bindet an TLR-2. An die intrazelluläre TIR-Domäne von TLR-2 binden TIRAP und MyD88. Es kommt zur Rekrutierung von IRAKs und Komplexbildung. Der IRAK-Komplex wird phosphoryliert und lagert sich an TRAF6 an. TAK-1 wird rekrutiert. Dies aktiviert den IKK-Komplex und durch Phosphorylierung kommt es zur Abspaltung von IκB, wodurch NF-κB in den Zellkern translozieren kann, um die Transkription von Genen der Immunantwort einzuleiten.

### 1.5 Genpolymorphismen

Genetische Polymorphismen sind definiert als Variationen eines Gens (eines Allels), die mit einer Häufigkeit von mindestens 1 % innerhalb einer Population auftreten. Bei einem Auftreten unterhalb dieser Prozentzahl wird von einer Mutation gesprochen.

Eine häufige Veränderung der Gen-Sequenz besteht in der Insertion, Deletion oder Substitution eines einzigen Nukleotids und folglich eines Basenpaares der doppelsträngigen DNA. Dies wird als SNP (single nucleotide polymorphism) bezeichnet.

Durch SNPs entstandene verschiedene Varianten eines Gens bleiben häufig folgenlos. Da der genetische Code redundant ist und viele Aminosäuren durch mehrere Basentriplets kodiert sind, kommt es trotz SNP-veränderter Basensequenz zur Produktion identischer Proteine. Wird jedoch die Aminosäuresequenz des Proteins durch einen SNP verändert, kann dies viele Konsequenzen mit sich ziehen. Angefangen von keiner Beeinträchtigung der Proteinfunktion

über kleine Veränderungen bis hin zum völligen Verlust der Proteinfunktion. SNPs können auch im nicht-kodierenden Genbereich auftreten. Befinden sie sich in der Promotorregion eines Gens, kann es SNP-induziert zu einer veränderten Transkriptionsrate des Gens kommen. SNPs im Intronbereich können den Splicingprozess beeinflussen, was Auswirkungen auf die Translation des exprimierten Proteins haben kann.

Daher können sich Polymorphismen in Abhängigkeit von ihrer Auswirkung auf die jeweilige Proteinfunktion als Risiko-, aber auch als Protektivfaktor für eine bestimmte Erkrankung darstellen.

Die beiden SNPs Arg677Trp und Arg753Gln im TLR-2-Gen befinden sich auf dem für die intrazelluläre TIR-Domäne kodierenden DNA-Bereich. Durch die Arg/Trp- bzw. Arg/Gln-Basenvarianz entsteht eine veränderte Rezeptorfunktion, wodurch die Signaltransduktion beeinflusst sein kann (Bochud et al., 2003; Gautam et al., 2006). Dies führt möglicherweise zu einer veränderten Wirtsabwehr.

Der -94 ins/del ATTG Polymorphismus im Gen für NF- $\kappa$ B1 (p50) befindet sich in der Promotorregion der für dieses Gen kodierenden DNA-Sequenz. Ab der 94. Basenpaarstelle befindet sich im Insertions-Wildtyp die Basenreihenfolge ATTG. Beim Deletions-Mutationstyp fehlen diese vier Basen, wodurch die Transkription dieses Gens beeinflusst wird.

In Bezug auf die Parodontitis sind vor allem genetische Polymorphismen von Interesse, die sich auf Kandidatengene beziehen, die für Mediatoren der Immunantwort kodieren. Hierbei wird angenommen, dass funktionell wirksame Polymorphismen eine Auswirkung auf die individuelle Immunreaktion des Wirts haben könnten. 1997 konnte erstmals eine Assoziation von Polymorphismen im Gen für IL-1 zur Parodontitis nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass der zusammengesetzte Genotyp aus IL-1 $\alpha$  (-889) und IL-1 $\beta$  (+3953) mit jeweils mindestens einem mutanten T-Allel an diesen beiden Positionen mit dem Schweregrad der Ausprägung einer chronischen Parodontitis bei Nichtrauchern assoziiert ist (Kornman et al., 1997a). Seit einiger Zeit sind kommerzielle Testsysteme zum Nachweis des IL-1 Polymorphismus verfügbar. Dabei ist zu beachten, dass der IL-1 Polymorphismus, der unter Kaukasiern zu ca. 30 % vorkommt, in anderen ethnischen Gruppen aufgrund der geringeren Prävalenz nur begrenzt für die Diagnostik relevant ist (Deschner, 2001). Weiterhin konnte eine Assoziation des IL-1 Polymorphismus zur aggressiven Parodontitis unter kaukasischen Kohorten nicht belegt werden (Fiebig et al., 2008). Deshalb ist die Suche nach weiteren Indikatoren für Parodontitis bzw. die Infektion mit parodontalen Leitkeimen notwendig.

## 2. Zielstellung

Die mikrobielle Plaque ist der primäre ätiologische Faktor der Parodontitis (Socransky und Haffajee, 1994). In Familien- und Zwillingsstudien wurde jedoch auf die Existenz genetisch prädisponierender Risikofaktoren für Parodontitis hingewiesen, deren Einfluss auf ca. 40-50 % geschätzt wird (Michalowicz et al., 1991; Hart et al., 1992; Marazita et al., 1994; Michalowicz, 1994). Von besonderer Bedeutung sind hierbei Kandidatengene, die für Mediatoren der Immunantwort und Entzündungsreaktion kodieren. Potentielle Risikofaktoren könnten daher auch Polymorphismen in den Genen für Toll-like-Rezeptor-2 (TLR-2) und NF- $\kappa$ B sein.

Der transmembranös gelegene, unter anderem auf Zellwandkomponenten der parodontalen Markerbakterien *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* und *Prevotella intermedia* antwortende TLR-2 aktiviert den intrazellulären Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, wodurch die Expression von Genen der Immun- und Stressantwort getriggert wird. Diese Gene kodieren z. B. für proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , die eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Parodontitis spielen. Die mutanten Allele der Polymorphismen im TLR-2-Gen Arg677Trp (Bochud et al., 2003) und Arg753Gln (Gautam et al., 2006) vermindern die durch bakterielle Zellwandkomponenten ausgelöste NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Karban et al., 2004, konnten in einer *in vitro* Studie zeigen, dass das del-Allel des -94 ins/del ATTG Promotorpolymorphismus im NF- $\kappa$ B-Gen mit einer verringerten Genexpression assoziiert ist. Daher könnten genetische Variationen im TLR-2- sowie NF- $\kappa$ B-Gen die individuelle Disposition für Parodontitis und/oder die subgingivale Besiedlung mit parodontalen Markerkeimen beeinflussen und somit für die Pathogenese der Parodontitis sowie für die subgingivale Plaquezusammensetzung von Bedeutung sein.

In bisherigen Studien (Folwaczny et al., 2004; Berdeli et al., 2007a, b; Zhu et al., 2008) konnte keine Assoziation der Polymorphismen Arg677Trp und Arg753Gln im Gen für TLR-2 zur Parodontitis nachgewiesen werden. Allerdings wurden in diesen Studien nur bivariate Vergleiche durchgeführt.

Eine mögliche Assoziation des -94 ins/del ATTG Polymorphismus im NF- $\kappa$ B-Gen zur Parodontitis wurde bisher nicht untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals überprüft, ob die beiden genetischen Variationen Arg677Trp und Arg753Gln im TLR-2-Gen neben einer Assoziation zur aggressiven und chronischen Parodontitis weiterhin einen Zusammenhang zum Nachweis von parodontalen Leitkeimen (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* und *Prevotella intermedia*) aufweisen. Signifikante Resultate bivariater Analysen wurden mittels multivariater Modelle überprüft, um adjustierte Odds Ratios

zur Beurteilung der Stärke des Risikoindikators in Bezug auf bekannte Risikofaktoren für Parodontitis und Keimbesiedlung zu erhalten.

Weiterhin wurde in dieser Studie erstmalig die Assoziation des -94 ins/del ATTG Polymorphismus im NF- $\kappa$ B-Gen zur Parodontitis evaluiert. Zudem wurde untersucht, ob es auch einen Zusammenhang zwischen diesem Polymorphismus und der subgingivalen Keimbesiedlung gibt. Die bivariaten Untersuchungen wurden ebenfalls durch multivariate Analysen ergänzt.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Patienten**

#### **3.1.1 Auswahl der Patienten**

Jeder Studienpatient wurde vor der Untersuchung und Probeentnahme schriftlich und mündlich über das Ziel dieser Studie informiert und hat eine Einverständniserklärung zur Verwendung seiner Daten in anonymisierter Form unterschrieben. Die genetischen Untersuchungen der Parodontitispatienten und parodontitisfreien Kontrollprobanden wurden von der Ethikkommission der Martin-Luther-Universität genehmigt. Die Studie wurde nach den Richtlinien der Deklaration von Helsinki (Oktober 2000) und Empfehlungen für good laboratory practice (OEDC, 1999) bzw. good clinical practice (FDA, 2003) durchgeführt. Alle Patienten und Kontrollprobanden wurden persönlich oder unter Aufsicht von Privatdozent Oberarzt Dr. med. dent. S. Reichert von der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg untersucht.

#### **3.1.2 Einschlusskriterien**

Es wurden 222 Probanden für diese Studie untersucht. Alle Probanden waren Kaukasier deutscher Herkunft und untereinander nicht verwandt. Die Diagnosestellung erfolgte modifiziert nach dem neuen Klassifikationssystem für Parodontalerkrankungen (Armitage, 1999). Dabei wurden insbesondere folgende klinische Auswahlkriterien berücksichtigt:

Bei Patienten mit generalisierter chronischer Parodontitis waren mindestens 30 % der Zähne von einem Attachmentverlust  $\geq 4$  mm betroffen. Das Ausmaß des Attachmentverlusts war konsistent zur nachgewiesenen Menge an bakteriellen Auflagerungen. Im Röntgenbild wurde mehr horizontaler als vertikaler Knochenverlust diagnostiziert.

Patienten mit generalisierter aggressiver Parodontitis wurden eingeschlossen, wenn die Patienten jünger als 35 Jahre waren bzw. wenn aus anamnestischen Angaben oder alten Röntgenbildern eindeutig hervorging, dass der Erkrankungsbeginn vor dem 35. Lebensjahr lag. Mindestens 30 % der Zähne zeigten einen Attachmentverlust  $\geq 4$  mm und mindestens drei Zähne waren zusätzlich zu den ersten Molaren und Inzisivi betroffen. Im Vergleich zur chronischen Parodontitis war das Ausmaß des Attachmentverlusts inkonsistent zu der diagnostizierten Plaqueakkumulation und in vielen Fällen auch zum Lebensalter des Patienten. Im Röntgenbild wurden mehr vertikale als horizontale Knochendefekte gefunden.

Die parodontitisfreien Kontrollprobanden waren mindestens 30 Jahre alt und zeigten keinen Attachmentverlust  $\geq 3,5$  mm aufgrund von Parodontitis. Attachmentverlust infolge traumatischen Zähneputzens, kieferorthopädischer Therapie, überkonturierter Füllungs- bzw. Kronenränder oder primärer endodontischer Läsionen wurden nicht als Parodontitisfall

gewertet. Ebenso waren Pseudotaschen, z. B. an endständigen Molaren, kein Ausschlusskriterium.

### **3.1.3 Ausschlusskriterien**

Konnte keine eindeutige Zuordnung zu einer der drei oben genannten Gruppen getroffen werden, wurden die Probanden von der Studie ausgeschlossen. Weitere Ausschlusskriterien waren die Einnahme von Antibiotika weniger als sechs Monate vor der Untersuchung sowie die Einnahme von anderen Medikamenten, die die Infektabwehr und die Entzündungsneigung des Parodonts beeinflussen bzw. zu Gingivahyperplasien führen könnten. Als weiteres Ausschlusskriterium galt das Vorliegen von Allgemeinerkrankungen, für die eine Assoziation zur Parodontitis oder den in dieser Studie untersuchten Genpolymorphismen bekannt ist. Weiterhin ausgeschlossen wurden Schwangere sowie Probanden, bei denen innerhalb der letzten sechs Monate vor der Untersuchung ein subgingivales Scaling durchgeführt wurde.

### **3.1.4 Erhebung der klinischen Daten**

Im Befundblatt wurde neben den persönlichen Angaben wie Name und Alter ein allgemeiner Gesundheitsstatus erhoben (Herz-Kreislauf-, Stoffwechsel-, Infektionserkrankungen, Allergien, Medikamenteneinnahme, Schwangerschaft). Die Probanden wurden nach einer eventuellen familiären Häufung der Parodontalerkrankung befragt, wobei ausschlaggebend war, ob Familienangehörige ersten Grades, also Eltern, Geschwister oder bereits die eigenen Kinder, frühzeitigen Zahnverlust durch „Zahnlockerung“ erlitten hatten. Ebenso wurde der Raucherstatus erhoben, wonach die Studienteilnehmer in drei Kategorien (Raucher, Nichtraucher und ehemalige Raucher) eingeordnet wurden. Raucher wurden nach der Anzahl der täglich gerauchten Zigaretten und ehemalige Raucher zusätzlich nach dem Jahr der Beendigung des Nikotinkonsums befragt. Bei der Auswertung galten Probanden, die aktuell mindestens eine Zigarette pro Tag rauchten oder weniger als 12 Monate vor der Untersuchung mit dem Rauchen aufgehört hatten, als Raucher. Wurde dagegen das Rauchen bereits mindestens 12 Monate vor Untersuchungsbeginn beendet, so wurden die Probanden der Nichtrauchergruppe zugeordnet.

Im klinischen Teil des Befundblatts wurde der Parodontalstatus des Studienteilnehmers erfasst. Zunächst wurden die fehlenden Zähne bestimmt (M=Anzahl fehlender Zähne ohne Weisheitszähne). Anschließend erfolgte per Sechs-Punkt-Messung die Bestimmung der Sondiertiefen (PD=Distanz marginale Gingiva bis Taschenfundus) sowie der klinischen Attachmentverluste (CAL=Distanz Schmelz-Zement-Grenze bis Taschenfundus) mit einem Parodontometer (PCPUNC 156, Hu-Friedy, Chicago, USA) in mm-Einteilung. Etwa 30 Sekunden nach erfolgter Sondierung wurde notiert, ob eine Sondierblutung vorlag. In die Mittelwertberechnung gingen jeweils die höchsten Werte für PD und CAL pro Zahn ein. Zur Bestimmung des Ausmaßes der

Parodontitis wurde der prozentuale Anteil von Zähnen mit PD bzw. CAL von < 4 mm, 4-6 mm und > 6 mm erfasst. Außerdem wurde der prozentuale Anteil von Zähnen mit Sondierblutung (BOP) berechnet. Zur Beurteilung der Mundhygiene wurde der approximale Plaque Index (API) (Lange et al., 1977) bestimmt. Dazu wurde mit einem Plaquerevelator (Mira-2-Ton, Hager & Werken, Duisburg, Deutschland) die Plaque innerhalb der Approximalräume des I. und III. Quadranten von oral sowie des II. und IV. Quadranten von vestibulär angefärbt. Nach einmaligem Ausspülen konnte bewertet werden, ob an den untersuchten Stellen supragingivale Plaque vorlag oder nicht. Das Ergebnis wurde anschließend in Prozent angegeben (Anzahl positiver Messpunkte / Anzahl vorgenommener Messungen x 100).

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Genomische Untersuchungen**

#### **Blutentnahme**

9 ml venöses Blut wurden aus einer Armvene in eine mit EDTA-gefüllte Monovette (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) entnommen und kühl gelagert, damit zeitnah die DNA isoliert werden konnte.

#### **DNA-Isolation**

Die Isolation der DNA aus dem EDTA-Blut erfolgte mittels QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). 200 µl Blut wurden in ein 1,5 ml Tube pipettiert und nach Zugabe von 20 µl Proteinase K und 200 µl Puffer AL 15 min bei 56 °C schüttelnd inkubiert. Nach kurzem Vortexen (Vortex Genie, Bender & Hobein AG, Bruchsal, Deutschland) wurden 200 µl Ethanol hinzugegeben und der Ansatz auf die Mitte eines Säulchens pipettiert, um das Tube für 1 min bei 8000 rpm (Heraeus, Hanau, Deutschland) zu zentrifugieren. Das Säulchen wurde nun auf ein neues Sammel tube gesetzt, die DNA mit 500 µl Puffer AW1 gewaschen und für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde mit 500 µl AW2 gewaschen und ebenfalls zentrifugiert (3 min bei 13000rpm). Nachdem das Säulchen nun trocken war, wurde die DNA mit 200 µl Aqua dest. nach 5-minütiger Inkubation durch Zentrifugation (1 min, 13000 rpm) von der Säule eluiert. Die DNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **Polymerase-Ketten-Reaktion**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) diente dazu, ein genau definiertes, bestimmtes Basenpaar langes Fragment aufgereinigter DNA zu vervielfältigen. Die DNA wurde dabei mit einem Forward- und einem Reverse-Primer, beides Oligonukleotide, die zu je einer bestimmten Stelle der DNA komplementär sind, thermostabiler DNA-Polymerase und Puffern gemischt, um dann im Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) in drei Schritten amplifiziert zu

werden. Zunächst wurde im Denaturierungsschritt die im Ansatz enthaltene doppelsträngige DNA getrennt, damit als nächstes im Annealingschritt die Primer an die nun einzelsträngige DNA binden konnten. Im Elongationsschritt, der letzten Phase der DNA-Amplifikation, wurde die DNA mit Hilfe der Taq-Polymerase, durch die komplementäre Nukleotide an den Einzelstrang binden können, zum Doppelstrang vervollständigt.

#### a) PCR zur Genotypisierung des Arg677Trp-Polymorphismus im TLR-2-Gen

Für die PCR wurden 12,5 µl 2x Master Mix, 0,5 µl Forward-Primer (5'-CCC CTT CAA GTT GTG GCT TCA TAA G-3'), 0,5 µl Reverse-Primer (5'-AGT CCA GTT CAT ACT TGC ACC AC-3'), 0,25 µl Formamid, 10,25 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl genomische DNA gemischt, mit Mineralöl überschichtet und im Thermocycler unter dem in Tabelle 5 zusammengefassten Protokoll angesetzt.

An der Position 16 des 152 bp langen PCR-Produkts wurde über den Forward-Primer ein Mismatch eingeführt. Die in der Originalsequenz an dieser Stelle stehende Base Thymin wurde mittels Primer durch Guanin ersetzt, wodurch die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym MwoI (GCNNNNN-NNGC) entstand.

#### b) PCR zur Genotypisierung des Arg753Gln-Polymorphismus im TLR-2-Gen

Der Ansatz für diese PCR bestand ebenfalls aus 12,5 µl 2x Master Mix, 0,5 µl Forward-Primer (5'-CAT TCC CCA GCG CTT CTG CAA GCT CC-3'), 0,5 µl Reverse-Primer (5'-GGA ACC TAG GAC TTT ATC GCA GCT C-3'), 0,25 µl Formamid, 10,25 µl H<sub>2</sub>O sowie 1 µl genomischer DNA und wurde im Biometra Thermocycler angesetzt (Tab. 5).

Auch hier wurde ein Mismatch induziert. An Position 25 des 129 bp langen amplifizierten DNA-Fragments wurde die in der Originalsequenz befindliche Base Guanin durch Cytosin ersetzt. Somit entstand die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym MspI (C-CGG).

#### c) PCR zur Genotypisierung des -94 ins/del ATTG Polymorphismus im NF-κB-Gen

Der PCR-Ansatz bestand aus 12,5 µl 2x Master Mix, 0,3 µl Forward-Primer (5'-TGG ACC GCA TGA CTC TAT CA-3'), 0,3 µl Reverse-Primer (5'-GAA TCC CAA GGG CTG GA-3'), 0,25 µl Formamid, 10,65 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl genomischer DNA und wurde wie in Tabelle 5 dargestellt im Thermocycler amplifiziert.

Es entstand je nach Genotyp ein 130 und/oder 134 bp langes Fragment.

Tab. 5: Thermocyclerparameter für die Bestimmung der drei untersuchten Genpolymorphismen

	<b>TLR-2 Arg677Trp</b>	<b>TLR-2 Arg753Gln</b>	<b>NF-κB -94 ins/del ATTG</b>
<b>Denaturierung</b>	2 min 95 °C	2 min 95 °C	2 min 95 °C
<b>Denaturierung</b>	30 s 92 °C	30 s 92 °C	30 s 92 °C
<b>Annealing</b>	<i>12 Zyklen</i> 30 s 65 °C	<i>13 Zyklen</i> 30 s 63 °C	<i>12 Zyklen</i> 30 s 55 °C
<b>Elongation</b>	30 s 72 °C	30 s 72 °C	30 s 72 °C
<b>Delay</b>	1 s	1 s	1 s
<b>Denaturierung</b>	30 s 92 °C	30 s 92 °C	30 s 92 °C
<b>Annealing</b>	<i>32 Zyklen</i> 30 s 60 °C	<i>34 Zyklen</i> 30 s 58 °C	<i>31 Zyklen</i> 30 s 50 °C
<b>Elongation</b>	30 s 72 °C	30 s 72 °C	30 s 72 °C
<b>Delay</b>	1 s	1 s	1 s
<b>abschließende Elongation</b>	5 min 72 °C	5 min 72 °C	5 min 72 °C

#### Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) und Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Restriktionsspaltung wurden mittels spezifischer Enzyme die PCR-Produkte an einer Zielsequenz, einer auf der DNA genau definierten Stelle, geschnitten, wodurch einzelne DNA-Fragmente entstanden.

Der Ansatz mit den enthaltenen DNA-Fragmenten wurde in die Slots des bereits in der Elektrophoresekammer (Peqlab, Erlangen, Deutschland) befindlichen 3%igen Agarose-Gels (0,9 g Sekam-Agarose, 90 µl Ethidiumbromid, 30 ml 0,5xTBE-Puffer) pipettiert.

Durch die Agarose-Gelelektrophorese wurden dann die DNA-Stränge ihrer Länge nach aufgetrennt, indem eine Spannung von 120 V für 20 min angelegt wurde und so die negativ geladenen DNA-Abschnitte durch die Gelmatrix zur Anode gezogen wurden. Kürzere Fragmente bewegten sich im Vergleich zu längeren schneller durch das Gel.

Durch das Mitlaufen einer kommerziell erhältlichen DNA-Leiter, einer Mischung verschiedener DNA-Stränge bekannter Basenpaarlänge, konnten die Längen der einzelnen Fragmente bestimmt und so der jeweils vorliegende Polymorphismus identifiziert werden. Das unter UV-Licht fluoreszierende Ethidiumbromid lagerte sich während des Gellaufs in die DNA ein, so dass die DNA-Banden nach beendeter Elektrophorese unter dem UV-Transilluminator (AGS, Heidelberg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 320 nm betrachtet werden konnten.

#### a) RFLP des Arg677Trp-Polymorphismus im TLR-2-Gen

Für die Restriktionsspaltung wurde dem PCR-Produkt des 25 µl Ansatzes 0,5 µl des Restriktionsenzym Mwo I und 2 µl des NEB-Puffers 3 hinzupipettiert. Der Verdau dieses Ansatzes erfolgte für 8 Stunden bei 37 °C. Durch das Mismatch, das über den Primer eingeführt

wurde, konnte bei Vorliegen des Wildtyps das Restriktionsenzym das PCR-Produkt schneiden. Im Wildtyp (Arg/Arg) erhielt man daher zwei Fragmente (130 bp und 22 bp). Die DNA-Sequenz des Mutationsgenotyps Trp/Trp stimmte hingegen nicht mit der Zielsequenz des Restriktionsenzym überein, so dass das 152 bp lange Fragment nicht geschnitten werden konnte.

Im Anschluss wurden die DNA-Fragmente durch die Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach erfolgtem Gellauf in der Elektrophorese konnte die Zuordnung zu Wildtyp, heterozygotem Genotyp und Mutationstyp anhand der Laufstrecke der Banden getroffen werden. Im zweiten Slot lief in jedem Agarose-Gel ein unverdautes PCR-Produkt als zusätzliche Längenreferenz mit. Die Bande eines homozygoten Mutationsträger (Trp/Trp) wäre bei 152 bp zu sehen gewesen, jedoch konnte in der gesamten Studiengruppe kein Mutationsträger (homo- sowie heterozygot) ermittelt werden. Die Banden eines homozygoten Wildtyp-Merkmalsträgers (Arg/Arg) waren bei 130 bp sichtbar, wobei das zweite, mit 22 bp kürzere Fragment aufgrund seiner geringen Länge nicht im Gel zu sehen war (Abb. 3).

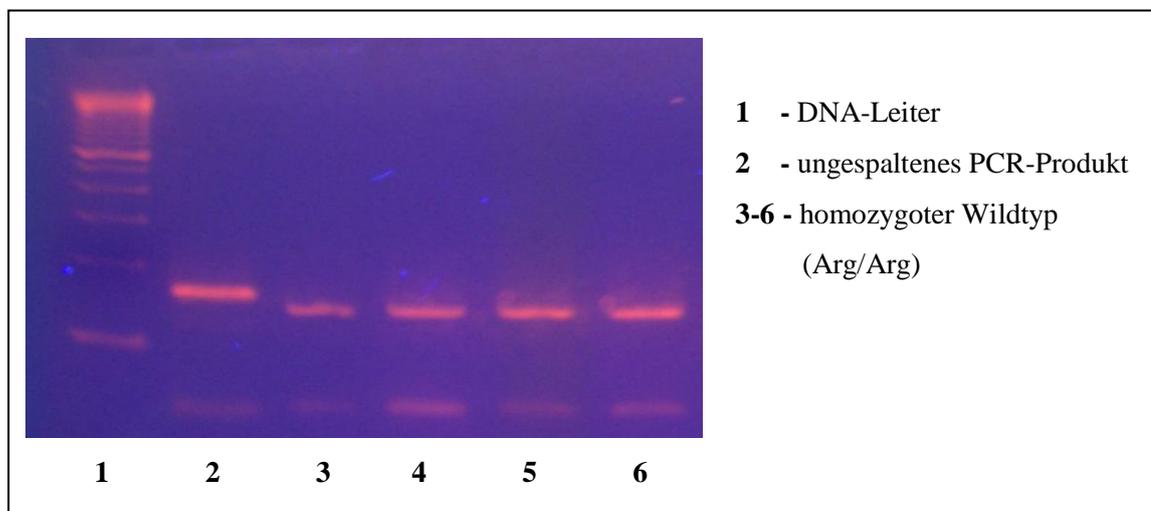


Abb. 3: Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis verschiedener Genotypen des Arg677Trp-Polymorphismus im TLR-2-Gen nach erfolgter Restriktions-Fragment-Längen-Analyse unter UV-Transillumination

#### b) RFLP des Arg753Gln-Polymorphismus im TLR-2-Gen

Der Ansatz für die Restriktionsspaltung bestand aus 25 µl des PCR-Produkts, 0,25 µl des Enzyms Msp I und 2 µl NEB-Puffer 2 und lief 8 Stunden bei 37 °C.

Der durch die PCR entstandene 129 bp lange DNA-Abschnitt wurde so beim homozygoten Wildtyp (Arg/Arg) in ein 104 bp und ein 25 bp langes Fragment gespalten. Aufgrund der veränderten Basenanordnung beim Gln-Mutationstyp war die Zielsequenz des Restriktionsenzym nicht vorhanden und somit konnte das 129 bp lange Fragment nicht

gespalten werden. Nach erfolgtem Elektrophorese-Lauf zeigten sich beim homozygoten Wildtyp (Arg/Arg) Banden auf der Höhe von 104 bp, wobei das zweite Fragment (25 bp) des geschnittenen PCR-Produkts zu kurz war, um im Gel erkennbar zu sein. Beim homozygoten Gln/Gln-Genotyp wäre eine Bande bei 129 bp sichtbar gewesen, jedoch konnte in der gesamten Studiengruppe kein homozygoter Mutationstyp gefunden werden. Das Auftreten von zwei Banden im Gel entsprach einem heterozygoten Arg/Gln-Merkmalsträger (Abb. 4).

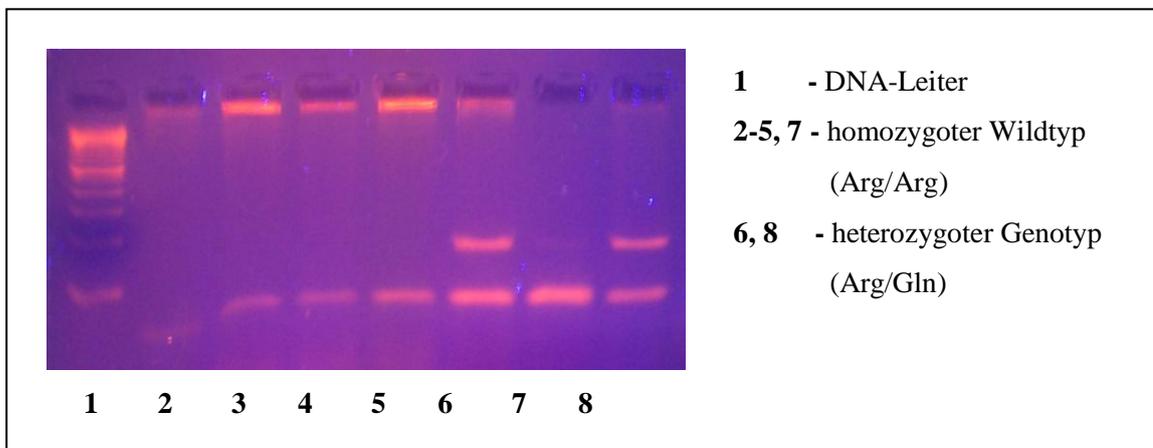


Abb. 4: Agarose-Gelelektrophorese des Arg753Gln-Polymorphismus im TLR-2-Gen nach erfolgter Restriktions-Fragment-Längen-Analyse unter dem UV-Transilluminator

#### Längenanalyse des -94 ins/del ATTG Polymorphismus im NF- $\kappa$ B-Gen

Zur Identifizierung des -94 ins/del ATTG Polymorphismus im NF- $\kappa$ B-Gen wurde eine Elektrophorese (Amersham-Pharmacia, Freiburg Deutschland) in 10%igem Polyacrylamid-Gel gewählt, da der Basenpaarunterschied von lediglich vier Basenpaaren zwischen Insertions- und Deletionstyp zu gering gewesen wäre, um mit einer herkömmlichen Elektrophorese im Agarose-Gel detektiert werden zu können. Zunächst wurde die Gelkammer vorbereitet, indem die Platte mit den Slots mit Repelsilan behandelt und auf die andere Platte mittels Wasserfilm eine Trägerfolie (Gel-Fix ® for PAG) für das Gel aufgerollt wurde. Anschließend wurde das Gel (11 ml H<sub>2</sub>O, 4 ml 5xTBE-Puffer, 5 ml Acrylamid/Bisacrylamid [19:1], 100  $\mu$ l Ammoniumpersulfat [1 mg/ml] und 15  $\mu$ l TEMED) zwischen die Platten gegossen und danach mit Isopropanol überschichtet und ca. 1 Stunde auspolymerisiert. Das Gel wurde auf einem n-Nonan-Film luftblasenfrei in die Elektrophoresekammer gelegt. In 5xTBE-Puffer getränkte Pufferstreifen wurden auf die Gelenden gelegt und die Elektrophorese gestartet. Sie lief 80 min bei 900 V, 50 mA und 30 W. Nach dem Gellauf erfolgte die Silberfärbung. Zunächst wurde das PCR-Produkt durch eine Fixierlösung aus 10%iger Essigsäure und 50%igem Methanol im Gel fixiert, um so ein weiteres Wandern der DNA zu verhindern. Nach zweimaligem Waschen des Gels für jeweils 5 min mit 10%igem Ethanol und 0,5%iger Essigsäure wurde die DNA für 10 min mit einer 0,1%igen Silbernitratlösung gefärbt. Dadurch lagerten sich Silberionen an die

DNA an. Abschließend folgte der Entwicklerschritt, bei dem durch Zugabe von 1,5%igem NaOH, 0,01%igem NaBH<sub>4</sub> und 0,15%igem Formaldehyd die Silberionen zu elementarem Silber reduziert wurden, wodurch die Stellen, an denen sich das PCR-Produkt befand, schwarz gefärbt wurden. Nach jeweils 10 min in 0,75%iger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>- und 10%iger Glycerinlösung konnte das Gel mit einer speziellen luftdurchlässigen Folie überzogen und getrocknet werden, um dann ausgewertet werden zu können.

Im Gel waren nun Banden mit der Länge von 130 bp, die einer homozygoten Deletion entsprachen und Banden von 134 bp, die mit einer homozygoten Insertion korrespondierten, zu sehen. Heterozygote Merkmalsträger wiesen beide Banden auf (Abb. 5).

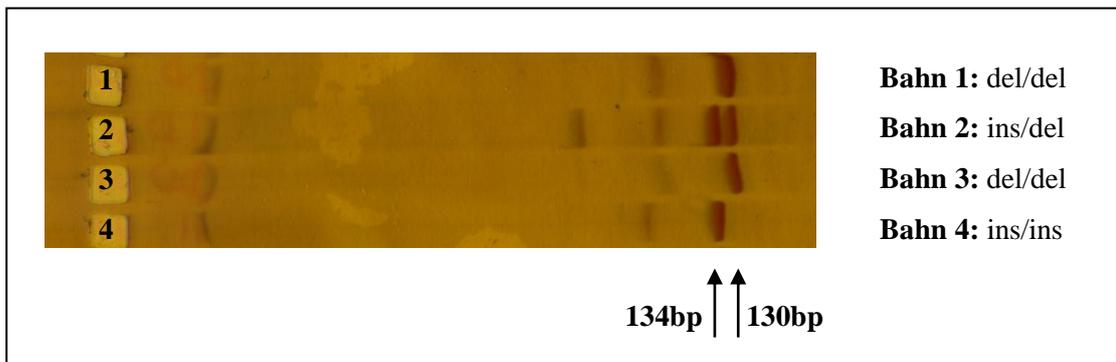


Abb. 5: Darstellung der drei Genotypen des -94 ins/del ATTG Polymorphismus im NF-κB-Gen auf Polyacrylamid-Gel

### 3.2.2 Subgingivale Bestimmung parodontopathogener Keime

Die Bestimmung der fünf parodontopathogenen Markerkeime *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. a.*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*), *Prevotella intermedia* (*P. i.*), *Tannerella forsythia* (*T. f.*) und *Treponema denticola* (*T. d.*) erfolgte mit Hilfe des molekulargenetischen micro-IDent® Tests (HAIN Lifescience, Nehren, Deutschland).

Das Prinzip dieses Tests bestand darin, dass nach Präparation der bakteriellen DNA speziesspezifische DNA-Abschnitte mittels PCR amplifiziert wurden. Nach Aufspaltung der Test-DNA in Einzelstränge wurden diese mit bakterienspezifischen Gensonden versetzt. Im Falle der Komplementarität zwischen Test-DNA und Gensonde bildeten sich DNA-DNA-Hybride. Diese lösten eine Farbreaktion aus, wodurch die Existenz von bakterieller DNA in der Zahnfleischtasche über einer bestimmten Nachweisgrenze angezeigt wurde. War keine bakterielle DNA in der Probe oder war ihr Vorkommen unterhalb der Nachweisgrenze, so unterblieb die Hybridisierung zwischen Test-DNA und Gensonde und es erfolgte keine Farbreaktion.

### Probenentnahme für den molekularbiologischen Nachweis parodontaler Markerkeime

Nach supragingivaler Zahnreinigung und relativer Trockenlegung wurden von den Zähnen mit der jeweils höchsten Sondiertiefe jedes Quadranten subgingivale Plaqueproben mittels steriler Papierspitzen, die für 20 s in die Taschen eingeführt wurden, entnommen. Anschließend wurden die vier Proben in einem Eppendorfröhrchen gepoolt. Die Mittelwerte für Sondiertiefe ( $PD_{\text{bakt.}}$ ) und Attachmentverlust ( $CAL_{\text{bakt.}}$ ) an den Probeentnahmestellen wurden registriert. Das Eppendorfröhrchen wurde kühl gelagert und die Isolation der DNA erfolgte innerhalb von sieben Tagen.

### Bakterielle DNA-Isolation

Die bakterielle DNA wurde mittels QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Hierbei wurden die Papierspitzen mit 180  $\mu\text{l}$  ATL-Puffer und 20  $\mu\text{l}$  Proteinase K für 10 min bei 70 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 200  $\mu\text{l}$  AL-Puffer hinzugegeben, um noch einmal 5 min bei 95 °C zu inkubieren. Die im Puffer gelöste DNA wurde auf eine Säule (QIAamp spin column) pipettiert und zweimal mit jeweils 500  $\mu\text{l}$  der Puffer AW1 und AW2 gewaschen. Abschließend wurde die bakterielle DNA in 400  $\mu\text{l}$  AE-Puffer gelöst und bei -20 °C gelagert.

### PCR

Für die Amplifikation der DNA der fünf parodontopathogenen Markerkeime wurde der micro-IDent® Test von HAIN Lifescience (Nehren, Deutschland) verwendet, wobei 35  $\mu\text{l}$  Mastermix (bestehend aus Puffer, biotinylierter Primer und DNA als Positivkontrolle), 2 U Taq-Polymerase (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und 5  $\mu\text{l}$  der isolierten DNA-Lösung gemixt wurden. Der PCR-Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet. Die PCR erfolgte im Thermocycler nach folgendem Programmierungsprotokoll: 5 min bei 95 °C; 10 Zyklen: 30 s 95 °C, 2 min 58 °C; 20 Zyklen: 25 s 95 °C, 40 s 53 °C, 40 s 70 °C; 8 min 70 °C.

### Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben der Firma HAIN Lifescience. 20  $\mu\text{l}$  des PCR-Produkts und 20  $\mu\text{l}$  der Denaturierungslösung wurden in eine Inkubationswanne pipettiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 1 ml auf 45 °C vorgewärmter Hybridisierungspuffer wurde hinzugegeben und ein mit spezifischen Gensonden beschichteter Membranstreifen so in die Wanne gelegt, dass er vollständig von der Flüssigkeit bedeckt war. Nun wurde die Wanne für 30 min bei 45 °C im Schüttelwasserbad (Eppendorf, Hamburg Deutschland) inkubiert. Danach wurde der Hybridisierungspuffer vollständig entfernt und die Membran mit 1 ml Stringent Waschlösung 15 min bei 45 °C im Wasserbad unter leichtem

Schütteln inkubiert. Nachdem die Stringent-Waschlösung entfernt wurde, wurde der Membranstreifen für 1 min unter ständiger Bewegung mit 1 ml Rinse-Lösung gewaschen, um dann für 30 min mit 1 ml verdünntem Konjugat inkubiert zu werden. Die Lösung wurde abgeschüttet und der Membranstreifen zweimal je 1 min mit 1 ml Rinse-Lösung und einmal mit 1 ml Aqua dest. auf einem Horizontalschüttler gewaschen und wieder abgeschüttet. Nun wurde 1 ml verdünnte Substratlösung zum Membranstreifen hinzupipettiert und lichtgeschützt ohne Schütteln 3-20 min inkubiert. Die Substratreaktion wurde durch zweimaliges kurzes Waschen mit Aqua dest. gestoppt. Auf saugfähigem Papier wurde der Streifen getrocknet, um dann mit Hilfe des dem Kit beiliegenden Auswertungsbogens die Zuordnung der Banden treffen zu können (Abb. 6). Der Nachweis der Bakterien erfolgte visuell über die Farbreaktion mittels alkalischer Phosphatase. Im Test waren zusätzlich zwei Positivkontrollen für die PCR (AC) und die Hybridisierung (CC) enthalten.

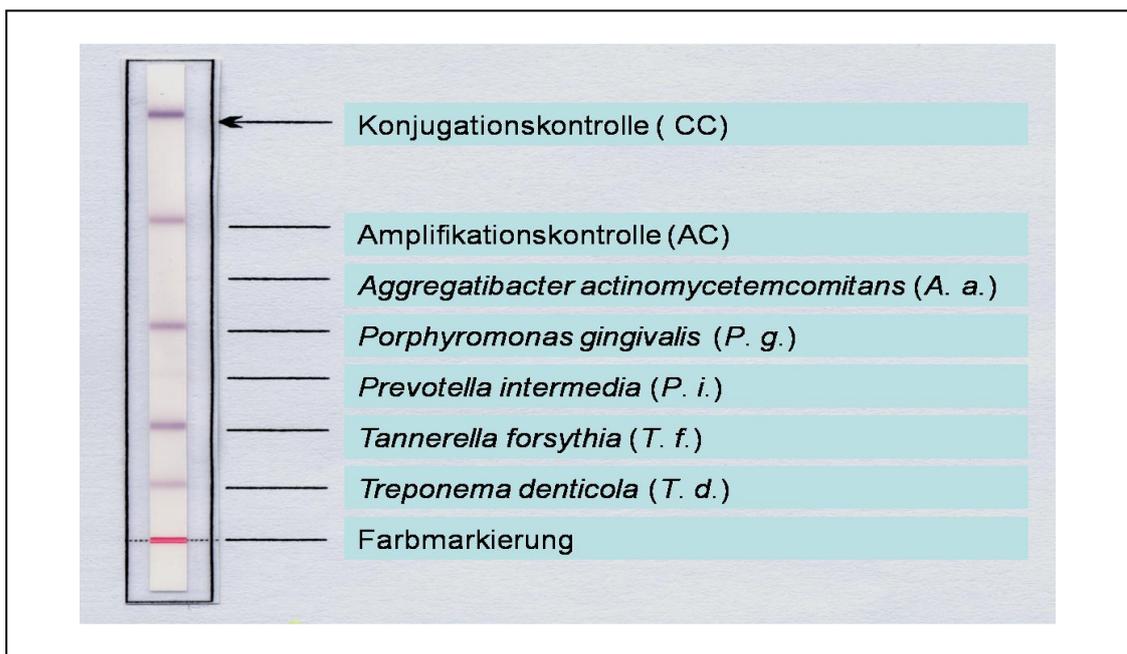


Abb. 6: Darstellung der Hybridisierungsreaktion im molekularbiologischen Nachweisverfahren parodontaler Markerkeime am Beispiel einer Patientenprobe (positiver Bakteriennachweis für *P. g.*, *T. f.* und *T. d.*)

### 3.2.3 Statistische Auswertung

Für die Genotyp-Phänotyp-Assoziationsuntersuchungen wurde als Hypothese sowohl ein rezessives, ein dominantes, als auch ein co-dominantes genetisches Modell geprüft. Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms Microsoft® SPSS für Windows Version 17.0 durchgeführt. Metrische Daten wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung und mittels Levene-Test auf Varianzhomogenität geprüft.

Für die Untersuchung von unabhängigen Stichproben wurde der t-Test nach Student bei Vorliegen einer Normalverteilung sowie der U-Test nach Mann-Whitney für nicht normalverteilte Variablen genutzt. Kategoriale Daten wurden in Kontingenztabelle mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson mit Yates-Korrektur analysiert. Bei einer erwarteten Häufigkeit in einer Gruppe  $< 5$  wurde Fisher's Exakt-Test angewandt. Die binäre logistische Regression (schrittweise vorwärts) wurde verwendet, um den Einfluss des genetischen Polymorphismus auf die Entstehung einer Parodontitis und die subgingivale Besiedlung mit parodontopathogenen Bakterien unter Berücksichtigung etablierter Kofaktoren für Parodontitis oder Keimbesiedlung zu untersuchen. Generell wurde  $p \leq 0,05$  als statistisch signifikant festgelegt.

Die Berechnung der Hardy-Weinberg-Verteilung der untersuchten Genotypen erfolgte mit Hilfe des Programms Excel von Microsoft®-Office.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Statistische Untersuchungen der Studienprobanden

#### **4.1.1 Betrachtung demografischer Parameter in Abhängigkeit von der parodontalen Diagnose**

Beim Vergleich der Patientengruppen mit der parodontitisfreien Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Geschlechterverteilung und des Raucherstatus nachgewiesen werden. Die Patientengruppe mit aggressiver Parodontitis war mit einem Altersunterschied von ca. sechs Jahren signifikant jünger im Vergleich zur Kontrollgruppe. In beiden Patientengruppen (aggressive und chronische Parodontitis) kam eine Parodontitis innerhalb der Familie signifikant häufiger vor. Mehr Parodontitispatienten als Kontrollprobanden berichteten in der Anamnese über einen frühzeitigen Zahnverlust durch „Zahnlockerung“ bei Verwandten ersten Grades. Die erhobenen demografischen Daten sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tab. 6: Demografische Daten der Studienprobanden in Abhängigkeit von der parodontalen Diagnose

	<b>AP n=78</b>	<b>CP n=63</b>	<b>Patientengruppe AP + CP n=141</b>	<b>G n=81</b>
<b>Altersmittelwert (Jahre) ± Standardabweichung</b>	<b>40,6 ± 9,9*</b>	48,6 ± 9,6	44,2 ± 10,5	46,6 ± 10,9
<b>Frauen (%)</b>	61,5	65,1	63,1	51,9
<b>Raucher (%)</b>	35,9	28,8	30,5	22,2
<b>familiäre Häufung (%) **</b>	<b>54,2*</b>	<b>41,4*</b>	<b>48,5*</b>	9,8

AP: aggressive Parodontitis, CP: chronische Parodontitis, G: parodontitisfreie Kontrollgruppe

\*  $p < 0,001$ , signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe

\*\*familiäre Häufigkeit der Parodontitis; nach anamnestischer Angabe, wenn Familienmitglied ersten Grades frühzeitigen Zahnverlust durch „Zahnlockerung“ erlitt

#### **4.1.2 Vergleich klinisch-parodontologischer Daten unter Berücksichtigung der parodontalen Diagnose**

In den Patientengruppen waren die klinischen Parameter approximaler Plaque Index (mit Ausnahme AP-Patienten), die Sondierblutung, die Sondiertiefe und der klinische Attachmentverlust im Vergleich zu den parodontitisfreien Kontrollprobanden signifikant erhöht. Weiterhin lag der prozentuale Anteil von Zähnen mit Sondiertiefen bzw. einem Attachmentverlust von

4-6 mm und > 6 mm in beiden Patientengruppen bei ca. 80 % und damit im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höher. Parodontitispatienten wiesen im Vergleich zu den parodontitisfreien Probanden eine höhere Anzahl fehlender Zähne auf (Tab. 7).

Tab. 7: Klinische Daten und prozentualer Anteil von Zähnen mit Sondiertiefen und Attachmentverlust von < 4 mm, 4-6 mm und > 6 mm in Abhängigkeit von der parodontalen Diagnose

	<b>AP</b> n=78	<b>CP</b> n=63	<b>Patientengruppe</b> <b>AP + CP</b> n=141	<b>G</b> n=81
<b>API</b> ± SD (%)	52,3 ± 28,5	60,5 ± 25,6*	56,0 ± 27,5*	47,5 ± 21,5
<b>BOP</b> ± SD (%)	78,1 ± 22,7*	69,5 ± 24,9*	74,2 ± 24,0*	45,7 ± 23,7
<b>PD</b> ± SD (mm)	5,7 ± 1,4*	5,2 ± 1,1*	5,5 ± 1,3*	2,6 ± 0,8
<b>CAL</b> ± SD (mm)	6,5 ± 1,5*	5,9 ± 1,4*	6,2 ± 1,5*	3,0 ± 0,8
<b>PD<sub>bakt.</sub></b> ± SD (mm)	7,5 ± 1,6*	6,8 ± 1,5*	7,2 ± 1,6*	3,1 ± 0,4
<b>CAL<sub>bakt.</sub></b> ± SD (mm)	8,4 ± 1,8*	7,5 ± 1,8*	8,0 ± 1,9*	3,3 ± 0,5
<b>PD &lt; 4 mm (%)</b>				
	20,1 ± 19,9*	23,5 ± 19,9*	21,6 ± 19,9*	96,0 ± 7,9
<b>PD 4-6 mm (%)</b>				
	45,4 ± 22,5*	48,3 ± 20,1*	46,7 ± 21,4*	4,4 ± 8,5
<b>PD &gt; 6 mm (%)</b>				
	34,5 ± 23,9*	28,9 ± 23,5*	32,0 ± 23,8*	0,0 ± 0,0
<b>CAL &lt; 4 mm (%)</b>				
	12,8 ± 15,1*	14,6 ± 17,2*	13,6 ± 16,0*	84,1 ± 18,2
<b>CAL 4-6 mm (%)</b>				
	41,1 ± 21,0*	47,3 ± 20,9*	43,8 ± 21,1*	16,0 ± 18,2
<b>CAL &gt; 6 mm (%)</b>				
	46,5 ± 25,4*	37,7 ± 26,3*	42,6 ± 26,1*	0,1 ± 0,9
<b>Fehlende Zähne</b>				
<b>(außer 8er) ± SD</b>	3,6±3,8*	4,1±3,4*	3,8±3,7*	2,6 ± 2,8

AP: aggressive Parodontitis, CP: chronische Parodontitis, G: parodontitisfreie Kontrollgruppe, SD: Standardabweichung, API: approximaler Plaque Index, BOP: Sondierblutung, PD: klinische Sondiertiefe, CAL: klinischer Attachmentverlust, <sub>bakt.</sub>: bakterielle Entnahmestelle

\* p ≤ 0,05, signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe

#### 4.1.3 Auftreten subgingivaler Parodontopathogene in den einzelnen parodontalen Diagnosegruppen

In beiden Patientengruppen wurden bei mehr Probanden die parodontopathogenen Bakterien *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* und *T. denticola* im Vergleich zur parodontitisfreien Kontrollgruppe nachgewiesen (Tab. 8). Nur die Anzahl *A. actinomycetemcomitans*-positiver CP-Patienten unterschied sich dabei nicht signifikant von der Anzahl *A. actinomycetemcomitans*-infizierter Kontrollprobanden.

Tab. 8: Prozentualer Anteil von Probanden mit positivem Bakteriennachweis in Abhängigkeit von der parodontalen Diagnose

	<b>AP</b> n=78	<b>CP</b> n=63	<b>Patientengruppe</b> <b>AP + CP</b> n=141	<b>G</b> n=81
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (%)	<b>41,0*</b>	31,7	<b>36,9*</b>	19,8
<i>P. gingivalis</i> (%)	<b>78,2*</b>	<b>87,3*</b>	<b>82,3*</b>	23,5
<i>P. intermedia</i> (%)	<b>64,1*</b>	<b>61,9*</b>	<b>63,1*</b>	33,3
<i>T. forsythia</i> (%)	<b>85,9*</b>	<b>96,8*</b>	<b>90,8*</b>	69,1
<i>T. denticola</i> (%)	<b>87,2*</b>	<b>98,4*</b>	<b>92,2*</b>	64,2
<b>roter Komplex</b> <i>P. g.</i> + <i>T. f.</i> + <i>T. d.</i> (%)	<b>71,8*</b>	<b>82,5*</b>	<b>76,6*</b>	23,5

AP: aggressive Parodontitis, CP: chronische Parodontitis, G: parodontitisfreie Kontrollgruppe

\*  $p \leq 0,05$ , signifikant im Vergleich zu der parodontitisfreien Kontrollgruppe

#### **4.2 Untersuchung zum Arg677Trp-Polymorphismus im TLR-2-Gen**

Unter allen Studienteilnehmern konnte nur der homozygote Genotyp Arg/Arg nachgewiesen werden, nicht aber die Mutationsgenotypen Arg/Trp oder Trp/Trp. Damit konnten Assoziationen des Arg677Trp-Polymorphismus im TLR-2-Gen zur Präsenz der Parodontitis, zu bestimmten klinischen Parametern der Parodontitis sowie zur subgingivalen Besiedlung mit parodontalen Leitkeimen ausgeschlossen werden.

#### **4.3 Statistische Untersuchungen zum Einfluss des Arg753Gln-Polymorphismus im TLR-2-Gen**

Das Vorkommen der Genotypen Arg/Arg und Arg/Gln in der parodontitisfreien Kontrollgruppe und den Patientengruppen entsprach einer Hardy-Weinberg-Verteilung. In der gesamten Untersuchungsgruppe konnte kein homozygoter Gln/Gln-Genotypträger ermittelt werden.

##### **4.3.1 Genotyp- und Allelverteilung des Arg753Gln-Polymorphismus unter Berücksichtigung der parodontalen Diagnose**

Weder die untersuchten Genotypen Arg/Arg, Arg/Gln noch die Allele Arg oder Gln waren zur AP, CP oder Gesamtparodontitisgruppe statistisch signifikant assoziiert. Dennoch konnten unter allen Patientengruppen tendenziell erhöhte Frequenzen für den Genotyp Arg/Gln sowie das Allel Gln nachgewiesen werden (Tab. 9).

Tab. 9: Häufigkeiten und Signifikanzen der Genotyp- und Allelfrequenzen des Arg753Gln-Polymorphismus unter Berücksichtigung der parodontalen Diagnose

	AP	CP	Patientengruppe AP + CP	G	AP	CP	AP + CP
					im Vergleich zur Kontrollgruppe		
<b>Genotypverteilung</b>							
	<b>n=77</b>	<b>n=62</b>	<b>n=139</b>	<b>n=81</b>			
<b>Arg/Arg (%)</b>	93,5	93,5	93,5	97,5			
<b>Arg/Gln (%)</b>	6,5	6,5	6,5	2,5	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Allelverteilung</b>							
	<b>n=154</b>	<b>n=124</b>	<b>n=278</b>	<b>n=162</b>			
<b>Arg (%)</b>	96,8	96,8	96,8	98,8			
<b>Gln (%)</b>	3,2	3,2	3,2	1,2	n.s.	n.s.	n.s.

AP: aggressive Parodontitis, CP: chronische Parodontitis, G: parodontitisfreie Kontrollgruppe, n.s.: nicht signifikant

#### 4.3.2 Vergleich der Genotypen des Arg753Gln-Polymorphismus hinsichtlich der demografischen Daten

In Bezug auf das Alter, die Geschlechterverteilung, den Raucherstatus und die anamnestisch bestimmte familiäre Häufigkeit der Parodontitis ergaben sich in allen Studienkohorten keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der individuellen Präsenz des Arg/Arg- oder Arg/Gln-Genotyps (Tab. 10).

Tab. 10: Demografische Daten in den einzelnen Studiengruppen in Abhängigkeit von der Genotypverteilung des Arg753Gln-Polymorphismus

		<b>Arg/Arg- Genotyp</b>	<b>Arg/Gln- Genotyp</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Altersmittelwert (Jahre) ± Standardabweichung</b>	AP	40,9 ± 9,9	37,8 ± 10,1	n.s.
	CP	48,6 ± 9,4	46,5 ± 15,1	n.s.
	AP + CP	44,3 ± 10,4	41,7 ± 12,6	n.s.
	G	46,5 ± 11,0	52,5 ± 6,4	n.s.
	S	45,5 ± 10,7	43,6 ± 12,3	n.s.

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle 10:

		<b>Arg/Arg- Genotyp</b>	<b>Arg/Gln- Genotyp</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Frauen (%)</b>	AP	62,5	60,0	n.s.
	CP	63,8	75,0	n.s.
	AP + CP	63,1	66,7	n.s.
	G	51,9	50,0	n.s.
	S	58,9	63,6	n.s.
<b>Raucher (%)</b>	AP	36,1	40,6	n.s.
	CP	22,4	25,0	n.s.
	AP + CP	30,0	33,3	n.s.
	G	22,8	0,0	n.s.
	S	27,3	27,3	n.s.
<b>familiäre Häufung (%) *</b>	AP	56,1	40,0	n.s.
	CP	41,5	33,3	n.s.
	AP + CP	49,6	37,5	n.s.
	G	10,2	0,0	n.s.
	S	36,5	30,0	n.s.

AP: aggressive Parodontitis, CP: chronische Parodontitis, G: parodontitisfreie Kontrollgruppe, S: gesamte Studiengruppe, n.s.: nicht signifikant

\*der Parodontalerkrankung; nach anamnestischer Angabe, wenn Familienmitglied ersten Grades frühzeitigen Zahnverlust durch „Zahnlockerung“ erlitt

#### **4.3.3 Vergleich der Genotypen des Arg753Gln-Polymorphismus unter Berücksichtigung der klinisch-parodontologischen Daten**

In der parodontitisfreien Kontrollgruppe hatten Probanden mit dem Genotyp Arg/Gln einen signifikant höheren approximalen Plaque Index im Vergleich zu Arg/Arg-Merkmalsträgern. Alle anderen klinischen Daten waren in Abhängigkeit von der Genotypverteilung nicht signifikant unterschiedlich (Tab. 11).

Tab. 11: Klinisch-parodontologische Daten in Abhängigkeit von der Genotypverteilung des Arg753Gln-Polymorphismus

		<b>Arg/Arg-Genotyp</b>	<b>Arg/Gln-Genotyp</b>	<b>p-Wert</b>
<b>API ± SD (%)</b>	AP	52,7 ± 28,2	44,7 ± 38,4	n.s.
	CP	59,9 ± 27,2	62,7 ± 32,9	n.s.
	AP + CP	55,9 ± 27,2	52,7 ± 34,9	n.s.
	<b>G</b>	<b>46,7 ± 21,2</b>	<b>77,2 ± 14,2</b>	<b>p=0,047</b>
	S	52,3 ± 25,3	57,6 ± 32,8	n.s.
<b>BOP ± SD (%)</b>	AP	78,7 ± 21,8	80,6 ± 27,3	n.s.
	CP	70,0 ± 24,2	51,0 ± 36,4	n.s.
	AP + CP	74,8 ± 23,2	69,5 ± 32,2	n.s.
	G	45,7 ± 23,4	47,2 ± 49,1	n.s.
	S	63,7 ± 65,5	65,1 ± 34,1	n.s.
<b>PD ± SD (mm)</b>	AP	5,7 ± 1,4	5,9 ± 1,4	n.s.
	CP	5,4 ± 1,1	5,5 ± 1,2	n.s.
	AP + CP	5,4 ± 1,3	5,7 ± 1,3	n.s.
	G	2,6 ± 0,8	2,7 ± 0,7	n.s.
	S	4,4 ± 1,8	5,2 ± 1,7	n.s.
<b>CAL ± SD (mm)</b>	AP	6,5 ± 1,5	6,6 ± 1,7	n.s.
	CP	5,8 ± 1,3	6,0 ± 2,0	n.s.
	AP + CP	6,2 ± 1,5	6,3 ± 1,8	n.s.
	G	3,0 ± 0,8	3,0 ± 1,1	n.s.
	S	5,0 ± 2,0	5,7 ± 2,1	n.s.
<b>PD<sub>bakt.</sub> ± SD (mm)</b>	AP	7,5 ± 1,6	7,4 ± 0,8	n.s.
	CP	6,8 ± 1,5	7,1 ± 2,6	n.s.
	AP + CP	7,2 ± 1,6	7,3 ± 1,5	n.s.
	G	3,1 ± 0,4	3,4 ± 0,5	n.s.
	S	5,6 ± 2,4	6,5 ± 2,1	n.s.
<b>CAL<sub>bakt.</sub> ± SD (mm)</b>	AP	8,4 ± 1,8	8,5 ± 1,3	n.s.
	CP	7,5 ± 1,7	8,2 ± 4,4	n.s.
	AP + CP	8,0 ± 1,8	8,4 ± 2,6	n.s.
	G	3,3 ± 0,5	3,4 ± 0,5	n.s.
	S	6,2 ± 2,7	7,4 ± 3,1	n.s.

AP: aggressive Parodontitis, CP: chronische Parodontitis, G: parodontitisfreie Kontrollgruppe, S: gesamte Studiengruppe, SD: Standardabweichung, API: approximaler Plaque Index, BOP: Sondierblutung, PD: klinische Sondiertiefe, CAL: klinischer Attachmentverlust, <sub>bakt.</sub>: bakterielle Entnahmestelle, n.s.: nicht signifikant

#### 4.3.4 Auftreten subgingivaler Bakterien unter Berücksichtigung der Genotypen des Arg753Gln-Polymorphismus

In der parodontitisfreien Kontrollgruppe waren heterozygote Mutationsträger (Arg/Gln, n=2) zu 100 % mit *A. actinomycetemcomitans* infiziert, während bei nur 17,7 % der homozygoten Kontrollprobanden (Arg/Arg, n=14) *A. actinomycetemcomitans* nachgewiesen werden konnte. In der Gesamtstudiengruppe wiesen Arg/Gln-Genotypträger signifikant häufiger eine subgingivale Besiedlung mit Bakterien des roten Komplexes auf (Tab. 12).

Tab. 12: Prozentualer Anteil von Probanden mit positivem Bakteriennachweis in Abhängigkeit vom Arg753Gln-Polymorphismus

		Arg/Arg-Genotyp	Arg/Gln-Genotyp	p-Wert	Odds Ratio	Konfidenzintervall (95%)
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (%)	AP	40,3	40,0	n.s.	<b>5,65</b>	<b>3,57 – 9,09</b>
	CP	31,0	0,0	n.s.		
	AP + CP	37,7	22,2	n.s.		
	<b>G</b>	<b>17,7</b>	<b>100,0</b>	<b>0,037</b>		
	S	30,1	36,4	n.s.		
<i>P. gingivalis</i> (%)	AP	79,2	60,0	n.s.		
	CP	86,2	100,0	n.s.		
	AP + CP	82,3	77,8	n.s.		
	G	21,5	100,0	n.s.		
	S	59,3	81,8	n.s.		
<i>P. intermedia</i> (%)	AP	63,9	60,0	n.s.		
	CP	63,8	50,0	n.s.		
	AP + CP	63,8	55,6	n.s.		
	G	31,6	100,0	n.s.		
	S	51,7	63,6	n.s.		
<i>T. forsythia</i> (%)	AP	86,1	80,0	n.s.		
	CP	96,6	100,0	n.s.		
	AP + CP	90,8	88,9	n.s.		
	G	68,4	100,0	n.s.		
	S	82,3	90,9	n.s.		

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tab. 12:

		<b>Arg/Arg- Genotyp</b>	<b>Arg/Gln- Genotyp</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Odds Ratio</b>	<b>Konfidenz- intervall (95%)</b>
<b><i>T. denticola</i> (%)</b>	AP	86,1	100,0	n.s.		
	CP	98,3	100,0	n.s.		
	AP + CP	91,5	100,0	n.s.		
	G	63,3	100,0	n.s.		
	S	80,9	100,0	n.s.		
<b>roter Komplex <i>P. g.</i> + <i>T. f.</i> + <i>T. d.</i> (%)</b>	AP	70,8	80,0	n.s.		
	CP	81,0	100,0	n.s.		
	AP + CP	75,4	88,9	n.s.		
	G	21,5	100,0	n.s.		
	<b>S</b>	<b>55,0</b>	<b>90,9</b>	<b>0,026</b>	<b>8,174</b>	<b>1,03 – 65,01</b>

AP: aggressive Parodontitis, CP: chronische Parodontitis, G: parodontitisfreie Kontrollgruppe, S: gesamte Studiengruppe, n.s.: nicht signifikant

#### **4.3.5 Binäre logistische Regression zur Beurteilung des Einflusses des Arg/Gln-Genotyps auf die subgingivale Besiedlung mit *A. actinomycetemcomitans* und Bakterien des roten Komplexes im multivariaten Modell**

Die in der bivariaten Analyse auffälligen Assoziationen des Genotyps Arg/Gln zu den parodontalen Markerkeimen sollten in einer multivariaten Analyse überprüft werden. Dazu wurde die Assoziation des Genotyps Arg/Gln zur Präsenz von *A. actinomycetemcomitans* in der gesunden Kontrollgruppe mittels binärer logistischer Regression unter Berücksichtigung der Kofaktoren Alter, Sondiertiefen an den bakteriellen Entnahmestellen, Geschlecht und Raucherstatus untersucht. Sowohl der Genotyp Arg/Gln als auch alle anderen Kofaktoren hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Vorkommen von *A. actinomycetemcomitans*. Auch die im bivariaten Vergleich nachgewiesene Assoziation des Genotyps Arg/Gln in der Gesamtstudien- gruppe zu den Bakterien des roten Komplexes konnte im multivariaten Modell nicht bestätigt werden. Stattdessen stellten die Kofaktoren Patientenalter und Sondiertiefe an den Probeentnahmestellen signifikante Einflussfaktoren dar (Tab. 13).

Tab. 13: Binäre logistische Regression (schrittweise vorwärts) zur Überprüfung der Assoziation des Arg/Gln-Genotyps zum Nachweis von Bakterien des roten Komplexes in der Gesamtstudien­gruppe in Abhängigkeit von den Kofaktoren Alter, PD<sub>bakt.</sub> Geschlecht und Raucherstatus

Signifikante Variable	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert	Odds Ratio	Konfidenzintervall (95 %)
<i>Variablen im Modell:</i>					
Alter	0,045	0,015	0,003	<b>1,05</b>	1,02 - 1,08
PD <sub>bakt.</sub> (mm)	0,517	0,079	< 0,001	<b>1,68</b>	1,44 - 1,96
<i>Variablen außerhalb des Modells:</i>					
Arg/Gln-Genotyp			0,056		
Geschlecht (♂)			0,641		
Raucher			0,530		

PD<sub>bakt.</sub>: Mittelwert der Sondiertiefen an den bakteriellen Entnahmestellen

#### **4.4 Statistische Untersuchungen zum Einfluss des -94 ins/del ATTG Promotorpolymorphismus im NF-κB-Gen**

Die Verteilung der Genotypen ins/ins, ins/del und del/del in der parodontitisfreien Kontrollgruppe und den Patientengruppen entsprach dem Hardy-Weinberg-Gesetz.

##### **4.4.1 Genotyp- und Allelverteilung des -94 ins/del ATTG Polymorphismus unter Berücksichtigung der parodontalen Diagnose**

Patienten mit aggressiver Parodontitis waren im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden mehr als doppelt so häufig Träger des homozygoten Genotyps -94 del/del. Tendenziell kam der del/del-Genotyp auch in der CP- und Gesamtparodontitisgruppe häufiger vor. Die Allelfrequenzen unterschieden sich dagegen nicht signifikant voneinander. Fasste man die Genotypen ins/ins und ins/del zu einem ins-dominanten Modell zusammen, so wurde für del/del-Genotypträger eine 2,7fach erhöhte Odds Ratio ermittelt, an aggressiver Parodontitis zu erkranken (95 % Konfidenzintervall: 1,11-6,76) (Tab. 14).

Tab. 14: Verteilungen und Signifikanzen der Genotyp- und der Allelfrequenzen des NF-κB -94 ins/del ATTG Polymorphismus innerhalb der parodontalen Diagnosen

	AP	CP	Patientengruppe AP + CP	G	AP	CP	AP + CP
					im Vergleich zur Kontrollgruppe		
<b>Genotypverteilung</b>							
	n=78	n=63	n=141	n=81			
<b>ins/ins (%)</b>	35,9	36,5	36,1	34,6			
<b>ins/del (%)</b>	41,0	47,6	44,0	55,5			
<b>del/del (%)</b>	23,1	15,9	19,9	9,9	<b>0,05</b>	n.s.	n.s.
<b>ins-dominantes genetisches Modell: del/del vs. ins/ins + ins/del</b>							
<b>del/del (%)</b>	23,1	15,9	19,9	9,9	<b>OR=2,7</b>		
<b>ins/ins + ins/del (%)</b>	76,9	84,1	80,1	90,1	<b>0,024 (0,042*)</b>	n.s.	n.s.
<b>Allelverteilung</b>							
	n=156	n=126	n=282	n=162			
<b>ins (%)</b>	56,4	60,3	58,2	62,3			
<b>del (%)</b>	43,6	39,7	41,8	37,7	n.s	n.s.	n.s.

AP: aggressive Parodontitis, CP: chronische Parodontitis, G: parodontitisfreie Kontrollgruppe, n.s.: nicht signifikant, OR: Odds Ratio

\* Yates korrigierter p-Wert

#### 4.4.2 Demografische Daten in Abhängigkeit von der Genotypverteilung des -94 ins/del ATTG Polymorphismus

Beim Vergleich der ins/ins- und ins/del-Genotypen mit dem del/del-Genotyp konnten bezüglich der demografischen Parameter Alter, Geschlecht, Raucherstatus und familiärer Häufung keine signifikanten Unterschiede gefunden werden (Tab. 15).

Tab. 15: Abhängigkeit der demografischen Daten von der Genotypverteilung des NF-κB -94 ins/del ATTG Polymorphismus

		<b>ins/ins + ins/del- Genotyp</b>	<b>del/del- Genotyp</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Altersmittelwert (Jahre) ± Standardabweichung</b>	AP	41,3 ± 9,1	38,5 ± 12,2	n.s.
	CP	48,4 ± 9,5	50,0 ± 10,5	n.s.
	AP + CP	44,6 ± 9,9	42,6 ± 12,7	n.s.
	G	47,1 ± 11,1	42,8 ± 8,1	n.s.
	S	45,6 ± 10,5	42,6 ± 11,7	n.s.
<b>Frauen (%)</b>	AP	63,3	55,6	n.s.
	CP	66,0	60,0	n.s.
	AP + CP	64,6	57,1	n.s.
	G	52,1	50,0	n.s.
	S	49,7	55,6	n.s.
<b>Raucher (%)</b>	AP	36,7	33,3	n.s.
	CP	24,5	20,0	n.s.
	AP + CP	31,0	28,6	n.s.
	G	21,9	25,0	n.s.
	S	27,4	27,8	n.s.
<b>familiäre Häufung (%)*</b>	AP	54,5	52,9	n.s.
	CP	42,6	30,0	n.s.
	AP + CP	49,0	44,4	n.s.
	G	11,1	0,0	n.s.
	S	35,9	35,3	n.s.

AP: aggressive Parodontitis, CP: chronische Parodontitis, G: parodontitisfreie Kontrollgruppe, S: gesamte Studiengruppe, n.s.: nicht signifikant

\*der Parodontalerkrankung; nach anamnestischer Angabe, wenn Familienmitglied ersten Grades frühzeitigen Zahnverlust durch „Zahnlockerung“ erlitt

#### 4.4.3 Klinisch-parodontologische Daten im Zusammenhang mit der Genotypverteilung des -94 ins/del ATTG Polymorphismus

Alle klinischen Parameter zeigten keine Assoziation zu den untersuchten Genotypen des NF-κB-Polymorphismus (Tabelle 16).

Tab. 16: Abhängigkeit der klinisch-parodontologischen Daten vom Genotyp des NF-κB -94 ins/del ATTG Polymorphismus

		<b>ins/ins + ins/del- Genotyp</b>	<b>del/del- Genotyp</b>	<b>p-Wert</b>
<b>API ± SD (%)</b>	AP	53,6 ± 30,4	48,4 ± 22,6	n.s.
	CP	60,8 ± 25,2	59,3 ± 29,1	n.s.
	AP + CP	57,0 ± 28,1	52,3 ± 25,1	n.s.
	G	47,8 ± 21,5	44,8 ± 22,9	n.s.
	S	53,1 ± 25,9	50,7 ± 24,5	n.s.
<b>BOP ± SD (%)</b>	AP	81,1 ± 20,6	68,7 ± 26,7	n.s.
	CP	69,6 ± 25,4	68,6 ± 22,8	n.s.
	AP + CP	75,7 ± 23,6	68,7 ± 25,0	n.s.
	G	45,9 ± 23,4	44,6 ± 28,7	n.s.
	S	63,8 ± 27,6	63,3 ± 27,4	n.s.
<b>PD ± SD (mm)</b>	AP	5,7 ± 1,5	5,6 ± 1,1	n.s.
	CP	5,2 ± 1,2	4,9 ± 0,8	n.s.
	AP + CP	5,5 ± 1,4	5,3 ± 1,0	n.s.
	G	2,6 ± 0,8	2,4 ± 0,2	n.s.
	S	4,4 ± 1,8	4,7 ± 1,5	n.s.
<b>CAL ± SD (mm)</b>	AP	6,6 ± 1,6	6,2 ± 1,3	n.s.
	CP	5,9 ± 1,5	5,7 ± 0,9	n.s.
	AP + CP	6,3 ± 1,5	6,0 ± 1,2	n.s.
	G	3,0 ± 1,0	2,7 ± 0,4	n.s.
	S	5,0 ± 2,1	5,3 ± 1,7	n.s.
<b>PD<sub>bakt.</sub> ± SD (mm)</b>	AP	7,4 ± 1,5	7,6 ± 1,7	n.s.
	CP	6,9 ± 1,5	6,1 ± 1,6	n.s.
	AP + CP	7,2 ± 1,5	7,1 ± 1,8	n.s.
	G	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,3	n.s.
	S	5,6 ± 2,3	6,2 ± 2,3	n.s.
<b>CAL<sub>bakt.</sub> ± SD (mm)</b>	AP	8,4 ± 1,7	8,5 ± 1,9	n.s.
	CP	7,5 ± 1,9	7,3 ± 1,6	n.s.
	AP + CP	8,0 ± 1,9	8,1 ± 1,9	n.s.
	G	3,3 ± 0,5	3,3 ± 0,6	n.s.
	S	6,2 ± 2,7	7,0 ± 2,7	n.s.

AP: aggressive Parodontitis, CP: chronische Parodontitis, G: parodontitisfreie Kontrollgruppe, S: gesamte Studiengruppe, SD: Standardabweichung, API: approximaler Plaque Index, BOP: Sondierblutung, PD: klinische Sondiertiefe, CAL: klinischer Attachmentverlust, <sub>bakt.</sub>: bakterielle Entnahmestelle, n.s.: nicht signifikant

#### 4.4.4 Auftreten subgingivaler Bakterien unter Berücksichtigung der Genotypen des -94 ins/del ATTG Polymorphismus

In der Gesamtstudien­gruppe waren Träger des del/del-Genotyps signifikant häufiger *A. actinomycetemcomitans*-positiv. Dagegen waren del/del-positive Patienten mit AP signifikant seltener mit *T. denticola* oder Bakterien des roten Komplexes (*P. g.*, *T. f.* und *T. d.*) infiziert. Die letztgenannte Assoziation wurde auch für die Gesamtparodontitisgruppe nachgewiesen (Tab. 17).

Tab. 17: Prozentualer Anteil von Probanden mit positivem Bakteriennachweis in Abhängigkeit von der Genotypverteilung des NF-κB -94 ins/del ATTG Polymorphismus

		ins/ins +	del/del-	p-Wert	Odds Ratio	Konfidenzintervall (95%)
		ins/del-	Genotyp			
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (%)	AP	40,0	44,4	n.s.	2,37	1,14 – 4,91
	CP	26,4	60,0	n.s.		
	AP + CP	33,6	50,0	n.s.		
	G	17,8	37,5	n.s.		
	S	<b>27,4</b>	<b>47,2</b>	<b>0,018</b> <b>0,031*</b>		
<i>P. gingivalis</i> (%)	AP	81,7	66,7	n.s.		
	CP	88,7	80,0	n.s.		
	AP + CP	55,0	71,4	n.s.		
	G	23,3	25,0	n.s.		
	S	60,8	61,1	n.s.		
<i>P. intermedia</i> (%)	AP	63,3	66,7	n.s.		
	CP	62,3	60,0	n.s.		
	AP + CP	62,8	64,3	n.s.		
	G	34,2	25,0	n.s.		
	S	51,6	55,6	n.s.		

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle 17:

		ins/ins + ins/del-	del/del-	p-Wert	Odds Ratio	Konfidenz- intervall (95%)
		Genotyp				
<i>T. forsythia</i> (%)	AP	88,3	77,8	n.s.		
	CP	98,1	90,0	n.s.		
	AP + CP	92,9	82,1	n.s.		
	G	69,9	62,5	n.s.		
	S	83,9	77,8	n.s.		
<i>T. denticola</i> (%)	AP	<b>91,7</b>	<b>72,2</b>	<b>0,045</b>	<b>0,24</b>	<b>0,06 – 0,94</b>
	CP	98,1	100,0	n.s.		
	AP + CP	<b>94,7</b>	<b>82,1</b>	<b>0,042</b>	<b>0,26</b>	<b>0,07 – 0,92</b>
	G	64,4	62,5	n.s.		
	S	82,8	77,8	n.s.		
roter Komplex <i>P. g.</i> + <i>T. f.</i> + <i>T. d.</i> (%)	AP	<b>78,3</b>	<b>50,0</b>	<b>0,019</b> <b>0,041*</b>	<b>0,28</b>	<b>0,09 – 0,84</b>
	CP	83,0	80,0	n.s.		
	AP + CP	<b>80,5</b>	<b>60,7</b>	<b>0,027</b> <b>0,049*</b>	<b>0,38</b>	<b>0,15 – 0,91</b>
	G	23,3	25,0	n.s.		
	S	58,1	52,8	n.s.		

AP: aggressive Parodontitis, CP: chronische Parodontitis, G: parodontitisfreie Kontrollgruppe, S: gesamte Studiengruppe, n.s.: nicht signifikant

\* Yates korrigierter p-Wert

#### 4.4.5 Binäre logistische Regression zur Beurteilung des Einflusses des del/del-Genotyps für das Auftreten von aggressiver Parodontitis

In der Gesamtstudiengruppe erhöhte der homozygote del/del-Genotyp des NF-κB-Gens nach Adjustierung für die Kofaktoren Alter, männliches Geschlecht, Raucherstatus und API die Odds Ratio für eine aggressive Parodontitis (Tab. 18).

Tab. 18: Binäre logistische Regression (schrittweise vorwärts) für das Auftreten einer aggressiven Parodontitis unter Berücksichtigung der Kofaktoren Alter, männliches Geschlecht, Raucherstatus und API.

<b>Signifikante Variable</b>	<b>Regressionskoeffizient</b>	<b>Standardabweichung</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Odds Ratio</b>	<b>Konfidenzintervall (95%)</b>
<i>Variablen im Modell:</i>					
<b>del/del Genotyp</b>	0,95	0,48	0,047	<b>2,60</b>	1,01 – 6,56
<b>Alter</b>	0,05	0,02	0,003	1,05	1,02 – 1,09
<i>Variablen außerhalb des Modells:</i>					
<b>API</b>			0,141		
<b>Geschlecht (♂)</b>			0,241		
<b>Raucher</b>			0,221		

API: approximaler Plaque Index

#### **4.4.6 Binäre logistische Regression zur Beurteilung des Einflusses des del/del-Genotyps auf eine subgingivale Besiedelung mit *A. actinomycetemcomitans***

Die in der binären Analyse ermittelten Assoziationen des del/del-Genotyps zur subgingivalen Keimbesiedelung mit *A. actinomycetemcomitans* (Gesamtstudiengruppe) sowie *T. denticola* und den Bakterien des roten Komplexes (AP- und AP + CP-Gruppe) wurden in einem multivariaten Modell mittels binärer logistischer Regression unter Berücksichtigung der Kofaktoren Sondiertiefen an den bakteriellen Entnahmestellen, Geschlecht, Alter und Raucherstatus überprüft. Hierbei konnte der homozygote del-Genotyp als unabhängiger Risikofaktor für den subgingivalen Nachweis von *A. actinomycetemcomitans* bestätigt werden (Tab. 19). Die in der binären Analyse ermittelten Assoziationen zu *T. denticola* und den Bakterien des roten Komplexes konnten dagegen im multivariaten Modell nicht bestätigt werden.

Tab. 19: Binäre logistische Regression (schrittweise vorwärts) für das Auftreten von *A. actinomycetemcomitans* in der Gesamtstudiengruppe unter Berücksichtigung der Kofaktoren PD<sub>bakt.</sub>, männliches Geschlecht, Alter und Raucherstatus

Signifikante Variable	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert	Odds Ratio	Konfidenzintervall (95%)
<i>Variablen im Modell:</i>					
del/del Genotyp	0,915	0,386	0,018	<b>2,50</b>	1,17 – 5,32
PD <sub>bakt.</sub>	0,153	0,065	0,018	1,17	1,03 – 1,32
<i>Variablen außerhalb des Modells:</i>					
Geschlecht (♂)			0,061		
Alter			0,150		
Raucher			0,443		

PD<sub>bakt.</sub>: Mittelwert der Sondiertiefen an den bakteriellen Entnahmestellen

#### 4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

##### 4.5.1 Arg677Trp-Polymorphismus im TLR-2-Gen

In der Gesamtstudiengruppe konnte nur der Arg/Arg-Wildtyp nachgewiesen werden. Damit lagen keine Assoziationen zur Parodontitis bzw. ihren klinischen Konditionen sowie zur Präsenz parodontaler Leitkeime vor.

##### 4.5.2 Arg753Gln-Polymorphismus im TLR-2-Gen

Der Arg/Gln-Genotyp sowie das Gln-Allel kamen tendenziell vermehrt in den beiden Patientengruppen vor. Außerdem hatten Arg/Gln-positive Kontrollprobanden im Vergleich zu Trägern des Arg/Arg-Genotyps einen signifikant höheren approximalen Plaque Index und waren häufiger *A. actinomycetemcomitans*-positiv. In der gesamten Studiengruppe waren Träger des Arg/Gln-Genotyps signifikant häufiger mit Bakterien des roten Komplexes infiziert. In multivariaten Berechnungen konnte jedoch die in den bivariaten Vergleichen ermittelten signifikanten Assoziationen des Arg/Gln-Genotyps zur Präsenz von *A. actinomycetemcomitans* und Bakterien des roten Komplexes nicht bestätigt werden.

##### 4.5.3 -94 ins/del ATTG Promotorpolymorphismus im NF-κB-Gen

Sowohl nach bivariater als auch nach multivariater Analyse erhöhte der del/del-Genotyp die Odds Ratio für das Auftreten einer aggressiven Parodontitis und den Nachweis von

*A. actinomycetemcomitans*. Innerhalb der AP-Gruppe wiesen jedoch Träger des homozygoten del-del Genotyps im Vergleich zu ins/del- und ins/ins-positiven Individuen eine signifikant seltenere Besiedlung mit *T. denticola* sowie Bakterien des roten Komplexes auf. Auch in der gesamten Patientengruppe (AP + CP) waren *T. denticola* und die Bakterien des roten Komplexes bei del/del-Merkmalsträgern signifikant seltener. Die signifikanten Assoziationen zu *T. denticola* und Bakterien des roten Komplexes konnten jedoch nach multivariater Analyse nicht bestätigt werden.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Einflussnahme genetischer Faktoren auf die Pathogenese der Parodontitis**

Parodontopathogene Bakterien initiieren und unterhalten die wirtseigene Immunantwort im parodontalen Gewebe. Jedoch führt die alleinige Anwesenheit subgingivaler Bakterien nicht zwangsläufig zur Destruktion des Parodonts. Trotz der Omnipräsenz der mikrobiellen Plaque gibt es erhebliche interindividuelle Unterschiede im Erkrankungsbeginn, Verlauf und der Ausprägung einer Parodontitis. Familien- und Zwillingsstudien deuten darauf hin, dass die individuelle Empfindlichkeit für eine Parodontitis unter anderem auch durch genetische Faktoren beeinflusst wird (Michalowicz et al., 1991; Marazita et al., 1994; Michalowicz, 1994). Die Parodontitis ist eine Infektionserkrankung, bei der die wirtseigene Entzündungsantwort häufig nicht ausreicht, die bakteriellen Parodontopathogene ausreichend zu eliminieren. Stattdessen führt die Entzündungsreaktion häufig zu einem schubweisen Abbau des Zahnhalteapparates (Page et al., 1997). Daher werden bei der Evaluierung potentieller genetischer Risikofaktoren für Parodontitis vor allem Varianten derjenigen Gene berücksichtigt, die für proinflammatorische Zytokine, Immunrezeptoren, das HLA-System, verschiedene Strukturproteine und metabolische Enzyme kodieren. Aufgrund der hohen Anzahl von bereits publizierten verschiedenen Risiko- und Resistenzindikatoren für Parodontitis lässt sich schlussfolgern, dass sowohl die aggressive als auch die chronische Parodontitis keine monogenetischen Erkrankungen sind. Es wird vermutet, dass genetische Veränderungen die Entstehung und Progression einer Parodontitis in der Regel nicht determinieren, sondern eher modifizierende Faktoren darstellen (Yoshi et al., 2007).

### **5.2 Parodontaler Befund und Klassifizierung der Probanden**

In die Studie wurden Patienten mit generalisierter aggressiver und generalisierter chronischer Parodontitis eingeschlossen. Die Auswahl der Patienten erfolgte modifiziert nach den Kriterien nach Armitage (1999). Patienten, bei denen auch nach längerer, mehrmaliger Beobachtung des klinischen Verlaufs keine eindeutige Zuordnung zu einer der Untersuchungsgruppen möglich war, wurden nicht für diese Studie rekrutiert. Es wurde darauf geachtet, dass der Erkrankungsbeginn bei Patienten mit aggressiver Parodontitis vor dem 35. Lebensjahr lag. Dadurch wurde das Risiko einer Fehldiagnose der aggressiven Parodontitis vermindert. Patienten mit lokalisierter aggressiver Parodontitis wurden aus der Untersuchung ausgeschlossen, da sie wahrscheinlich vom genetischen Hintergrund different zu Patienten mit generalisierter aggressiver Parodontitis sind (Ranney, 1991).

Bei Betrachtung der Geschlechterverteilung und dem Anteil von Rauchern unterschieden sich die einzelnen Studiengruppen nicht signifikant voneinander. Daher waren sie in dieser Hinsicht miteinander vergleichbar.

In beiden Patientengruppen war der Anteil von Zähnen mit einem CAL von > 6 mm über 35 %. Dadurch wurde nachgewiesen, dass es sich jeweils um eine schwere generalisierte Form der Parodontitis handelt. Beide Patientengruppen waren deshalb für die Evaluierung genetischer Risikofaktoren für Parodontitis prädestiniert. Interessanterweise berichteten sowohl Patienten mit AP als auch mit CP im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant häufiger (4–5fach) über ein familiäres Auftreten von Parodontitis bei Familienangehörigen ersten Grades. Dies könnte ein Hinweis auf die Heritabilität der Parodontitis und die Existenz genetischer Risikofaktoren sein (Hart et al., 1992; Marazita et al., 1994).

Das Alter der Kontrollprobanden wurde auf mindestens 30 Jahre festgelegt. Dadurch wurde das Risiko vermindert, dass sich unter den Kontrollprobanden eine aggressive Parodontitis noch zu einem späteren Zeitpunkt entwickeln würde. Trotzdem ist wie auch bei anderen Fall-Kontrollstudien nicht ausgeschlossen, dass in der Kontrollgruppe ebenfalls ein gewisses Erkrankungspotential besteht. Dies wäre nur in einer longitudinalen Untersuchung zu beurteilen, die im Rahmen der vorliegenden Dissertation nicht durchgeführt werden konnte.

Probanden wurden dann als parodontitisfrei definiert, wenn sie keinen klinischen Attachmentverlust > 3,5 mm infolge einer Parodontitis aufwiesen (WHO, 1978). Attachmentverlust wegen überstehender Restaurationsränder oder erhöhte Sondiertiefen aufgrund von Pseudotaschen, insbesondere im distalen Molarenbereich, wurden nicht als Parodontitisfall definiert, wenn alle anderen Zähne keine erhöhten Werte für die Sondiertiefe bzw. den klinischen Attachmentverlust aufwiesen. Durch die Auswahl einer parodontitisfreien Kontrollgruppe mit definiertem Alter konnte im Vergleich zu anderen Studien, bei denen Blutspender als Kontrollpersonen ausgewählt wurden (u. a. Fiebig et al., 2008; Schäfer et al., 2010) der Kontrast zwischen „gesund“ und „krank“ wesentlich erhöht werden.

Eine sorgfältige parodontale Untersuchung wurde mittels Sechs-Punkt-Messung der Sondiertiefen und des Attachmentverlusts gewährleistet. Die Sondiertiefenmessung ist eine wichtige klinische Untersuchungsmethode, um die Tiefe der parodontalen Tasche als Hauptreservoir der parodontopathogenen Keime zu beurteilen und eine rasche Übersicht sowie Einschätzung über die aktuelle parodontale Situation des Patienten zu geben. Die Messung des klinischen Attachmentverlusts erfasst zusätzlich die Historie der Erkrankung und gibt zudem eine Übersicht über das Ausmaß der Destruktion des Parodonts (Armitage, 2003).

Die Untersuchung der Probanden dieser Studie wurde von vier verschiedenen Behandlern nach genau definierten Kriterien durchgeführt, wobei von Vorteil war, dass im Zweifel über die Verifikation einer Diagnose konsensuell diskutiert werden konnte.

### **5.3 Klinische Daten der Probanden**

Die klinischen Parameter für Mundhygiene, Entzündung und Attachmentverlust waren in den Patientengruppen erwartungsgemäß stärker ausgeprägt. Allerdings unterschied sich der API bei

Patienten mit aggressiver Parodontitis nicht signifikant von dem in der Kontrollgruppe ermittelten. Obwohl der API nur die supragingivale Plaque erfasst, ist dies eine Bestätigung der Beobachtung, dass bei einer aggressiven Parodontitis ein Missverhältnis zwischen der Plaqueakkumulation und dem Ausmaß des Attachmentverlusts besteht (Armitage, 1999). Die Sondiertiefen an den bakteriellen Entnahmestellen waren höher im Vergleich zu den Mittelwerten der Sondiertiefen unter Berücksichtigung aller Zähne. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Auswahl der Zähne, aus denen Plaque zur Analyse der vorhandenen Parodontopathogenen entnommen wurde, anhand der größten Sondiertiefe getroffen wurde.

#### **5.4 Subgingivale bakterielle Besiedlung der Probanden**

Primärer ätiologischer Faktor der Parodontitis ist die bakterielle Plaque. Es ist bekannt, dass insbesondere die Bakterien *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola* relativ sicher als parodontopathogen anzusehen sind und daher als parodontale Leitkeime betrachtet werden (Moore und Moore, 1994; Darveau et al., 1997; Socransky und Haffajee, 1994, 2005).

Mit Ausnahme von *A. actinomycetemcomitans* waren in den Patientengruppen erwartungsgemäß mehr Probanden bakterienpositiv. *A. actinomycetemcomitans* hingegen trat nur bei Patienten mit aggressiver Parodontitis, nicht aber bei Patienten mit chronischer Parodontitis im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant häufiger auf. Dies weist auf die wahrscheinlich dominierende Rolle dieses Bakteriums in der Ätiologie der aggressiven Parodontitis hin (Slots, 1999; Haubek et al., 2008). Dabei ist jedoch zu beachten, dass sich anhand der heute verfügbaren Techniken zum Nachweis parodontaler Markerbakterien aggressive und chronische Parodontitisformen nicht unterscheiden lassen (Mombelli et al., 2002).

Dass die in dieser Arbeit untersuchten parodontalen Leitkeime, wenn auch signifikant seltener, ebenfalls unter den parodontitisfreien Kontrollprobanden nachgewiesen wurden, unterstützt die Hypothese, dass genetische Risikofaktoren die Bakterienbesiedlung und/oder Pathogenese der Parodontitis beeinflussen. Daneben ist jedoch bekannt, dass es von einem Bakterium Serotypen unterschiedlicher Virulenz gibt. Für *A. actinomycetemcomitans* sind z. B. die Serotypen a-f bekannt (Kaplan et al., 2001). Der Serotyp b scheint dabei die größte parodontopathogene Virulenz aufzuweisen (Zambon et al., 1983; Yang et al., 2004, 2005). Die Unterscheidung der einzelnen Serotypen war mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten mikrobiologischen Test jedoch nicht möglich.

#### **5.5 Vergleich zu anderen Assoziationsstudien**

Wie in den Tabellen 20, 22 und 24 dargestellt ist, waren die in dieser Studie untersuchten Polymorphismen auch bei anderen Erkrankungen auffällig. Dabei handelte es sich um bakterielle Infektionserkrankungen (u. a. Tuberkulose, septischer Schock), bei denen wie auch

bei der Parodontitis die bakterielle Invasion den primär auslösenden Faktor darstellt, die individuelle Abwehrreaktion des Wirts jedoch einen entscheidenden Einfluss auf die Ausprägung und Progression der Erkrankung nimmt. Dies lässt vermuten, dass die Polymorphismen neben den nachgewiesenen Assoziationen zu anderen Infektionskrankheiten ebenfalls eine Relation zur Parodontitis aufweisen.

Weiterhin konnten Assoziationen der untersuchten Polymorphismen zu chronischen Entzündungserkrankungen wie der Darmerkrankung Colitis ulcerosa nachgewiesen werden. Sowohl Parodontitis als auch Colitis ulcerosa sind multifaktorieller Genese. Es ist ebenso bekannt, dass die jeweilige Empfänglichkeit für beide Erkrankungen gleichfalls vor allem durch eine veränderte wirtseigene Immunantwort erhöht wird, aber auch Umweltfaktoren krankheitsmodulierend wirken. Da weiterhin sowohl für Parodontitis als auch Colitis ulcerosa die gleichen Schlüsselmediatoren (Zytokine, MMPs) in die Gewebedestruktion involviert sind (Pallone und Monteleone 2001; Kinane und Mark Bartold 2007), ist anzunehmen, dass Polymorphismen, die mit entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa assoziiert wurden, ebenfalls indikativ für Parodontitis sind.

Bakterielle Zellwandkomponenten aktivieren unter anderem den TLR-2, wodurch via MyD88/IRAK-Signaltransduktionskaskade intrazellulär der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert wird. Deshalb wurden in dieser Studie im Vergleich zu anderen Assoziationsstudien zur Parodontitis (Tab. 21 und 23) gleichzeitig drei Genpolymorphismen untersucht, deren Gene in einem funktionellen Zusammenhang zueinander stehen.

Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Assoziationsstudie im Vergleich zu anderen Studien war, dass neben den klinisch-parodontologischen Daten zusätzlich ein mikrobiologischer Test zum Nachweis subgingivaler parodontopathogener Bakterien durchgeführt wurde. Damit konnten Assoziationen nicht nur zur Parodontitis, sondern auch zum Nachweis parodontaler Markerbakterien untersucht werden.

Bei der statistischen Analyse wurden die im bivariaten Vergleich auffälligen Ergebnisse durch eine multivariate Regression unter Berücksichtigung etablierter Kofaktoren für Parodontitis sowie subgingivale Keimbildung ergänzt, um adjustierte Odds Ratios berechnen zu können.

Da die vorliegenden Daten aus einem sehr selektiven Probandengut eines abgegrenzten geografischen Gebiets stammen, können diese Ergebnisse auch nur auf Kaukasier deutschen Ursprungs übertragen werden und müssen in anderen ethnischen Gruppen mit nötiger Vorsicht interpretiert werden. Eine Extrapolation auf die Allgemeinbevölkerung ist hierbei nicht sinnvoll.

### **5.6 Auswertung des TLR-2 Arg677Trp-Polymorphismus**

2001 wurde von der Forschergruppe um Kang und Chae erstmals der Arg677Trp-Polymorphismus im TLR-2-Gen beschrieben. In dieser koreanischen Studie konnte gezeigt werden, dass der heterozygote Arg/Trp-Genotyp mit lepromatöser Lepra assoziiert ist (Kang

und Chae, 2001). Die Ergebnisse einer tunesischen Studie wiesen eine Assoziation des Arg/Gln-Genotyps zu Tuberkulose nach (Ben-Ali et al., 2004) (Tab. 20). In einer *in vitro* Studie wurde gezeigt, dass der durch site-directed Mutagenese eingeführte Arg677Trp-Polymorphismus in einer verringerten Wirtsreaktion auf das *Mycobacterium leprae* bzw. *tuberculosis* infolge verminderter NF-κB-Aktivierung resultierte (Bochud et al., 2003).

Demgegenüber konnte in der vorliegenden Studie wie auch in anderen klinischen Assoziationsstudien (u. a. Schröder et al., 2003; Folwaczny et al., 2004; Malhotra et al., 2005; Pabst et al., 2009) kein Studienteilnehmer als Träger des mutanten Genotyps des Arg677Trp-Polymorphismus identifiziert werden.

Durch Sequenzierungsanalysen wies die Forschergruppe um Malhotra et al., 2005, die Existenz eines Pseudogens mit 93 % Homologie zum Exon 3 des TLR-2-Gens nach. In ihren Untersuchungen zeigten sie, dass die entsprechend der Methode von Kang und Chae ermittelten heterozygoten Mutationsträger ausschließlich auf einen Basenpaar-Austausch im Pseudogen zurückzuführen sind. Aus diesem Grund zweifelten sie das Vorhandensein des Arg677Trp-Polymorphismus im kodierenden Bereich des TLR-2-Gens an.

Tab. 20: Assoziation des Arg677Trp-Polymorphismus im TLR-2-Gen zu Infektions-erkrankungen

<b>Autor</b>	<b>Publika-tionsjahr</b>	<b>Population</b>	<b>Anzahl Studien-teilnehmer</b>	<b>Methode der Typisierung</b>	<b>nachgewiesene Assoziation</b>
Kang, Chae	2001	Koreaner	45 Patienten mit lepromatöser Lepra 41 Patienten mit tuberkulöser Lepra 45 gesunde Kontrollprobanden	PCR/SSCP	-Assoziation des Mutationstyps zur lepromatöser Lepra -keine Assoziation zur tuberkulöser Lepra
Ben-Ali et al.	2004	Tunesier	33 Tuberkulose-Patienten 33 gesunde Kontrollprobanden	PCR/RFLP	Assoziation des heterozygoten Genotyps zur Tuberkulose
Kutuk-culer et al.	2007	Türken	52 Patienten 91 Kontrollen	PCR/RFLP	keine Assoziation zu rekurrender fieberiger Infektion bei Kindern
Pabst et al.	2009	Kaukasier	149 Patienten 150 Kontrollen	PCR/RFLP	keine Assoziation zur chronisch ob-struktiver Lungen-erkrankung

PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion, RFLP: Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus  
SSCP: single strand conformation polymorphism

Tab. 21: Assoziation des Arg677Trp-Polymorphismus im TLR-2-Gen zu Parodontitis

<b>Autor</b>	<b>Publikationsjahr</b>	<b>Population</b>	<b>Anzahl Studienteilnehmer</b>	<b>Methode der Typisierung</b>	<b>nachgewiesene Assoziation</b>
Folwaczny et al.	2004	Kaukasier	122 CP 122 G	PCR/RFLP	keine Assoziation zur CP
Berdeli et al.	2007a	Türken	90 AP 155 G	PCR/RFLP	keine Assoziation zur AP
Berdeli et al.	2007b	Türken	83 CP 106 G	PCR/RFLP	keine Assoziation zur CP
Zhu et al.	2008	Chinesen	40 AP 50 CP 100 G	PCR/RFLP	keine Assoziation zur AP und CP

AP: aggressive Parodontitis, CP: chronische Parodontitis, G: parodontitisfreie Kontrollgruppe, PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion, RFLP: Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus

### **5.7 Auswertung des TLR-2 Arg753Gln-Polymorphismus**

Es gibt verschiedene Studien, die die Assoziationen des Arg753Gln-Polymorphismus im TLR-2-Gen zu Infektionserkrankungen beschreiben (Tab. 22). Unter türkischen Kohorten konnte ein krankheitsfördernder Einfluss des heterozygoten Arg/Gln-Genotyps für das Auftreten von Tuberkulose (Ogus et al., 2004), rheumatischen Fiebers bei Kindern (Berdeli et al., 2005) und wiederkehrenden fieberhaften Infektionen des Respirationstrakts bei Kindern (Kutukculer et al., 2007) nachgewiesen werden. Weiterhin konnte unter Kaukasier eine Assoziation des heterozygoten Genotyps zum septischen Schock evaluiert werden (Lorenz et al., 2000).

Der Arg/Gln-Genotyp wurde jedoch nicht nur als Risikoindikator identifiziert. Schröder et al., 2005, wiesen den Arg/Gln-Genotyp als protektiven Faktor für die Lyme-Borreliose nach. Dies wurde auf eine verminderte Aktivität des mutierten Rezeptors im TLR-1/2-Heterodimer zurückgeführt.

Der Einfluss des Arg753Gln-Polymorphismus auf das Auftreten von Parodontitis wurde bereits in anderen Studien untersucht (Tab. 23) (Folwaczny et al., 2004; Berdeli et al., 2007a, b; Zhu et al., 2008). Es konnten jedoch keine Assoziationen dieses Polymorphismus zur AP oder CP nachgewiesen werden.

Tab. 22: Assoziation des Arg753Gln-Polymorphismus im TLR-2-Gen zu Infektions-und chronischen Erkrankungen

<b>Autor</b>	<b>Publika-tionsjahr</b>	<b>Population</b>	<b>Anzahl Studien-teilnehmer</b>	<b>Methode der Typisierung</b>	<b>nachgewiesene Assoziation</b>
Lorenz et al.	2000	Kaukasier	91 Patienten 73 Kontrollen	PCR/SSCP	Arg/Gln-Genotyp als Risikoindikator für septischen Schock
Ogus et al.	2004	Türken	151 Patienten 116 Kontrollen	PCR/RFLP	Arg/Arg und Arg/Gln als Risikoindikatoren für Tuberkulose
Berdeli et al.	2005	Türken	61 Patienten 207 Kontrollen	PCR/RFLP	Arg/Gln-Genotyp als Risikoindikator für akutes rheumatisches Fieber bei Kindern
Schröder et al.	2005	Kaukasier	155 Patienten 349 Kontrollen	PCR/RFLP	Arg/Gln-Genotyp als protektiver Faktor für Lyme-Borreliose
Kutuk-culer et al.	2007	Türken	52 Patienten 91 Kontrollen	PCR/RFLP	Arg/Gln-Genotyp, Gln-Allel assoziiert mit rekurrierender fiebriger Infektion bei Kindern
Moens et al.	2007	Kaukasier	99 Patienten 178 Kontrollen	PCR/RFLP	keine Assoziation zur invasiven Pneumo-kokkeninfektion
Pabst et al.	2009	Kaukasier	149 Patienten 150 Kontrollen	PCR/RFLP	keine Assoziation zur chronisch obstruktiver Lungenerkrankung

PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion, RFLP: Restriktions-Fragmentl-Längen-Polymorphismus  
SSCP: single strand conformation polymorphism

Tab. 23: Assoziation des Arg753Gln-Polymorphismus im TLR-2-Gens zu Parodontitis

<b>Autor</b>	<b>Publika-tionsjahr</b>	<b>Population</b>	<b>Anzahl Studien-teilnehmer</b>	<b>Methode der Typisierung</b>	<b>nachgewiesene Assoziation</b>
Folwaczny et al.	2004	Kaukasier	122 CP 122 G	PCR/RFLP	keine Assoziation zur CP
Berdeli et al.	2007a	Türken	90 AP 155 G	PCR/RFLP	keine Assoziation zur AP
Berdeli et al.	2007b	Türken	83 CP 106 G	PCR/RFLP	keine Assoziation zur CP
Zhu et al.	2008	Chinesen	40 AP 50 CP 100 G	PCR/RFLP	keine Assoziation zur AP und CP

AP: aggressive Parodontitis, CP: chronische Parodontitis, G: parodontitisfreie Kontrollgruppe,  
PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion, RFLP: Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus

In der vorliegenden Studie konnten keine homozygoten Gln/Gln-Mutationsträger nachgewiesen werden. Der heterozygote Arg/Gln-Genotyp kam jedoch in der Gesamtstudiengruppe bei 11

Probanden vor. 9 davon kamen aus der Patientengruppe (verteilt zu je gleichem Prozentsatz auf die einzelnen Diagnosen) und 2 aus der parodontitisfreien Kontrollgruppe. Mit einer Häufigkeit des Arg/Gln-Genotyps von 5 % lag die Verteilung im Bereich anderer Assoziationsstudien unter Kaukasiern (Lorenz et al., 2000; Folwaczny et al., 2004; Schröder et al., 2003, 2005; Pabst et al., 2009).

Obwohl in der vorliegenden Studie der heterozygote Arg/Gln-Genotyp bei den Parodontitispatienten mehr als doppelt so häufig im Vergleich zur parodontitisfreien Kontrollgruppe auftrat, ergab sich in Konsistenz zu bisher durchgeführten Studien (Tab. 23) keine statistische Signifikanz. In der klinischen Diagnostik unterschieden sich Arg/Arg-Merkmalsträger von den Arg/Gln-Trägern in der parodontitisfreien Probandengruppe nur hinsichtlich der Plaqueanlagerung. Dabei wiesen die heterozygoten Merkmalsträger einen höheren API auf. Bei der Auswertung der subgingivalen Keimbildung konnte herausgefunden werden, dass in der parodontitisfreien Kontrollgruppe alle Träger des heterozygoten Arg/Gln-Genotyps mit *A. actinomycetemcomitans* infiziert waren. Diese Ergebnisse scheinen zunächst darauf hinzuweisen, dass Arg/Gln-positive Individuen zwar eher mit *A. actinomycetemcomitans* infiziert werden können, es jedoch nicht zur Erkrankung kommt. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es durch den mutationsbedingten Rezeptordefekt nach bakterieller Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* zu einer fehlerhaften Signaltransduktion kommt und somit die Wirtsantwort und bakterielle Elimination, aber auch die wirtsinduzierte Gewebestruktion in geringerem Maße stattfindet.

Da es sich in der vorliegenden Studie bei den heterozygoten Merkmalsträgern in der Kontrollgruppe jedoch lediglich um zwei und in den Patientengruppen um 9 Probanden handelte, ist die Aussagekraft der in den bivariaten Vergleichen signifikanten Ergebnisse stark eingeschränkt. Darüber hinaus blieb die Assoziation des Arg/Gln-Genotyps zur Besiedlung mit *A. actinomycetemcomitans* im multivariaten Modell nicht signifikant.

Für die Gesamtstudiengruppe konnte gezeigt werden, dass bei 90,9 % der Arg/Gln-Heterozygoten (d. h. 10 von 11 Probanden) die Bakterien des roten Komplexes gemeinsam nachgewiesen werden konnten. Das dazugehörige 95 % Konfidenzintervall von 1,03-65,01 zeigt durch seine breite Spanne eine große statistische Unsicherheit, die auf die begrenzte Probandenzahl (11 heterozygote Mutationsträger vs. 209 homozygote Wildtypträger) zurückzuführen ist. Daher sollte diese Assoziation in einem größeren Studienkollektiv nochmals überprüft werden. Bei der weiterführenden statistischen Prüfung im multivariaten Modell konnte die Assoziation des Arg/Gln-Genotyps zur Keimbildung mit Bakterien des roten Komplexes nicht bestätigt werden. Stattdessen stellten die adjustierten Kofaktoren Alter (OR=1,05) und Sondiertiefe an den bakteriellen Entnahmestellen (OR=1,68) signifikante Einflussfaktoren für die Keimbildung dar, was durch bisherige Studien bereits belegt wurde (Haffajee et al., 1998; Socransky et al., 1998). Damit ist der 753Arg/Gln-Genotyp des TLR-2

kein unabhängiger Risikofaktor für eine Infektion mit Bakterien des roten Komplexes. Zusammenfassend ist daher zu schlussfolgern, dass der Arg753Gln SNP im TLR-2-Gen keine klinisch relevante Assoziation zur Parodontitis, zu den klinisch-parodontologischen Befunden oder zur subgingivalen Keimbesiedlung aufweist.

### **5.8 Auswertung des -94 ins/del ATTG Promotorpolymorphismus im NF-κB-Gen**

Die Verteilung und Häufigkeit der drei Genotypen des NF-κB-Polymorphismus in der vorliegenden Studie waren mit denen anderer Assoziationsstudien vergleichbar (Karban et al., 2004; Glas et al., 2006; Lo et al., 2009) (Tab. 24). Da die Untersuchungen dieses Polymorphismus in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen (Nordamerikaner, Kaukasier, Taiwanesen) durchgeführt wurden, kann angenommen werden, dass die Prävalenz des NF-κB-Polymorphismus relativ unabhängig von der ethnischen Herkunft ist.

In dieser Assoziationsstudie wurde erstmalig ein Einfluss des Promotorpolymorphismus -94 ins/del ATTG im NF-κB-Gen auf das Auftreten von Parodontitis und die subgingivale parodontopathogene Keimbesiedlung untersucht.

Tab. 24: Assoziation des -94 ins/del ATTG Polymorphismus im NF-κB-Gen zu bestimmten Erkrankungen

<b>Autor</b>	<b>Publikationsjahr</b>	<b>Population</b>	<b>Anzahl Studienteilnehmer</b>	<b>Methode der Typisierung</b>	<b>nachgewiesene Assoziation</b>
Karban et al.	2004	Nordamerikaner	235 Colitis ulcerosa-Patienten 652 Kontrollen	PCR/RFLP	Assoziation des del-Allels zur Colitis ulcerosa
Borm et al.	2005	Kaukasier	127 Colitis ulcerosa-Patienten 139 Morbus Crohn-Patienten 155 Kontrollen	PCR/RFLP	Assoziation des del-Allels zur Colitis ulcerosa
Glas et al.	2006	Kaukasier	630 Morbus Crohn-Patienten 365 Colitis ulcerosa-Patienten 974 Kontrollen	PCR/RFLP	keine Assoziation zu Morbus Crohn und Colitis ulcerosa
Lo et al.	2009	Taiwanesen	182 Magenkarzinom-Patienten 116 Kontrollen	PCR/RFLP	Assoziation der ins/ins- und ins/del-Genotypen zum Magenkarzinom bei älteren Patienten

PCR: Polymerase-Kettenreaktion, RFLP: Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus

In der vorliegenden Studie wurden für die Untersuchung der Assoziationen die ins/ins- und ins/del-Genotypen zu einem ins-dominanten Modell zusammengefasst und dem del/del-Genotyp gegenübergestellt.

Es konnten unter allen Studienteilnehmern weder demografische noch klinische Unterschiede zwischen den verschiedenen Merkmalsträgern gefunden werden.

Träger des homozygoten del-Genotyps waren jedoch signifikant häufiger an aggressiver Parodontitis erkrankt und häufiger mit *A. actinomycetemcomitans* infiziert. Beide Assoziationen konnten im multivariaten Modell bestätigt werden. Dagegen war der del/del-Genotyp in der AP- und Gesamtpatientengruppe negativ mit der Präsenz von *T. denticola* und Bakterien des roten Komplexes assoziiert. In der multivariaten Analyse konnte dieser Zusammenhang nicht belegt werden.

Zur Erklärung der gezeigten Assoziationen sollen die *in vitro* Ergebnisse von Karban et al., 2004, angeführt werden. Mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) wurde untersucht, ob der -94 ins/del Polymorphismus zu einer Veränderung der Bindungsdomäne für nukleäre Proteine führt. Die Oligonukleotide, die die ins-Wildtypsequenz trugen, zeigten eine starke Bindung an nukleäre Proteine, wohingegen beim del-Mutationstyp durch das Fehlen der vier Basen diese Bindung ausblieb. Die heterozygoten ins/del-Oligonukleotide konnten zwar nukleäre Proteine binden, ihr Bindungsverhalten war jedoch deutlich geringer ausgeprägt im Vergleich zu dem von ins/ins-Oligonukleotiden. Des Weiteren berichtete die Forschergruppe, dass der del-ATTG-Genotyp die Promotoraktivität signifikant reduzierte. Dies zeigte sich besonders nach 24 stündiger Inkubation mit LPS, einem der potentesten NF-κB-Aktivatoren. Die Ergebnisse dieser Promotorexpressionsstudie lassen vermuten, dass das del-Allel mit einer verminderten nukleären NF-κB-Signalübertragung gekoppelt ist. Dadurch kommt es zu einer reduzierten Produktion NF-κB-getriggelter Proteinen, wodurch die Fähigkeit des Wirts, sich gegen bakterielle Invasion zu schützen, beeinträchtigt wird.

Milward et al., 2007, konnten in einer Studie nachweisen, dass die durch bakterielle Stimuli eingeleitete NF-κB-Aktivität eine wichtige Rolle bei der Wirtsabwehr im oralen Gewebe spielt. Unter zusätzlicher Berücksichtigung der von Karban et al. nachgewiesenen Ergebnisse ist es denkbar, dass es zu einer del-abhängigen verminderten Immunantwort auf parodontale Bakterien kommt.

Die in der vorliegenden Studie gezeigte positive Assoziation des del/del-Genotyps zur AP und Präsenz von *A. actinomycetemcomitans* könnte in der Konsequenz auf einer del-assozierten verringerten Promotoraktivität beruhen, wodurch die NF-κB-regulierte Immunantwort gegen *A. actinomycetemcomitans* beeinträchtigt wird. Dadurch könnten Besiedlung und Vermehrung von *A. actinomycetemcomitans* begünstigt sein und infolgedessen ebenso die Empfindlichkeit für eine aggressive Parodontitis. Jedoch wäre es auch denkbar, dass der homozygote del/del-Genotyp die Besiedlung mit *A. actinomycetemcomitans* und die Entstehung einer aggressiven Parodontitis unabhängig voneinander beeinflusst. Zur Beantwortung dieser Frage sind weitere experimentelle Untersuchungen nötig.

## **5.9 Schlussfolgerung und Ausblick**

Im Ergebnis der vorliegenden Studie konnte in der gesamten Studiengruppe kein Mutationsträger des Arg677Trp-Polymorphismus im TLR-2-Gen nachgewiesen werden. Damit liegt keine Assoziation zur Parodontitis bzw. zur Präsenz parodontaler Leitkeime vor.

Für den Arg753Gln-Polymorphismus im TLR-2-Gen konnte trotz tendenziell häufigerem Auftreten des Arg/Gln-Genotyps in beiden Patientengruppen keine Assoziation zur Parodontitis nachgewiesen werden. Ebenso konnten nach Adjustierung die durch bivariate Analysen gefundenen Assoziationen zu *A. a.* und den Bakterien des roten Komplexes nicht bestätigt werden.

Beide untersuchten Polymorphismen im TLR-2-Gen sind somit weder indikativ für Parodontitis noch für eine Besiedlung mit parodontalen Leitkeimen.

Für den -94 ins/del ATTG Polymorphismus im NF- $\kappa$ B-Gen belegten die Studienergebnisse, dass der del/del-Genotyp mit einem erhöhten Risiko für die Ausprägung einer aggressiven Parodontitis sowie die subgingivale Besiedlung mit *A. actinomycetemcomitans* assoziiert ist. Als möglicher Pathomechanismus ist eine del-abhängige verminderte Immunabwehr gegen *A. actinomycetemcomitans* und daraus resultierende Ausprägung einer aggressiven Parodontitis in Betracht zu ziehen.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse sollten weitere Studien mit einem größeren Probandengut durchgeführt werden. Des Weiteren sollte in zukünftigen Studien der exakte, auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene stattfindende Mechanismus der del-abhängig veränderten NF- $\kappa$ B-Funktion und der daraus resultierende Einfluss auf die Immunabwehr gegen *A. actinomycetemcomitans* im parodontalen Gewebe untersucht werden. Vielleicht wären dann therapeutische Interventionen in den NF- $\kappa$ B-Signalweg möglich, um die Entstehung und Progression einer aggressiven Parodontitis verhindern zu können.

## 6. Zusammenfassung

Parodontitis ist eine multifaktorielle Erkrankung, deren grundlegender ätiologischer Faktor die mikrobielle Plaque ist. Ihre Pathogenese wird u. a. auch durch die individuelle wirtseigene Immunantwort beeinflusst. So stimulieren beispielsweise bestimmte Zellwandkomponenten bakterieller Parodontopathogene die angeborene Immunität über den Toll-like-Rezeptor-2 (TLR-2). Dieser aktiviert intrazellulär den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, wodurch es zur Transkription von Genen der Immunantwort kommt. Diese Gene kodieren z. B. für proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , die unter anderem gewebeabbauende Fibroblasten und Osteoklasten aktivieren und dadurch den Abbau von parodontalem Gewebe triggern.

Funktionell wichtige Polymorphismen wurden sowohl im Gen für TLR-2 (Arg677Trp und Arg753Gln) als auch im Gen für NF- $\kappa$ B (-94ins/del ATTG) beschrieben. Diese Genpolymorphismen beeinflussen die Transkriptionsrate oder ändern die Proteinsequenz. Dadurch kann die Funktion von TLR-2 und NF- $\kappa$ B mit Beeinträchtigung der Signaltransduktionskaskade verändert werden. Dieser Hintergrund lässt vermuten, dass Polymorphismen in den Genen für TLR-2 und NF- $\kappa$ B indikativ für Parodontitis bzw. die subgingivale Plaquezusammensetzung sind. Das erste Ziel dieser Studie bestand deshalb darin, eine mögliche Relation der Polymorphismen Arg677Trp, Arg753Gln und -94 ins/del ATTG im TLR-2- bzw. NF- $\kappa$ B-Gen zur Parodontitis zu evaluieren. Ein weiteres Ziel war es zu überprüfen, ob auch ein Zusammenhang zum Nachweis subgingivaler parodontaler Markerbakterien besteht.

Für die vorliegende Studie wurden 222 untereinander nicht verwandte Kaukasier deutschen Ursprungs untersucht. Die Studienkohorte bestand aus einer Patientengruppe mit 141 Probanden, wovon 78 an generalisierter aggressiver Parodontitis und 63 an generalisierter chronischer Parodontitis erkrankt waren sowie einer parodontitisfreien Kontrollgruppe (n=81). Die Diagnosestellung für diese Studie erfolgte modifiziert nach dem aktuellen Klassifikationssystem der Parodontalerkrankungen.

Für die genomischen Untersuchungen wurde zunächst DNA aus venösem Blut isoliert. Zur Genotypbestimmung der Polymorphismen des Arg677Trp und Arg753Gln im TLR-2-Gen wurden spezielle Restriktions-Fragment-Längen-Analysen etabliert. Zur Genotypisierung des -94 ins/del ATTG Polymorphismus im NF- $\kappa$ B-Gen wurden die nach erfolgter Polymerase-Ketten-Reaktion entstandenen DNA-Fragmente im Polyacrylamid-Gel entsprechend ihrer Länge aufgetrennt und durch Silberfärbung dargestellt.

Die subgingivale Bestimmung der parodontopathogenen Leitkeime (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella*

*forsythia* und *Treponema denticola*) erfolgte über einen kommerziell erhältlichen mikrobiologischen Test (micro-IDent® Test, HAIN Lifescience, Nehren, Deutschland).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, dass bei der Untersuchung des Arg677Trp-Polymorphismus im TLR-2-Gen unter allen Studienkohorten keine Träger des Mutationsallels 677Trp gefunden werden konnten. Dies ist konsistent zu anderen Assoziationsstudien unter kaukasischen Kohorten, in denen ebenfalls eine Abwesenheit des 677Trp-Mutationsallels festgestellt wurde. Damit lag keine Assoziation zur Parodontitis bzw. zur Präsenz parodontaler Leitkeime vor.

Für den Arg753Gln-Polymorphismus im TLR-2-Gen konnte nachgewiesen werden, dass der Arg/Gln-Genotyp in beiden Patientengruppen häufiger vorkam. Aufgrund fehlender Signifikanzen sowohl im bivariaten Vergleich zur Kontrollgruppe als auch im multivariaten Modell kann dieser Genpolymorphismus nicht als Risikoindikator für Parodontitis angesehen werden. Die in der Gesamtstudiengruppe im bivariaten Vergleich ermittelte signifikante Assoziation des Arg/Gln-Genotyps zum Nachweis von Bakterien des roten Komplexes konnte in der multivariaten Analyse ebenfalls nicht bestätigt werden.

Für den -94 ins/del ATTG Polymorphismus im NF- $\kappa$ B-Gen konnte unter Annahme eines ins-dominanten genetischen Modells bei bi- und multivariaten Analysen eine signifikante Assoziation des del/del-Genotyps zur aggressiven Parodontitis und zur Anwesenheit von *A. actinomycetemcomitans* evaluiert werden. Es ist bekannt, dass das del-Allel des NF- $\kappa$ B-Gens mit einer verminderten Promotoraktivität assoziiert ist. Dies könnte eine beeinträchtigte Immunabwehr und damit höhere Suszeptibilität für eine aggressive Parodontitis bedingen. Das Ergebnis lässt vermuten, dass der del/del-Genotyp des NF- $\kappa$ B ATTG Polymorphismus unter Kaukasiern deutschen Ursprungs einen Risikoindikator für aggressive Parodontitis darstellt, was möglicherweise durch eine NF- $\kappa$ B-beeinträchtigte Immunabwehr gegen *A. actinomycetemcomitans* bedingt ist.

## **7. Literaturangaben**

- Akira S, Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499–511.
- Albandar JM (2005) Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. *Dent Clin North Am* 49:517-532.
- Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A (2000) The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO J* 19:3325-3336.
- Ambili R, Santhi WS, Janam P, Nandakumar K, Pillai MR (2005) Expression of activated transcription factor nuclear factor-kappaB in periodontally diseased tissues. *J Periodontol* 76:1148-1153.
- Anderson KV, Nüsslein-Volhard C (1984) Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* 311:223-227.
- Arbibe L, Mira JP, Teusch N, Kline L, Guha M, Mackman N, Godowski PJ, Ulevitch RJ, Knaus UG (2000) Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat Immunol* 1:533-540.
- Armitage GC (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 4:1-6.
- Armitage GC (2003) Diagnosis of periodontal diseases. *J Periodontol* 74:1237-1247.
- Asai Y, Ohoyama Y, Ogawa T (2001) Bacterial Fimbriae and their peptides activate human gingival epithelial cells through Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 69:7387-7395.
- Asai Y, Jinno T, Ogawa T (2003) Oral treponemes and their outer membrane extracts activate human gingival epithelial cells through toll-like receptor 2. *Infect Immun* 71:717-725.
- Atreya I, Atreya R, Neurath MF (2008) NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* 263:591-596.
- Baer PN (1971) The case for periodontosis as a clinical entity. *J Periodontol* 42:516-520.
- Baldwin AS Jr (2001) Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* 107:3-6.
- Beaty TH, Boughman JA, Yang P, Astemborski JA, Suzuki JB (1987) Genetic analysis of juvenile periodontitis in families ascertained through an affected proband. *Am J Hum Genet* 40:443-452.
- Belvin MP, Anderson KV (1996) A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:393-416.

- Ben-Ali M, Barbouche M, Bousnina S, Chabbou A, Dellagi K (2004) Toll-like Receptor 2 Arg677Trp Polymorphism is associated with Susceptibility to Tuberculosis in Tunesian Patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 11:625-626.
- Berdeli A, Celik HA, Özyürek R, Dogrusoz B, Aydin HH (2005) TLR-2 gene Arg753Gln polymorphism is strongly associated with rheumatic fever in children. *J Mol Med* 83:535-541.
- Berdeli A, Emingil G, Baylas H, Saygan BH, Gürkan A, Köse T, Atilla G (2007a) Toll-like receptor 2 and 4 gene polymorphisms in generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol* 78:1968-1977.
- Berdeli A, Emingil G, Han SB, Gurkan A, Atilla G, Kose T, Baylas H (2007b) TLR2 Arg753Gly, TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile gene polymorphisms are not associated with chronic periodontitis in a Turkish population. *J Clin Periodontol* 34:551-557.
- Bickel M (1993) The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol* 64:456-460.
- Bochud PY, Hawn TR, Aderem A (2003) Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. *J Immunol* 170:3451-3454.
- Borm M E, van Bodegraven AA, Mulder CJ, Kraal G, Bouma G (2005) A NFKB1 promoter polymorphism is involved in susceptibility to ulcerative colitis. *Int J Immunogenet* 32:401-405.
- Burns E, Eliyahu T, Uematsu S, Akira S, Nussbaum G (2009) TLR2-dependent inflammatory response to *Porphyromonas gingivalis* is MyD88 independent, whereas MyD88 is required to clear infection. *J Immunol* 184:1455-1462.
- Buwitt-Beckmann U, Heine H, Wiesmüller KH, Jung G, Brock R, Akira S, Ulmer AJ (2006) TLR1- and TLR6-independent recognition of bacterial lipopeptides. *J Biol Chem* 281:9049-9057.
- Caldwell DE, Atuku E, Wilkie DC, Wivcharuk KP, Karthikeyan S, Korber DR, Schmid DF, Wolfaardt GM (1997) Germ theory vs. community theory in understanding and controlling the proliferation of biofilms. *Adv Dent Res* 11:4-13.
- Clark RA, Page RC, Wilde G (1977) Defective neutrophil chemotaxis in juvenile periodontitis. *Infect Immun* 18:694-700.
- Coats SR, Reife RA, Bainbridge BW, Pham TT, Darveau RP (2003) *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide antagonizes *Escherichia coli* lipopolysaccharide at Toll-like receptor 4 in human endothelial cells. *Infect Immun* 71:6799-6807.

- Darveau RP, Tanner A, Page RC (1997) The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol* 2000 14:12-32.
- Deschner J (2001) Interleukin-1-Polymorphismen – ihre Bedeutung und Testung in der Parodontologie. *Quintessenz* 52:53–59.
- Dixit V, Mak TW (2002) NF-kappaB signaling. Many roads lead to madrid. *Cell* 111:615-619.
- Ebersole JL (2003) Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. *Periodontol* 2000 31:135-166.
- Fiebig A, Jepsen S, Loos BG, Scholz C, Schäfer C, Rühling A, Nothnagel M, Eickholz P, van der Velden U, Schenck K, Schreiber S, Grössner-Schreiber B (2008) Polymorphisms in the interleukin-1 (IL1) gene cluster are not associated with aggressive periodontitis in a large Caucasian population. *Genomics* 92:309-315.
- Folwaczny M, Glas J, Torok HP, Limbersky O, Folwaczny C (2004) Toll-like receptor (TLR) 2 and 4 mutations in periodontal disease. *Clin Exp Immunol* 135:330-335.
- Franzoso G, Bours V, Azarenko V, Park S, Tomita-Yamaguchi M, Kanno T, Brown K, Siebenlist U (1997) The oncoprotein Bcl-3 can facilitate NF-kappa B-mediated transactivation by removing inhibiting p50 homodimers from select kappa B sites. *EMBO J* 16:440.
- Fujita S, Takahashi H, Okabe H, Ozaki Y, Hara Y, Kato I (1992) Distribution of natural killer cells in periodontal diseases: an immunohistochemical study. *J Periodontol* 63:686-689.
- Gautam J K, Ashish, Comeau LD, Krueger JK, Smith MF Jr (2006) Structural and functional evidence for the role of the TLR2 DD loop in TLR1/TLR2 heterodimerization and signaling. *J Biol Chem* 281:30132-30142.
- Gelani V, Fernandes AP, Gasparoto TH, Garlet TP, Cestari TM, Lima HR, Ramos ES, de Souza Malaspina TS, Santos CF, Garlet GP, da Silva JS, Campanelli AP (2009) The role of toll-like receptor 2 in the recognition of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontol* 80:2010-2019.
- Genco RJ (1996) Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol* 10:1041-1049.
- Genco RJ, Kornman K, Williams R, Offenbacher S, Zambon JJ, Listgarten M, Michalowicz B, Page R, Schenkein H, Slots J, Socransky S, Van Dyke T (1996) Consensus report periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol* 1:926–932.

- Ghosh S, Karin M (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109:81-96.
- Glas J, Torok HP, Tonenchi L, Muller-Myhsok B, Mussack T, Wetzke M, Klein W, Epplen JT, Griga T, Schiemann U, Lohse P, Seiderer J, Schnitzler F, Brand S, Ochsenkuhn T, Folwaczny M, Folwaczny C (2006) Role of the NFKB1 -94ins/delATTG promoter polymorphism in IBD and potential interactions with polymorphisms in the CARD15/NOD2, IKBL, and IL-1RN genes. *Inflamm Bowel Dis* 12:606-611.
- Haehnel V, Schwarzfischer L, Fenton MJ, Rehli M (2002) Transcriptional regulation of the human toll-like receptor 2 gene in monocytes and macrophages. *J Immunol* 168:5629-5637.
- Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS (1998) Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 25:346-353.
- Hajishengallis G, Sharma A, Russell MW, Genco RJ (2002) Interactions of oral pathogens with toll-like receptors: possible role in atherosclerosis. *Ann Periodontol* 7:72-78.
- Hajishengallis G, Sojar H, Genco RJ, DeNardin E (2004) Intracellular signaling and cytokine induction upon interactions of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae with pattern-recognition receptors. *Immunol Invest* 33:157-172.
- Handel ML, McMorrow LB, Gravalles EM (1995) Nuclear factor-kappa B in rheumatoid synovium. Localization of p50 and p65. *Arthritis Rheum* 38:1762-1770.
- Hart TC, Marazita ML, Schenkein HA, Diehl SR (1992) Re-interpretation of the evidence for X-linked dominant inheritance of juvenile periodontitis. *J Periodontol* 63:169-173.
- Hart LA, Krishnan VL, Adcock IM, Barnes PJ, Chung KF (1998) Activation and localization of transcription factor, nuclear factor-kappaB, in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 158:1585-1592.
- Hatakeyama J, Tamai R, Sugiyama A, Akashi S, Sugawara S, Takada H (2003) Contrasting responses of human gingival and periodontal ligament fibroblasts to bacterial cell-surface components through the CD14/Toll-like receptor system. *Oral Microbiol Immunol* 18:14-23.
- Hasebe A, Yoshimura A, Into T, Kataoka H, Tanaka S, Arakawa S, Ishikura H, Golenbock DT, Sugaya T, Tsuchida N, Kawanami M, Hara Y, Shibata K (2004) Biological activities of *Bacteroides forsythus* lipoproteins and their possible pathological roles in periodontal disease. *Infect Immun* 72:1318-1325.
- Haubek D, Ennibi OK, Væth M, Poulsen S, Kilian M (2008) Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet* 371:237-242.

- Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, Qureshi N, Michalek SM, Vogel SN (2001) Signaling by toll-like Receptor 2 und 4 Agonists Results in Differential Gene Expression in Murine Macrophages. *Infect Immun* 69:1477-1482.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162:3749-3752.
- Kang TJ, Chae GT (2001) Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 31:53-58.
- Kaplan JB, Perry MB, MacLean LL, Furgang D, Wilson ME, Fine DH (2001) Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infect Immun* 69:5375-5384.
- Karban AS, Okazaki T, Panhuysen CI, Gallegos T, Potter JJ, Bailey-Wilson JE, Silverberg MS, Duerr RH, Cho JH, Gregersen PK, Wu Y, Achkar JP, Dassopoulos T, Mezey E, Bayless TM, Novet FJ, Brant SR (2004) Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* 13:35-45.
- Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kB activity. *Annu Rev Immunol* 18:621-663.
- Kawai T, Akira S (2007) Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13:460-469.
- Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JM, Schuren FH, Montijn RC, ten Cate JM, Crielaard W (2008) Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res* 87:1016-1020.
- Kida Y, Kobayashi M, Suzuki T, Takeshita A, Okamatsu Y, Hanazawa S, Yasui T, Hasegawa K (2005) Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF-kappaB in human gingival fibroblasts. *Cytokine* 29:159-168.
- Kikkert R, Laine ML, Aarden LA, van Winkelhoff AJ (2007) Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 3:145-151.
- Kimura S, Yonemura T, Hiraga T, Okada H (1992) Flow cytometric evaluation of phagocytosis by peripheral blood polymorphonuclear leucocytes in human periodontal diseases. *Arch Oral Biol* 37:495-501.
- Kinane DF, Lappin DF (2002) Immune processes in periodontal disease: a review. *Ann Periodontol* 7:62-71.

- Kinane DF, Mark Bartold P (2007) Clinical relevance of the host responses of periodontitis. *Periodontol* 2000 43:278-293.
- Kornman KS, Crane A, Wang, HY, di Giovane FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TG, Higginbottom FL, Duff GW (1997a) The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 24:72-77.
- Kornman KS, Page RC, Tonetti MS (1997b) The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol* 2000 14:33-53.
- Kusumoto Y, Hirano H, Saitoh K, Yamada S, Takedachi M, Nozaki T, Ozawa Y, Nakahira Y, Saho T, Ogo H, Shimabukuro Y, Okada H, Murakami S (2004) Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptor 2. *J Periodontol* 75:370-379.
- Kutukculer N, Yeniay BS, Aksu G, Berdeli A (2007) Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor-2 gene in children with recurrent febrile infections. *Biochem Genet* 45:507-514.
- Lange DE, Plagmann HC, Eenboom A, Promesberger A (1977) Klinische Bewertungsverfahren zur Objektivierung der Mundhygiene. *Dtsch Zahnärztl Z* 32:44-47.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
- Li Q, Verma IM (2002) NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2:725-34.
- Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G (1999) Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* 274:33419-33425.
- Lindhe J, Hamp SE, Löe H (1975) Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometrical study. *J Periodontal Res* 10:243-255.
- Listgarten MA (1976) Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol* 47:1-18.
- Listgarten MA (1988) The role of dental plaque in gingivitis and periodontitis. *J Clin Periodontol* 15:485-487.
- Lo SS, Chen JH, Wu CW, Lui WY (2009) Functional polymorphism of NFKB1 promoter may correlate to the susceptibility of gastric cancer in aged patients. *Surgery* 145:280-285.
- Löe H, Theilade E, Jensen SB (1965) Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 36:177-187.

- Long JC, Nance WE, Waring P, Burmeister JA, Ranney RR (1987) Early onset periodontitis: a comparison and evaluation of two proposed modes of inheritance. *Genet Epidemiol* 4:13-24.
- Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA (2000) A Novel Polymorphism in the Toll-like Receptor 2 Gene and Its Potential Association with Staphylococcal Infection. *Infect Immun* 68:6398-6401.
- Malhotra D, Relhan V, Reddy BNS, Bamezai R (2005) TLR2 Arg677Trp polymorphism in leprosy: revisited. *Hum Genet* 116:413-415.
- Marazita ML, Burmeister JA, Gunsolley JC, Koertge TE, Lake K, Schenkein HA (1994) Evidence for autosomal dominant inheritance and race-specific heterogeneity in early-onset periodontitis. *J Periodontol* 65:623-630.
- Martin M, Katz J, Vogel SN, Michalek SM (2001) Differential induction of endotoxin tolerance by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *J Immunol* 167:5278-5285.
- Marsh PD (1994) Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 8:263-271.
- Marsh PD (2004) Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 38:204-211.
- Mathur A, Michalowicz BS (1997) Cell-mediated immune system regulation in periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med* 8:76-89.
- May MJ, Ghosh S (1997) Rel/NF-kappaB and IkappaB proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* 8:63-73.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
- Medzhitov R (2001) Toll-like Receptors and Innate Immunity. *Nat Rev Immunol* 1:135-145.
- Melnick M, Shields ED, Bixler D (1976) Periodontosis: a phenotypic and genetic analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 42:32-41.
- Michalowicz BS, Aeppli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL, Bouchard TJ Jr, Pihlstrom BL (1991) Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol* 2:293-299.
- Michalowicz BS (1994) Genetic risk factors for the periodontal diseases. *Compendium* 15:1036, 1038, 1040 passim.
- Milward MR, Chapple IL, Wright HJ, Millard JL, Matthews JB, Cooper PR (2007) Differential activation of NF-kappaB and gene expression in oral epithelial cells by periodontal pathogens. *Clin Exp Immunol* 148:307-324.

- Moens L, Verhaegen J, Pierik M, Vermeire S, De Boeck K, Peetermans WE, Bossuyt X (2007) Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphisms in invasive pneumococcal disease. *Microbes Infect* 9:15-20.
- Mombelli A, Casagni F, Madianos PN (2002) Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? *J Clin Periodontol* 29:10-21.
- Moore WEC, Moore LVH (1994) The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 5:66-77.
- Mori Y, Yoshimura A, Ukai T, Lien E, Espevik T, Hara Y (2003) Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 18:54-58.
- Moughal NA, Adonogianaki E, Thornhill MH, Kinane DF (1992) Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally-induced gingivitis. *J Periodontal Res* 27:623-630.
- Nakao S, Ogata Y, Shimizu-Sasaki E, Yamazaki M, Furuyama S, Sugiya H (2000) Activation of NF $\kappa$ B is necessary for IL-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in human gingival fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 209:113-118.
- Nolan GP, Fujita T, Bhatia K, Huppi C, Liou HC, Scott ML, Baltimore D (1993) The bcl-3 proto-oncogene encodes a nuclear I  $\kappa$ B-like molecule that preferentially interacts with NF- $\kappa$ B p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner. *Mol Cell Biol* 13:3557-3566.
- Ogus AC, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, Olcen S, Keser I, Coskun M, Cilli A, Yegin O (2004) The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J* 23:219-223.
- Onishi S, Honma K, Liang S, Stathopoulou P, Kinane D, Hajishengallis G, Sharma A (2008) Toll-like receptor 2-mediated interleukin-8 expression in gingival epithelial cells by the *Tannerella forsythia* leucine-rich repeat protein BspA. *Infect Immun* 76:198-205.
- Pabst S, Yenice V, Lennarz M, Tuleta I, Nickenig G, Gillissen A, Grohé C (2009) Toll-like receptor 2 gene polymorphisms Arg677Trp and Arg753Gln in chronic obstructive pulmonary disease. *Lung* 187:173-178.
- Page RC (1991) The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 26:230-242.
- Page RC, Kornman KS (1997) The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000 14:9-11.

- Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS (1997) Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000 14:216-248.
- Pahl HL (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18:6853-6866.
- Pallone F, Monteleone G (2001) Mechanisms of tissue damage in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 17:307-312.
- Pociot F, Mølviq J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J (1992) A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 22:396-402.
- Rahman I, MacNee W (1998) Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax* 53:601-612.
- Ranney RR (1991) Immunologic mechanisms of pathogenesis in periodontal diseases: an assessment. *J Periodontal Res* 26:243-254.
- Ren L, Leung WK, Darveau RP, Jin L (2005) The expression profile of lipopolysaccharide-binding protein, membrane-bound CD14, and toll-like receptors 2 and 4 in chronic periodontitis. *J Periodontol* 76:1950-1959.
- Ruby J, Rehani K, Martin M (2007) *Treponema denticola* activates mitogen-activated protein kinase signal pathways through Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 75:5763-5768.
- Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD (1997) Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000 14:173-201.
- Sarah SM, Tamilselvan S, Kamatchiammal S, Suresh R (2006) Expression of Toll-like receptors 2 and 4 in gingivitis and chronic periodontitis. *Indian J Dent Res* 17:114-116.
- Schaefer AS, Richter GM, Nothnagel M, Laine ML, Rühling A, Schäfer C, Cordes N, Noack B, Folwaczny M, Glas J, Dörfer C, Dommisch H, Groessner-Schreiber B, Jepsen S, Loos BG, Schreiber S (2010) A 3' UTR transition within DEFB1 is associated with chronic and aggressive periodontitis. *Genes Immun* 11:45-54.
- Schröder NWJ, Hermann C, Hamann L, Goebel UB, Hartung T, Schuhmann RR (2003) High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a allele-specific PCR. *J Mol Med* 81:368-372
- Schröder NW, Diterich I, Zinke A, Eckert J, Draing C, von Baehr V, Hassler D, Priem S, Hahn K, Michelsen KS, Hartung T, Burmester GR, Göbel UB, Hermann C, Schumann RR (2005) Heterozygous Arg753Gln polymorphism of human TLR-2 impairs immune activation by *Borrelia burgdorferi* and protects from late stage Lyme disease. *J Immunol* 175:2534-2540.

- Sen R, Baltimore D (1986) Inducibility of  $\kappa$  immunoglobulin enhancer-binding protein NF- $\kappa$ B by a post-translational mechanism. *Cell* 47:921-928.
- Siebenlist U, Franzoso G, Brown K (1994) Structure, regulation and function of NF- $\kappa$ B. *Annu Rev Cell Biol* 10:405-455.
- Slots J (1977) Microflora in the healthy gingival sulcus in man. *Scand J Dent Res* 85:247-254.
- Slots J (1979) Subgingival microflora and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 6:351-382.
- Slots J (1999) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease: introduction. *Periodontol* 2000 20:7-13.
- Socransky SS (1979) Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 6:16-21.
- Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S (1991) Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol* 18:766-775.
- Socransky SS, Haffajee AD (1994) Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol* 2000 5:7-25.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25:134-144.
- Socransky SS, Haffajee AD (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 38: 135-187.
- Sugawara S, Yang S, Iki K, Hatakeyama J, Tamai R, Takeuchi O, Akashi S, Espevik T, Akira S, Takada H (2001) Monocytic cell activation by Nonendotoxic glycoprotein from *Prevotella intermedia* ATCC 25611 is mediated by toll-like receptor 2. *Infect Immun* 69:4951-4957.
- Sugawara Y, Uehara A, Fujimoto Y, Kusumoto S, Fukase K, Shibata K, Sugawara S, Sasano T, Takada H (2006) Toll-like receptors, NOD1, and NOD2 in oral epithelial cells. *J Dent Res* 85:524-529.
- Takashiba S, Van Dyke TE, Amar S, Murayama Y, Soskolne AW, Shapira L (1999) Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor  $\kappa$ B. *Infect Immun* 67:5573-5578.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like Receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-376.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T (1999) Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11:443-451.
- Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13:933-940.

- Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S (2002) Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169:10-14.
- Teng YT (2006) Protective and destructive immunity in the periodontium: Part 1-innate and humoral immunity and the periodontium. *J Dent Res* 85:198-208.
- Theilade E (1996) The experimental gingivitis studies: the microbiological perspective. *J Dent Res* 75:1434-1438.
- Tonetti MS, Mombelli A (1999) Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol* 4:39-53.
- Trapani JA (1995) Target cell apoptosis induced by cytotoxic T cells and natural killer cells involves synergy between the pore-forming protein, perforin, and the serine protease, granzyme B. *Aust N Z J Med* 25:793-799.
- Van Dyke TE, Wilson-Burrows C, Offenbacher S, Henson P (1987) Association of an abnormality of neutrophil chemotaxis in human periodontal disease with a cell surface protein. *Infect Immun* 55:2262-2267.
- Van Dyke TE, Sheilesh D (2005) Risk factors for periodontitis. *J Int Acad Periodontol* 7:3-7.
- Vardar-Sengul S, Arora S, Baylas H, Mercola D (2009) Expression profile of human gingival fibroblasts induced by interleukin-1beta reveals central role of nuclear factor-kappa B in stabilizing human gingival fibroblasts during inflammation. *J Periodontol* 80:833-849.
- Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S (1995) Rel/NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 9:2723-2735.
- West AP, Koblansky AA, Ghosh S (2006) Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 409-437.
- Williams RC (1990) Periodontal disease. *N Engl J Med* 322:373-382.
- World Health Organisation (1978) Epidemiology, etiology and prevention of periodontal diseases, Technical Report Series 621 Geneva, Switzerland.
- Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS (2000) Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 27:648-57.
- Yamamoto M, Takeda K (2008) Role of nuclear I $\kappa$ B proteins in the regulation of host immune responses. *J Infect Chemother* 14:265-269.
- Yamazaki K, Ohsawa Y, Yoshie H (2001) Elevated proportion of natural killer T cells in periodontitis lesions: a common feature of chronic inflammatory diseases. *Am J Pathol* 158:1391-1398.

- Yang HW, Asikainen S, Doğan B, Suda R, Lai CH (2004) Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b to aggressive periodontitis: frequency in pure cultured isolates. *J Periodontol* 75:592-599.
- Yang HW, Huang YF, Chan Y, Chou MY (2005) Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. *Eur J Oral Sci* 113:28-33.
- Yoshie H, Kobayashi T, Tai H, Galicia JC (2007) The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontol 2000* 43:102-132.
- Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D (1999) Cutting edge: Recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 163:1-5.
- Yoshimura A, Kaneko T, Kato Y, Golenbock DT, Hara Y (2002) Lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* are antagonists for human Toll-like receptor 4. *Infect Immun* 70:218-225.
- Zambon JJ, Slots J, Genco RJ (1983) Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect Immun* 41:19-27.
- Zhu G, Li C, Cao Z, Corbet EF, Jin L (2008) Toll-like receptors 2 and 4 gene polymorphisms in a Chinese population with periodontitis. *Quintessence Int* 39:217-226.



### c) Restriktionsspaltung

Restriktionsendonuklease für TLR-2  
Arg677Trp Mwo I New England Biolabs, Frankfurt (Deutschland)

NE Buffer 3 New England Biolabs, Frankfurt (Deutschland)

Restriktionsendonuklease für TLR-2  
Arg753Gln Msp I New England Biolabs, Frankfurt (Deutschland)

NE Buffer 2 New England Biolabs, Frankfurt (Deutschland)

### d) Gelelektrophorese

Sekam-Agarose Biozym, Hess (Deutschland)  
100bp-Leiter Gibco BRL, Eggenstein (Deutschland)  
0,5xTBE-Puffer (45 mM Tris-HCl,  
45 mM, Boräure, 0,5mM EDTA, pH 8,3)  
Ethidiumbromid

### e) Polyacrylamid-Gelelektrophorese

5xTBE-Puffer (450 mM Tris-HCl,  
450 mM, Boräure, 5 mM EDTA, pH 8,3)  
Gel-Fix for PAG Serva, Heidelberg (Deutschland)  
Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)  
Amoniumpersulfat  
Tetramethylethylendiamin (TEMED)  
Isopropanol  
Aqua dest.

### f) Silberfärbung des Polyacrylamid-Gels

Methanol  
Essigsäure  
Ethanol  
Silbernitrat  
NaOH, NaBH<sub>4</sub>, Formaldehyd, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Glycerin  
Aqua dest.



## 9. Thesen

1. Parodontitis ist eine entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparats. Primärer ätiologischer Faktor ist die mikrobielle Plaque. Die Pathogenese der Parodontitis wird durch verschiedene Risikofaktoren beeinflusst.
2. In Familien- und Zwillingsstudien wurde auf die Existenz genetisch prädisponierender Risikofaktoren für Parodontitis hingewiesen, deren Einfluss auf ca. 40-50 % geschätzt wird. Von besonderer Bedeutung sind hierbei Kandidatengene, die für Mediatoren der Immunantwort kodieren. In diesem Zusammenhang sind auch Polymorphismen in den Genen für TLR-2 und NF- $\kappa$ B von Bedeutung, da diese die Signaltransduktionskaskade zur Aktivierung der Genexpression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  beeinflussen. Diese Zytokine besitzen eine bedeutende Rolle bei der parodontalen Destruktion.
3. Die Ziele dieser Studie waren deshalb, eine mögliche Relation der Polymorphismen Arg677Trp und Arg753Gln im TLR-2-Gen und des -94 ins/del ATTG Promotorpolymorphismus im NF- $\kappa$ B-Gen zur Parodontitis sowie zum Nachweis subgingivaler parodontaler Markerbakterien zu analysieren.
4. Es wurden 78 Patienten mit generalisierter aggressiver und 63 mit generalisierter chronischer Parodontitis in die Studie eingeschlossen. Die Kontrollgruppe bestand aus 81 parodontitisfreien Probanden. Die drei Polymorphismen wurden mittels Restriktions- und Fragment-Längen-Analyse bestimmt. Der Nachweis der parodontopathogenen Bakterien erfolgte nach Amplifikation bakterienspezifischer DNA-Abschnitte über DNA-Sonden.
5. Unter allen Studienteilnehmern konnte nur der Arg/Arg-Wildtyp des Arg677Trp-Polymorphismus im TLR-2-Gen nachgewiesen werden. Daher war dieser Polymorphismus weder zur Parodontitis noch zur Präsenz parodontaler Markerbakterien assoziiert.
6. Der Arg/Gln-Genotyp des Arg753Gln-Polymorphismus im TLR-2-Gen kam vermehrt in den Patientengruppen mit generalisierter aggressiver und generalisierter chronischer Parodontitis vor. Jedoch konnte im Vergleich zur parodontitisfreien Kontrollgruppe keine statistische Signifikanz festgestellt werden.
7. Bei Trägern des heterozygoten Arg/Gln-Genotyps des Arg753Gln-Polymorphismus wurde im bivariaten Vergleich zu Arg/Arg-positiven Probanden häufiger eine subgingivale Besiedlung mit den Bakterien des roten Komplexes (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*) nachgewiesen (90,9% vs. 55,0%,  $p=0,026$ ). Diese Assoziation

konnte jedoch im multivariaten Modell unter Berücksichtigung etablierter Kofaktoren für die subgingivale Keimbeseidlung nicht bestätigt werden.

8. Für den Arg753Gln-Polymorphismus im TLR-2-Gen ist zusammenfassend festzustellen, dass der Arg/Gln-Genotyp weder zur Parodontitis und nach Adjustierung ebenfalls nicht zur subgingivalen Keimbeseidlung assoziiert ist.
9. Unter Annahme eines ins-dominanten Modells (ins/ins- + ins/del-Genotyp vs. del/del-Genotyp) war der del/del-Genotyp des -94 ins/del ATTG Polymorphismus im NF- $\kappa$ B-Gen im bivariaten Vergleich und auch im multivariaten Modell unter Berücksichtigung etablierter Kofaktoren für Parodontitis und Bakterienbeseidlung sowohl zur aggressiven Parodontitis (OR=2,6, p=0,047, 95 % Konfidenzintervall=1,01-6,56) als auch zum Nachweis von *A. actinomycetemcomitans* (OR=2,5, p=0,018, 95 % Konfidenzintervall=1,17-5,32) assoziiert.
10. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der del/del-Genotyp des NF- $\kappa$ B einen Risikoindikator für aggressive Parodontitis darstellt. Ursache dafür könnte die del-assozierte verringerte Promotoraktivität sein, die die NF- $\kappa$ B-regulierte Immunantwort gegen *A. actinomycetemcomitans* beeinträchtigt. Dies muss in weiteren Studien untersucht werden.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Lisa Hierse  
Geburtsdatum: 08.09.1984  
Geburtsort: Brandenburg  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

### **Schulbildung**

1991 - 1995 Grundschule  
1995 - 2004 Gymnasium  
2004 Abitur

### **Hochschulausbildung**

2004 Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg  
2005 Naturwissenschaftliche Vorprüfung  
2007 Zahnärztliche Vorprüfung  
2009 Staatsexamen, Approbation als Zahnärztin

### **Berufstätigkeit**

12.2009 - 05.2010 Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Dr. med. Hartmut Hierse,  
Magdeburg  
Seit 05.2010 Forschungsstipendium in der Klinischen Forschergruppe 208 der  
Universitätszahnklinik Bonn

Bonn, den 21.06.2010

## **Erklärung**

Ich erkläre, dass die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Bonn, den 21.06.2010

Ich erkläre weiterhin, dass frühere Promotionsversuche mit der gleichen oder einer anderen Dissertation nicht erfolgt sind. Die vorliegende Arbeit wird erstmalig und nur an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg eingereicht.

Bonn, den 21.06.2010

### **Hinweise auf Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit**

L. Hierse, S. Schulz, J. Klapproth, U. Zimmermann, C. Gläser, H.-G. Schaller, S. Reichert (2008) Vortrag und Posterdemonstration zur Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie e.V. in Nürnberg 26.-27. September 2008: Parodontologie 2008 19:320.

Der -94 ins/del ATTG-Promotorpolymorphismus im Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B bei Patienten mit aggressiver oder chronischer Parodontitis.

L. Hierse, S. Reichert, H.-G. Schaller, S. Schulz (2008) Vortrag zum 8. Friedrich-Ludwig-Hesse-Symposium: Der -94 ins/del ATTG Promotorpolymorphismus im Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B bei Patienten mit aggressiver oder chronischer Parodontitis.

L. Hierse, S. Schulz, J. Klapproth, U. Zimmermann, C. Gläser, H.-G. Schaller, S. Reichert (2009) Der -94 ins/del ATTG Promotorpolymorphismus im Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B bei Patienten mit aggressiver oder chronischer Parodontitis. Int Poster J Dent Oral Med., Vol 11, (02), Poster 443.

Schulz S, Hierse L, Altermann W, Klapproth J, Zimmermann U, Reichert Y, Gläser C, Kluttig A, Stein JM, Schaller HG, Reichert S. (2010) The del/del genotype of the nuclear factor-kappaB -94ATTG polymorphism and its relation to aggressive periodontitis. J Periodontal Res 45:396-403.

### **Hinweis auf erhaltene Preise für die Ergebnisse dieser Arbeit**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden mit dem "Wissenschaftspreis der Zahnärztekammer Niedersachsen 2010" ausgezeichnet.

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. med. dent. Stefan Reichert für die Überlassung dieses interessanten Themas, das sorgfältige Heranführen an die Problematik und seine fortwährende Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit. Weiterhin danke ich ihm für die wohlwollende Förderung während der Zusammenarbeit.

Frau Dr. rer. nat. Susanne Schulz möchte ich vielmals für Ihre Hilfe und enge Zusammenarbeit bei der Durchführung des molekulargenetischen und statistischen Teils der Arbeit, ihre wertvollen Hinweise und Ratschläge sowie die fachliche und freundschaftliche Unterstützung bei der Bearbeitung meines Dissertationsthemas und darüber hinaus danken.

Herrn Prof. Dr. med. dent. H.-G. Schaller danke ich für die Möglichkeit, an der Klinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie promovieren zu können und die Unterstützung dieser Studie.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir nicht nur die umfangreiche Ausbildung ermöglichten und mir in jeglicher Hinsicht bis in die letzten Schritte dieser Arbeit beistanden, sondern mich immer mit aller Kraft unterstützen und mir stets den nötigen Rückhalt für meine Vorhaben geben.