

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchung des Einflusses von
Mutationen des Toll-like Rezeptors 2 auf
die Inzidenz und den Verlauf von
Parodontalerkrankungen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Valeska Julia Wolff
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. R. Schumann
 2. Priv.-Doz. Dr. med. St. Hägewald
 3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. C. Kirschning

Datum der Promotion: 20. Februar 2008

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Arg677Trp- und des Arg753Gln-Polymorphismus des Toll-like Rezeptors 2 (TLR2) auf die Inzidenz und den Verlauf der Parodontitis untersucht. Dazu wurden bei allen Studienteilnehmern Abstriche von der Wangenschleimhaut genommen. Nach der Probenentnahme wurde DNA extrahiert, mittels PCR amplifiziert, zu Fragmenten unterschiedlicher Längen verdaut, die schließlich mit Hilfe der Gelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt und sichtbar gemacht wurden. Das Verfahren des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) ermöglicht die visuelle Auswertung, ob der Wildtyp oder ein Polymorphismus des untersuchten Gens vorliegen. Es konnte ein Trend zu geringeren Frequenzen in der Gruppe der Parodontitispatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen festgestellt werden, der jedoch der statistischen Prüfung nicht standhielt.

Schlagwörter:

Parodontitis, TLR2, Single Nucleotide Polymorphism (SNP), Arg677Trp, Arg753Gln

In the present thesis the influence of the Toll-like receptor 2 (TLR2) – polymorphisms Arg677Trp and Arg753Gln on incidence and progression of periodontitis was investigated. For that purpose a swab from the buccal mucosa of all probands was taken. After sampling, DNA was extracted, amplified by PCR, digested to fragments of different lengths, which were isolated by gel electrophoresis and visualized. The procedure of restriction fragment length polymorphism (RFLP) enables the visual interpretation, whether the wild type or a polymorphism of the examined gene is present. A tendency to lower frequencies was determined in the cohort of patients with periodontitis compared to healthy controls, although it could not defy statistical evaluation.

Keywords:

Periodontitis, TLR2, Single Nucleotide Polymorphism (SNP), Arg677Trp, Arg753Gln

Meiner Großmutter Halina Brandt

Abkürzungsverzeichnis

95% CI	95% Konfidenzintervall
AP	Aggressive Parodontitis
APC	Antigen Presenting Cell
Arg677Trp	Substitution von Arginin durch Typtophan an der Aminosäurestelle 677 (C2029T)
Arg753Gln	Substitution von Arginin durch Glutamin an der Aminosäurestelle 753 (G2258A)
as	Antisense
bp	Basenpaare
CAL	Clinical Attachment Loss
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Cytomegalie-Virus
CP	Chronische Parodontitis
DC	Dendritic Cell
FADD	Fas-Associated Death Domain Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GroEL	Chaperon, Homolog der HSP60-Familie
HEK	Human Embryonic Kidney
HSP	Hitze Schock Protein
HSV	Herpes Simplex Virus
I- κ B	Inhibitor of κ B
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
IL-1R	IL-1-Rezeptor
IMD	Immune Deficiency
IRAK	IL-1R-Associated Kinase

Abkürzungsverzeichnis

IRF	Interferon Regulatory Factor
kDa	Kilo Dalton
LAM	Lipoarabinomannan
LBP	LPS Binding Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche Region
LTA	Lipoteichoic Acid
MALP	Mycoplasma Activating Lipoprotein
mCD14	Membran-CD14
MD2	Myeloid Differentiation Factor 2
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NEMO	NF- κ B Essential Modulator
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
NK	Natürliche Killerzellen
Pam ₃ CysK4	Synthetische Lipoproteinstruktur
PAMP	Pattern Associated Molecular Pattern
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGE2	Prostaglandin-E2
PGN	Peptidoglycan
PI ₃ K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PRR	Pattern Recognition Receptor
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RIP1	Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase 1
RNA	Ribonucleinacid

Abkürzungsverzeichnis

s	Sense
sCD14	Soluble CD14
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TANK	Regulatory subunit TNFR-associated factor family member-associated NF- κ B activator
TBK	TANK-Binding Kinase
TGF	Tumor Growth Factor
Th1/2	T-Helferzelle
THP	Human acute monocytic leukaemia cell line
TIR	Toll-like/IL-1-Rezeptor
TIRAP	TIR-Activating Protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	TNF Receptor
TRAF6	TNF Receptor-Associated Factor 6
TRAM	TRIF-Related Adaptor Molecule
TRIF	TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- β
wt	Wildtyp

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	DAS IMMUNSYSTEM	1
1.1.1	ANGEBORENES IMMUNSYSTEM	1
1.1.2	ADAPTIVES IMMUNSYSTEM	3
1.2	PARODONTITIS	4
1.2.1	DEFINITION	4
1.2.2	ÄTIOLOGIE	5
1.2.3	PATHOGENESE	6
1.2.4	PARODONTALPATHOGENE KEIME	7
1.2.5	RISIKOFAKTOREN	9
1.2.6	KLASSIFIKATION	10
1.2.6.1	Chronische Parodontitis	11
1.2.6.2	Aggressive Parodontitis	11
1.3	TOLL-LIKE REZEPTOREN	12
1.3.1	<i>DROSOPHILA</i> TOLL UND DIE ENTDECKUNG DER TOLL-LIKE REZEPTOREN	12
1.3.2	DIE FAMILIE DER TOLL-LIKE REZEPTOREN	13
1.3.2.1	Lokalisation und Expression	14
1.3.2.2	Liganden	15
1.3.2.3	Signaltransduktion	18
1.3.3	MUTATIONEN DES TLR2-GENS	21
1.4	TLR2 UND PARODONTITIS	23
1.5	AUFGABENSTELLUNG	26
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	27
2.1	MATERIAL	27
2.1.1	CHEMIKALIEN	27
2.1.2	GERÄTE	29
2.2	METHODEN	29
2.2.1	AUSWAHL DER PATIENTEN	29
2.2.1.1	Einschlusskriterien	30
2.2.1.2	Ausschlusskriterien	31
2.2.1.3	Erfassungsbogen	31

2.2.2	WANGENSCHLEIMHAUTABSTRICH	32
2.2.3	DNA-EXTRAKTION	32
2.2.4	POLYMORPHISMUS-BESTIMMUNG	33
2.2.4.1	PCR	33
2.2.4.2	Enzym-Verdau	34
2.2.4.3	Gelelektrophorese	35
2.2.5	STATISTISCHE AUSWERTUNG	37

3 ERGEBNISSE

3.1	UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VON MUTATIONEN DES TOLL-LIKE REZEPTORS 2 AUF DIE INZIDENZ DER PARODONTITIS	40
3.2	UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VON MUTATIONEN DES TOLL-LIKE REZEPTORS 2 AUF DEN VERLAUF DER PARODONTITIS	42
3.2.1	CHRONISCHE PARODONTITIS	42
3.2.2	AGGRESSIVE PARODONTITIS	42
3.3	VERGLEICH VON RAUCHERN UND NICHTRAUCHERN MIT PARODONTITIS	43
3.3.1	VERGLEICH VON RAUCHERN UND NICHTRAUCHERN MIT CHRONISCHER PARODONTITIS	45
3.3.2	VERGLEICH VON RAUCHERN UND NICHTRAUCHERN MIT AGGRESSIVER PARODONTITIS	46
3.4	VERGLEICH MIT ÜBER 60-JÄHRIGEN PARODONTAL GESUNDEN	46
3.5	HARDY-WEINBERG-EQUILIBRIUM	48
3.6	STATISTISCHE AUSWERTUNG	50
3.6.1	POWER ANALYSE UND FALLZAHLSCHÄTZUNG	50

4 DISKUSSION

4.1	METHODE	53
4.1.1	PROBANDENAUSWAHL UND KLASSIFIZIERUNG	53
4.1.2	POLYMORPHISMUSBESTIMMUNG	55
4.1.3	GRENZEN GENETISCHER ASSOZIATIONSSTUDIEN	56
4.2	ERGEBNISSE	57
4.2.1	EINFLUSS VON TLR2 AUF INFEKTIONEN UND ANDERE ERKRANKUNGEN	57
4.2.2	MIT PARODONTITIS ASSOZIIERTE POLYMORPHISMEN	61
4.2.3	DER EINFLUSS DES ARG753GLN-POLYMORPHISMUS AUF DIE INZIDENZ DER PARODONTITIS	63

Inhaltsverzeichnis

4.2.4	DER EINFLUSS DES ARG753GLN-POLYMORPHISMUS AUF DEN VERLAUF DER PARODONTITIS	65
4.2.5	DER EINFLUSS DES ARG753GLN-POLYMORPHISMUS AUF INZIDENZ UND VERLAUF DER PARODONTITIS IN ABHÄNGIGKEIT VOM RAUCHERSTATUS	66
4.3	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	66
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	68
	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	70
	DANKSAGUNG	94
	LEBENS LAUF	95
	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	96

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Die Fähigkeit des menschlichen Organismus, Infektionen von Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten abzuwehren, beruht auf einem System von Organen, Zellen und löslichen Proteinen: dem Immunsystem. Bereits an der Körperoberfläche wird das Eindringen von Mikroorganismen durch die Barrierefunktion von Haut und Schleimhäuten verhindert. Weiteren Schutz bieten ein niedriger pH-Wert, bakterizide Substanzen (Lysozym, Laktoferrin) und die gerichtete Motilität von Zilien. Gelangen die pathogenen Keime dennoch in den Körper, bildet das Immunsystem eine Abwehrreaktion aus. Die Keime sind zunächst mit weiteren im immunologischen Sinne unspezifischen zellulären und humoralen Abwehrmechanismen konfrontiert: Den phagozytischen Zellen, wie Granulozyten und Monozyten/Makrophagen, den Natürliche Killer (NK)-Zellen, dem Komplementsystem (Aktivierung über den alternativen Weg) und den lokal produzierten Zytokinen mit proinflammatorischer (TNF α , IL-1) oder antiviraler (IFN) Wirkung. Die Abwehr ist darauf ausgerichtet, Pathogene zu erkennen und zu bekämpfen. Innerhalb der immunologischen Abwehr unterscheidet man ein angeborenes unspezifisches und ein erworbenes spezifisches Immunsystem. Beide Systeme beinhalten zelluläre und humorale Bestandteile. [JANEWAY, 1989; MEDZHITOV UND JANEWAY, 1997; JANEWAY UND MEDZHITOV, 2002; SANDERINK ET AL., 2004]

1.1.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist ein evolutionär altes System der Abwehr von mikrobiellen Infektionen. In Säugetieren und anderen Vertebraten kontrolliert es die Aktivierung der adaptiven Immunantwort und determiniert die Art der Effektorantwort [JANEWAY, 1989]. Diese beiden Funktionen hängen entscheidend von der Fähigkeit des Immunsystems ab, die Präsenz infektiöser Mikroorganismen zu erkennen und

eine Reihe endogener Signale, wie inflammatorische Zytokine und Chemokine, zu induzieren. Diese Signale wiederum rekrutieren und aktivieren Antigen-spezifische Lymphozyten und induzieren deren Differenzierung zu Effektorzellen. Granulozyten, Monozyten und Makrophagen sind die primären Effektorzellen der angeborenen Immunabwehr und gelangen als erste an den Infektionsherd, wo sie körperfremdes Material phagozytieren.

Das angeborene Immunsystem kann konservierte mikrobielle Strukturen oder Produkte des mikrobiellen Metabolismus, so genannte „Pathogen Associated Molecular Patterns“ (PAMPs), durch ein Set von Keim-kodierten Rezeptoren, den „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs) erkennen [JANEWAY, 1989; MEDZHITOV UND JANEWAY, 1997]. PAMPs haben drei gemeinsame Eigenschaften, die sie zu idealen Zielen machen: Erstens werden PAMPs nur von Mikroorganismen produziert und nicht von Wirtszellen. Somit hat das Immunsystem die Möglichkeit zwischen „fremd“ und „selbst“ zu unterscheiden [MEDZHITOV UND JANEWAY, 2002]. Zweitens gibt es keine Unterschiede zwischen den PAMPs einer Mikroorganismenklasse, wodurch nur eine begrenzte Anzahl von PRRs notwendig ist, um mikrobielle Infektionen zu erkennen. Drittens sind PAMPs essentiell für das mikrobielle Überleben. PRRs signalisieren somit die Anwesenheit von Pathogenen. Sie induzieren die Expression von B7-Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs). Diese stellen den antigen-spezifischen T-Zellen Informationen bezüglich des mikrobiellen Ursprungs der Antigene zur Verfügung. Das angeborene Immunsystem bedient sich verschiedener PRRs, die auf der Zelloberfläche oder in intrazellulären Kompartimenten exprimiert, respektive in das Blut oder in Gewebeflüssigkeiten sezerniert werden. Die generellen Funktionen der PRRs beinhalten Opsonierung, Aktivierung von Komplementsystem und Koagulationskaskaden, Phagozytose, Aktivierung von proinflammatorischen Signalwegen und Apoptose-Induktion [MEDZHITOV UND JANEWAY, 1997]. Die PRRs des angeborenen Immunsystems sind vor allem auf Makrophagen und dendritischen Zellen lokalisiert. Durch Induktion von antimikrobiellen Genen und inflammatorischen Zytokinen sind sie verantwortlich für die Initiation der akuten inflammatorischen Reaktion gegen eindringende Pathogene [TAKEDA ET AL., 2003].

Zu den PRRs gehört auch die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLRs). TLR-Signale führen zur Aktivierung von Phagozyten. In den letzten Jahren durchgeführte Studien kommen zu dem Schluss, dass die TLRs eine entscheidende Rolle in der Induktion des angeborenen Immunsystems spielen. [MEDZHITOV UND JANEWAY, 1997; AKIRA ET AL., 2001; MEDZHITOV, 2001; MICHELSEN ET AL., 2001; JANEWAY UND MEDZHITOV, 2002; NETEA ET AL., 2004; PASARE UND MEDZHITOV, 2004; VIAU UND ZOUALI, 2005].

1.1.2 Adaptives Immunsystem

Während die Abwehr der meisten Tierspezies vollständig auf dem angeborenen Immunsystem beruht, haben Vertebraten eine zusätzliche, komplexere Abwehr entwickelt, die erworbenes oder adaptives Immunsystem genannt wird. Die adaptive Immunität stellt die Reaktion antigenspezifischer T- und B-Lymphozyten auf Antigene dar. Adaptive Immunantworten entstehen durch Selektion bestimmter Lymphozytenklone. Zur adaptiven Immunität gehört auch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Die Funktion des erworbenen Immunsystems beruht auf einem unterschiedlichen Set somatisch rearrangierter Antigen-Rezeptoren, den T- und B-Zellrezeptoren, die eine große Vielfalt von Antigenen sowohl eigenen als auch fremden Ursprungs erkennen. Obwohl T- und B-Lymphozyten-Rezeptoren mit großer Diversität exprimiert werden, hängt ihre Aktivierung von Signalen des angeborenen Immunsystems ab. In erster Linie kontrolliert die Expression von B7-Molekülen auf APCs die Induktion der adaptiven Immunantwort. Die zentrale Aufgabe der Lymphozyten besteht in der Identifizierung von mikrobiellen Antigenen aber auch von anomalen, entarteten körpereigenen Zellen. Ein einzelner Lymphozyt erkennt Antigene entweder über seinen T-Zell-Rezeptor oder über seine membranständigen Antikörper und bindet jeweils nur ein bestimmtes, für die Zelle spezifisches Antigen. [MEDZHITOV UND JANEWAY, 1997; PASARE UND MEDZHITOV, 2004; SANDERINK ET AL., 2004; VIAU UND ZOUALI, 2005]

Dendritische Zellen (DCs) sind potente Antigen-präsentierende Zellen (APCs) und spielen eine entscheidende Rolle in der Induktion der spezifischen Immunantwort auf mikrobielle Pathogene. Die Anregung unreifer DCs durch mikrobielle Stimuli induziert

die Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie „Tumor Necrosis Factor“ (TNF) und „Interleukin“ (IL)-12, die eine Differenzierung von T-Zellen in „T-Helfer“ (Th)1-Zellen bewirken können. Zusätzlich führen diese Stimuli zu einer Hochregulation kostimulatorischer Moleküle wie CD40, CD80 und CD86. Dieser Prozess wird DC-Reifung genannt und verstärkt entscheidend die Fähigkeit von DCs, T-Zellen zu aktivieren. DCs migrieren in die lymphoiden Organe, wo die Antigen-Präsentation und die T-Zell-Proliferation stattfinden [PASARE UND MEDZHITOV, 2004]. Diverse Studien zeigten, dass TLR2-Liganden, wie Lipoteichonsäure (LTA) und Lipopeptide [HERTZ ET AL., 2001; MICHELSEN ET AL., 2001], eine „Myeloid Differentiation Factor 88“ (MyD88)-vermittelte [SCHNARE ET AL., 2001; PASARE UND MEDZHITOV, 2004] DC-Reifung hervorrufen. Diese führen zu einer Differenzierung der T-Lymphozyten zu Th1-Zellen [THOMA-USZYNSKI ET AL., 2000; SCHNARE ET AL., 2001; PASARE UND MEDZHITOV, 2004]. TLRs spielen allem Anschein nach eine bedeutende Rolle in diesem Prozess. Es wird angenommen, dass sie die Brücke zwischen mikrobieller Erkennung durch das angeborene Immunsystem zur T-Zell-Proliferation des adaptiven Immunsystems schlagen.

1.2 Parodontitis

1.2.1 Definition

Parodontitis ist eine entzündliche, multikausale Infektionserkrankung aller Anteile des Parodontiums (Gingiva, Desmodont, Wurzelzement, Alveolarknochen). Sie wird durch bakterielle Beläge verursacht und führt zu fortschreitendem Verlust von Stützgewebe. Betroffen sind einzelne, mehrere oder alle Zähne. Dabei können unterschiedliche Stadien der Erkrankung gleichzeitig vorliegen. Schweregrad und Verlauf werden durch anatomische, funktionelle und systemische Faktoren beeinflusst. [PAGE ET AL., 1997; ARMITAGE 1999 UND 2003; FLEMMIG 1999]

1.2.2 Ätiologie

Die Ätiologie der Parodontitis ist nicht lückenlos geklärt. Mit zunehmendem Alter wird Parodontitis vor Karies der Hauptgrund für Zahnverlust [SANDERINK ET AL., 2004]. Parodontitis ist nicht mit einem einzelnen Mikroorganismus sondern vielmehr einer ganzen Reihe von Bakterien assoziiert [MOORE UND MOORE, 1994]. Diese sind an der Initiation und Progression der Parodontitis beteiligt. Parodontitis ist eine multifaktorielle Erkrankung des Zahnhalteapparates, die zu irreversiblen Verlust desmodontaler Fasern und alveolären Knochens führt. Die Ursache liegt in einer durch bakterielle Plaque [LISTGARTEN, 1994] verursachten lokalen, subgingivalen Infektion [DARVEAU ET AL., 1997; KORNMAN ET AL., 1997], die in zwei Schritten erfolgt: Im ersten Schritt kommt es zur Einleitung der Taschenbildung. Die supragingivale Plaque breitet sich über Proliferation an ihrem apikalen Rand nach subgingival aus. Zu diesem Zeitpunkt besteht die Plaque aus Gram-positiven, aeroben, zahnadhärenten, nichtmotilen Stäbchen und Kokken. Der zweite Schritt führt zur Kolonisation der Tasche mit Gram-negativen, fakultativ oder obligat anaeroben, motilen Stäbchen und Spirochäten. Die Stäbchen haften vorwiegend an Gram-positiven Bakterien und bilden so eine lose sekundäre Plaqueschicht. [MOORE UND MOORE, 1994; DARVEAU ET AL., 1997; KORNMAN ET AL., 1997; FLEMMIG, 1999; DIXON ET AL., 2004; NISHIHARA UND KOSEKI, 2004; SANDERINK ET AL., 2004; SOCRANSKY UND HAFFAJEE, 2005]

Verschiedene Formen der Parodontitis können serologisch, mikrobiologisch und anamnestisch-symptomatisch voneinander unterschieden werden. Die Zusammensetzung der Plaque bzw. der bakteriellen Flora kann in ihrer Art, Dichte und Virulenz je nach Parodontitisform variieren. Generell wirken bei der Entstehung aller Parodontitisformen fünf Faktoren zusammen: 1. die Anwesenheit subgingivaler Plaque-Biofilme mit darin enthaltenen parodontalpathogenen Mikroorganismen, 2. die weitgehende Abwesenheit bzw. Unterdrückung von kommensalen Keimen, 3. Einschränkungen bei der Wirtsabwehr, 4. ein für die beteiligten Mikroorganismen geeignetes Mikromilieu im Bereich der parodontalen Tasche und 5. Zeit. Marginale Parodontitiden beginnen als Gingivitis; allerdings entwickelt sich nicht jede Gingivitis zu einer Parodontitis. Es bestehen derzeit keine Möglichkeiten eine Gingivitis

bleibende Gingivitis von einer Gingivitis als Vorstufe der Parodontitis zu unterscheiden. [NISHIHARA UND KOSEKI, 2004; SANDERINK ET AL., 2004]

1.2.3 Pathogenese

Parodontitis ist ein infektiöser Erkrankungsprozess [SOCRANSKY UND HAFFAJEE, 1994]. Bakterien und deren Produkte interagieren mit dem Saumepithel und penetrieren in das darunterliegende Bindegewebe [ABE ET AL., 1991]. Dort bildet sich eine Entzündung aus. In unmittelbarer Nachbarschaft zum Saumepithel befindet sich ein feiner Blutgefäß-Plexus. Leukozyten verlassen die postkapillären Venolen und es kommt zu einem starken Anstieg der neutrophilen Granulozyten, die durch das Saumepithel in den Sulkus bzw. die Tasche migrieren [SCHIÖTT UND LÖE, 1970; DARVEAU ET AL., 1997; DENNISON UND VAN DYKE, 1997]. Kollagen und andere Bestandteile der perivaskulären extrazellulären Matrix werden durch diverse Enzyme mikrobieller und lysosomaler Herkunft zerstört [REYNOLDS UND MEIKLE, 1997]. Wenn sich die supragingivale Plaque nach apikal in den gingivalen Sulkus ausdehnt, werden die koronalen Zellen des Saumepithels zur Proliferation angeregt, wodurch sich eine gingivale Tasche bildet. Im weiteren Verlauf wird die Proliferation der apikalen Zellen des Saumepithels induziert, so dass sie sich nach apikal entlang der Wurzeloberfläche ausdehnen und sich schließlich in ein ulzerierendes Taschenepithel umwandeln [KORNMAN ET AL., 1997]. Das frühe Stadium ist von der Anwesenheit von Lymphozyten geprägt, einschließlich B- und T-Zellen mit charakteristischen Th1- und Th2-Zellen [DENNISON UND VAN DYKE, 1997, ISHIKAWA ET AL., 1997]. Nach und nach wird die Läsion von B-Zellen dominiert, aber auch T-Zellen, Makrophagen und Neutrophile sind präsent, die alle aktiviert werden. B- und T-Zellen werden durch Antigene und Mitogene zur klonalen Replikation angeregt und B-Zellen werden veranlasst, sich zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen zu differenzieren. Bei Fortschreiten der Erkrankung, nimmt die Tiefe der parodontalen Taschen zu. Durch mikrobielle und lysosomale Faktoren werden die Bestandteile der extrazellulären Matrix der Gingiva und des parodontalen Ligaments zerstört und der alveoläre Knochen resorbiert

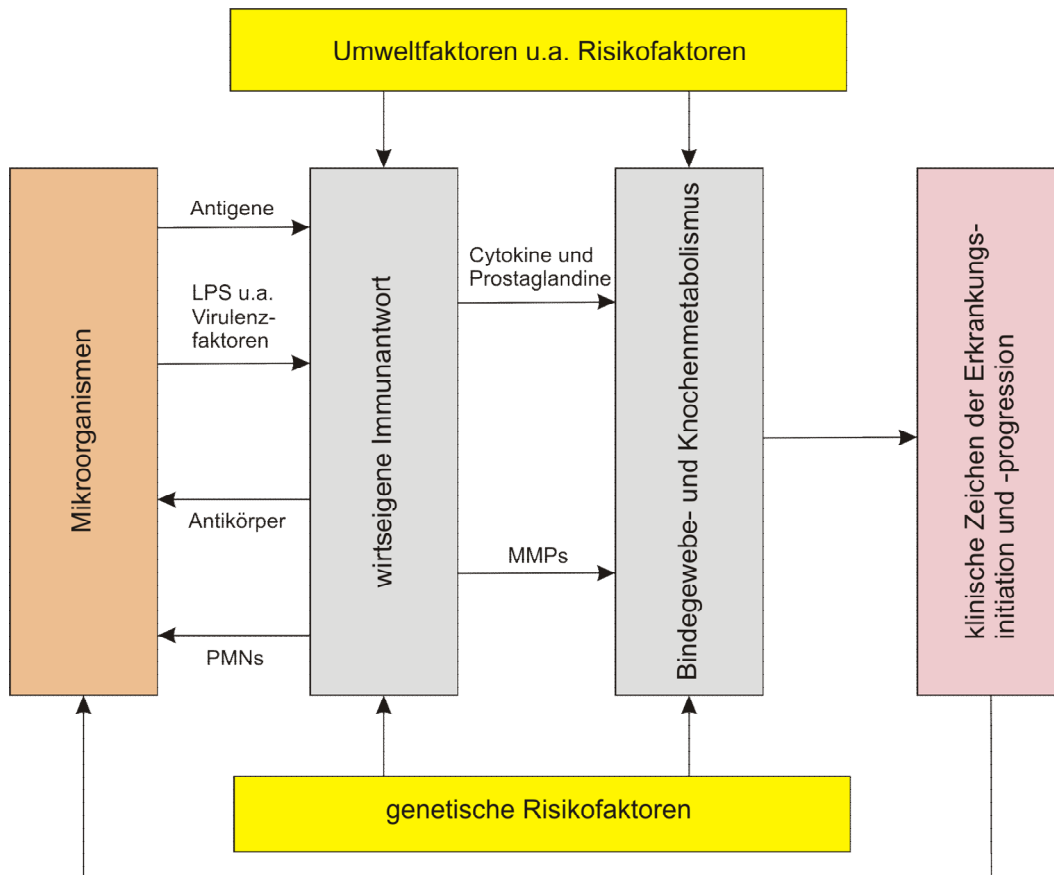


Abbildung 1.1: Pathogenese der Parodontitis. Dargestellt sind die Einfluss- und Risikofaktoren. [nach PAGE UND KORNMAN, 1997] PMNs: Polymorphkernige neutrophile Granulozyten, MMPs: Matrix-Metalloproteinasen

[REYNOLDS UND MEIKLE, 1997; SCHWARTZ ET AL., 1997]. Einen schematischen Überblick über die Parodontitispathogenese gibt Abbildung 1.1. [KORNMAN ET AL., 1997]

1.2.4 Parodontalpathogene Keime

Bestimmten Mikroorganismen (*Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tanarella forsythensis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*) kommt eine Schlüsselrolle in der Ätiologie der Parodontitis zu. Die

Anwesenheit einzelner Keime führt aber nicht zwingend zu einem Voranschreiten der Erkrankung. Keimabwesenheit dagegen ist ein nahezu sicheres Anzeichen für parodontale Gesundheit [RÜDIGER, 2002]. Die Mundhöhle wird von 300 bis 400 verschiedenen Bakterienspezies besiedelt, von denen nur etwa 10 % für die parodontale Destruktion verantwortlich gemacht werden [SANDERINK ET AL., 2004]. „Parodontalpathogen“ bezeichnet die Fähigkeit eines Bakteriums, im Parodont die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen sowie gewebeschädigenden Enzymen (z.B. Kollagenasen) und Mediatoren (z.B. Prostaglandin-E2 (PGE2)) zu veranlassen, entscheidende Mechanismen für die entzündliche Parodontolyse. Auch die Fähigkeit, die Immunabwehr zu umgehen, zeichnet parodontalpathogene Keime aus. Zu den potentiellen parodontalpathogenen Keimen zählen in erster Linie *Porphyromonas gingivalis* und *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, sowie *Tanarella forsythensis*, *Campylobacter rectus* und *Treponema denticola*, des weiteren *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium spp.*, *Capnozytophaga spp.*, *Peptostreptococcus micros*, *Dialister pneumosintes* sowie *Treponema vincentii* und *socranskii* [MOORE UND MOORE, 1994; DARVEAU ET AL., 1997; MOTER ET AL., 1998; NISHIHARA UND KOSEKI, 2004; SANDERINK ET AL., 2004; ELLEN UND GALIMANAS, 2005; HOLT UND EBERSOLE, 2005; SOCRANSKY UND HAFFAJEE, 2005]. Bakterien verursachen Parodontitis indem sie:

- Raum marginal des gingivalen Sulkus und zwischen Zahnoberfläche und Saum- bzw. Taschenepithel beanspruchen und sich darin ausbreiten
- vor und während der Ulzeration des Taschenepithels in das parodontale Weichgewebe eindringen
- Substanzen abgeben, die die periphere Körperabwehr eindämmen oder paralysieren
- Wirtszellen und physiologische Systeme des Wirtes so aktivieren, dass Gewebeerstörung folgt
- Substanzen, wie Endotoxine, abgeben, die direkte oder indirekte Wirkungen via Wirtszellen auf Knochen, Bindegewebe und Epithelzellen ausüben. [NISHIHARA UND KOSEKI, 2004; SANDERINK ET AL., 2004]

1.2.5 Risikofaktoren

Risikofaktoren sind Bedingungen, die bei der Untersuchung der Pathogenese bestimmter Erkrankungen in Bevölkerungsstudien als krankheitsfördernde Umstände statistisch gesichert wurden.

Als Risikofaktoren für chronische und auch aggressive Parodontitis gelten Systemerkrankungen wie Diabetes mellitus, HIV-Infektion oder Osteoporose sowie emotionaler Stress und Rauchen. Aber auch keimspezifische Merkmale, abgelaufene Parodontitisprogression, sozioökonomische Faktoren (z.B. Bildungsstand) und lokale zahnspezifische Faktoren, insbesondere auch iatrogener Art (z.B. Kronenränder), spielen eine entscheidende Rolle. [SALVI ET AL., 1997; LINDHE ET AL., 1999; LANG ET AL., 1999; KINANE, 1999].

Bei den beeinflussbaren Parodontitisrisikofaktoren stehen der Tabakkonsum und die persönliche Mundhygiene gleichberechtigt an erster Stelle. In den letzten zehn bis 15 Jahren konnte der Tabakkonsum als der wichtigste Risikofaktor für destruktive Parodontalerkrankungen identifiziert werden. Realistisch ist heute bei Rauchern von einem 2,5- bis 6-fach erhöhtem Risiko für Parodontitis auszugehen, wobei dosis- und zeitabhängig möglicherweise weit höhere relative Risiken zu kalkulieren sind. [MÜLLER, 2002]

Diverse Studien zeigten, dass bei Patienten mit TypI- wie auch TypII-Diabetes mellitus im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten neben einer erhöhten Prävalenz auch ein größerer klinischer Attachment- und Knochenverlust zu verzeichnen war. Dies traf vor allem auf das fortgeschrittene Stadium des TypI-Diabetes bei Patienten zu, die länger als 10 Jahre an Diabetes erkrankt waren. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist neben dem zeitlichen Bestehen eines Diabetes auch dessen Kontrolle. Bei ähnlichen Plaquewerten wiesen Patienten mit einem schlecht eingestellten Diabetes signifikant mehr Attachment- und Knochenverlust auf als Patienten mit einem gut eingestellten Diabetes. Patienten mit schlecht kontrolliertem TypII-Diabetes und vor allem junge Patienten der Altersgruppe 15 bis 24 waren schwerer parodontal erkrankt als gut kontrollierte Diabetiker respektive Nichtdiabetiker. [SCULEAN UND JEPSEN, 2002]

Die Zusammenhänge zwischen Osteoporose und Parodontitis sind ein aktueller Bereich parodontologischer Forschung. Es ist gegenwärtig noch nicht eindeutig geklärt, ob die Osteoporose einen Risikofaktor für die Parodontitis oder nur für den alveolären Knochenverlust darstellt. [JEPSEN UND GLÜER, 2002]

1.2.6 Klassifikation

Im Jahre 1999 wurde vom „1st European Workshop in Periodontology“ der American Academy of Periodontology eine neue Klassifikation erarbeitet (siehe Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Klassifikation der Parodontalerkrankungen [ARMITAGE, 1999]

1. Gingivale Erkrankungen
 2. Chronische Parodontitis
 3. Aggressive Parodontitis
 4. Parodontitis als Manifestation einer Systemerkrankung
 5. Nekrotisierende Parodontalerkrankungen
 6. Abszesse des Parodonts
 7. Parodontitis im Zusammenhang mit endodontalen Läsionen
 8. Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformationen und Zustände
-

Anliegen der neuen Klassifikation der Parodontalerkrankungen war es, die aktuellen Erkenntnisse sowohl der Pathogeneseforschung als auch der Risikoanalytik sowie das gesamte Spektrum pathologischer Veränderungen zu erfassen [ARMITAGE, 1999]. Es wurde entschieden, die Begriffe „chronische Parodontitis“ und „aggressive Parodontitis“ einzuführen und die zuvor gebräuchlichen Begriffe „adult“ bzw. „early onset“ Parodontitis zu verwerfen. Chronische Parodontitis wird als eine infektiöse Erkrankung definiert, die zu langsamem oder moderatem progressiven Verlust von Attachment und Knochen führt. Aggressive Parodontitis wird als ein spezifischer Typ der Parodontitis mit klar identifizierbaren klinischen und laboratorischen Parametern

angesehen. Diese machen den Unterschied zu chronischer Parodontitis aus [LANG ET AL., 1999]. MOMBELLI ET AL. [2002] zeigten, dass die An- oder Abwesenheit der parodontalpathogenen Keime *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tanarella forsythensis* und *Campylobacter rectus* nicht zur Differenzierung herangezogen werden kann. Anhand von Keimspektren lassen sich Patienten mit aggressiver Parodontitis nicht von solchen mit chronischer Parodontitis abgegrenzt [MOMBELLI ET AL., 2002].

1.2.6.1 Chronische Parodontitis

Die Chronische Parodontitis (CP) ist eine Infektionserkrankung, die zu Entzündung des Zahnhalteapparates sowie zu progressivem Attachment- und Knochenverlust führt. Gekennzeichnet ist sie durch Zahnfleischtaschen und/oder Gingivarezessionen und stellt die am meisten vorkommende Parodontitisform dar. Die chronische Parodontitis kann in jedem Lebensalter entstehen, tritt allerdings am häufigsten im Erwachsenenalter auf. Mit dem Alter nehmen Prävalenz und Schwere zu. Während die bakterielle Plaque als ätiologischer Faktor fungiert, ist die Pathogenese (und damit die Progression) durch die Wirtsreaktivität determiniert. Die Erkrankungsprogression stellt man durch wiederholte klinische Diagnostik fest. Die chronische Parodontitis kann nach Ausmaß und Schwere in lokalisierte und generalisierte Formen unterteilt werden, wobei die lokalisierte Form weniger als 30 % befallene Zahnflächen aufweist, die generalisierte mehr als 30 %. [LINDHE ET AL., 1999]

1.2.6.2 Aggressive Parodontitis

Die Aggressive Parodontitis (AP) stellt eine Krankheitsform mit überwiegend klar erkennbaren klinischen Merkmalen und speziellen Befunden hinsichtlich der Wirt-Bakterien-Interaktion dar. Hauptmerkmale sind ein klinisch gesunder Patient, rasch fortschreitende Gewebedestruktion und auffällige familiäre Häufung. Weitere nicht

durchgängig zu beobachtende Merkmale sind Missverhältnis zwischen der Menge an Plaque und dem Ausmaß der Gewebedestruktion, erhöhte Zahlen von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, in gewissen Populationen von *Porphyromonas gingivalis*, abnorme Phagozytenzahlen, hyperresponsiver Makrophagen-Phänotyp mit erhöhter Produktion von PGE₂ und IL-1 β sowie selbstlimitierende Gewebedestruktion.

Auch bei der aggressiven Parodontitis unterscheidet man lokalisierte und generalisierte Formen. Dabei zeichnet sich die lokalisierte Form durch Beginn in der Pubertät, Befall der ersten Molaren und Schneidezähne und zum Teil markante Serumantikörpertiter gegen nachgewiesene bakterielle Agenzien aus. Die generalisierte aggressive Form ist charakterisiert durch Patienten, die meist jünger als 30 Jahre sind, generalisierten approximalen Befall mit Attachmentverlust an mindestens drei Zähnen außer den ersten Molaren und Schneidezähnen, schwache Serumantikörpertiter gegen nachgewiesene bakterielle Agenzien und deutlichen episodenhaften Verlauf. [LANG ET AL., 1999]

1.3 Toll-like Rezeptoren

1.3.1 *Drosophila* Toll und die Entdeckung der Toll-like Rezeptoren

Die erste Erwähnung von Toll geht auf das Jahr 1984 zurück. Damals wurde das verantwortliche Gen für die dorso-ventrale Ausrichtung der *Drosophila melanogaster*-Embryonen gefunden [ANDERSON UND NÜSSLEIN-VOLHARD, 1984]. Dies veranlasste NÜSSLEIN-VOLHARD zu einem spontanen „Toll!“-Ruf, womit der Name für dieses Gen geboren war [ANDERSON, 2000]. Der Toll-Signalweg ist neben der dorso-ventralen Achse der *Drosophila*-Embryonen auch für die Antwort auf mikrobielle Infektionen verantwortlich. Später konnten die Abwehrmechanismen von *Drosophila* noch weiter differenziert werden. So spielt Toll auch eine entscheidende Rolle in der Abwehr fungaler Pathogene, was durch Mutanten belegt wurde, die eine erhöhte Empfänglichkeit für fungale Infektionen zeigten [LEMAITRE, 2004]. Neben dem Toll-Signalweg verfügt *Drosophila melanogaster* noch über den „Immune Deficiency“

(IMD)-Weg. Sowohl Toll als auch IMD beeinflussen via „Nuclear Factor- κ B“ (NF- κ B) die Expression antimikrobieller Peptid-Gene. Kontrolliert Toll in erster Linie Gram-positive Bakterien und fungale Pathogene mittels Drosomycin, so ist IMD mit Diphtericin für die Antwort auf Gram-negative Bakterien verantwortlich [KANEKO UND SILVERMAN, 2005]. Im Jahre 1997 konnte ein humanes Homolog (Toll-like) des *Drosophila* Toll-Proteins nachgewiesen werden [MEDZHITOV ET AL., 1997]. Es stellte sich später heraus, dass der erste identifizierte Toll-like Rezeptor TLR4 war.

Das Protein *Drosophila* Toll wurde zunächst als ein Typ I Transmembranrezeptor beschrieben. Der Signaltransduktionsweg von *Drosophila* Toll zeigt bemerkenswerte Ähnlichkeit zum IL-1 Signaltransduktionsweg der Säugetiere, der zur Aktivierung von NF- κ B führt. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der für viele Aspekte der inflammatorischen und immunologischen Antwort verantwortlich ist. Tatsächlich zeigen die zytoplasmatischen Domänen von *Drosophila* Toll und dem IL-1 Rezeptor von Säugetieren eine hohe Homologie und werden deshalb als Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) bezeichnet. Basierend auf dieser Ähnlichkeit wurde angenommen, dass der Toll-vermittelte Signalweg bei Säugetieren eine Rolle in der Regulation der angeborenen Immunantwort spielt. [MEDZHITOV ET AL., 1997]

1.3.2 Die Familie der Toll-like Rezeptoren

Bis heute wurden zwölf Mitglieder der humanen TLR-Familie identifiziert. Sie sind strukturell durch die Anwesenheit einer „Leucin-reichen Region“ (LRR) in der extrazellulären Domäne und einer zytoplasmatischen Toll/IL-1 Rezeptor (TIR)-Domäne charakterisiert. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen humaner TLRs zeigte, dass zehn der Mitglieder der TLR-Familie in fünf Unterfamilien aufgeteilt werden können: die TLR2-, TLR3-, TLR4-, TLR5- und TLR9-Subfamilien (siehe Abbildung 1.2) [TAKEDA ET AL., 2003]. Die TLR2-Subfamilie besteht aus TLR1, TLR2, TLR6 sowie TLR10, wobei TLR1 und TLR6 die größte Ähnlichkeit aufweisen. Die Zuordnung zur TLR2-Subfamilie wird durch die Funktion von TLR1 und TLR6 als Korezeptoren von TLR2 unterstrichen. Die TLR2-, TLR4- und TLR5-Subfamilien

stellen extrazelluläre Rezeptoren dar. Die TLR3- und TLR9-Unterfamilien sind im Endosom angesiedelt und somit intrazelluläre Rezeptoren [KAWAI UND AKIRA, 2005].

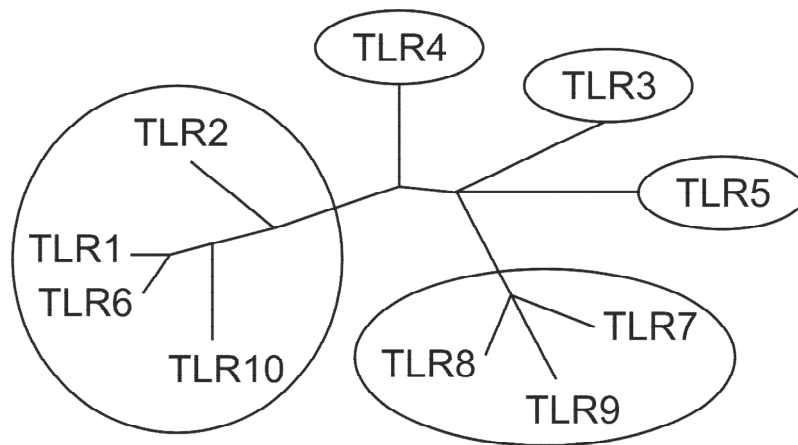


Abbildung 1.2: TLR-Subfamilien. Die TLR-Familienmitglieder wurden in Abhängigkeit von ihrer Aminosäuresequenz in Unterfamilien aufgeteilt [nach TAKEDA ET AL., 2003].

1.3.2.1 Lokalisation und Expression

Die TLR-Gene sind über das gesamte Genom verteilt. Diejenigen, die für TLR1 und TLR6 kodieren, sind auf dem humanen Chromosom 4q14 lokalisiert, TLR2 und TLR3 auf 4q31.1-q35, TLR4 auf 9q32-q33, TLR5 auf 1q33.3-q42, TLR7 und TLR8 auf Xp22 und TLR9 auf 3q21.3 [AKIRA ET AL., 2001].

TLRs werden auf verschiedenen Zelltypen des Immunsystems exprimiert [ZAREMBER ET AL., 2002], hauptsächlich aber auf Zellen des mononukleären Phagozytensystems. In Abhängigkeit von ihrem Expressionsmuster können die TLRs als ubiquitär (TLR1), begrenzt (TLR2, TLR4, TLR5) und spezifisch (TLR3) klassifiziert werden [MUZIO ET AL., 2000]. TLR2 wird in erster Linie von myeloischen Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten exprimiert [FLO ET AL., 2001; KADOWAKI ET AL., 2001; SABROE ET AL., 2002]. Neben den Zellen der angeborenen Immunantwort weisen auch B-Zellen TLR2 auf, was eine Beteiligung der TLRs an der adaptiven Immunantwort wahrscheinlich macht [FLO ET AL., 2001]. Die Expression

einzelner TLRs ist allerdings nicht nur auf Immunzellen beschränkt: Humaner TLR2 wird beispielsweise auch auf Fibroblasten [TABETA ET AL., 2000] und gingivalen Epithelzellen [ASAI ET AL., 2001] exprimiert. Des Weiteren ist TLR2 auch im Parodont zu finden [DIXON ET AL., 2004].

1.3.2.2 Liganden

Die Familie der Toll-like Rezeptoren als Bestandteil der „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs), nimmt „Pathogen Associated Molecular Patterns“ (PAMPs) der verschiedensten Pathogene wahr. Dazu zählen Bakterien, Pilze, Protozoen aber auch Viren. Es ist eine gewisse Spezialisierung der einzelnen TLRs wahrzunehmen. Eine Übersicht zu den Liganden der Toll-like Rezeptoren gibt Tabelle 1.2 [MEANS ET AL., 2000 UND 2001; TAKEDA UND AKIRA, 2003; TAKEDA ET AL., 2003; WETZLER, 2003].

TLR2 wurde zunächst als Lipopolysaccharid (LPS)-Rezeptor angesehen [YANG ET AL., 1998; KIRSCHNING ET AL., 1998] (TLR2-Liganden siehe unten). Später konnte aber nachgewiesen werden, dass dieser Effekt auf einer Verunreinigung des verwendeten LPS mit Lipopeptiden und Lipoproteinen beruhte [HIRSCHFELD ET AL., 2000; LEE ET AL., 2002]. Der eigentliche LPS-Rezeptor ist TLR4. Allerdings gibt es atypisches LPS, das durchaus zu einer TLR2-vermittelten Signaltransduktion führt. Dazu gehört LPS von Legionellen, *Bordetella* [GIRARD ET AL., 2003], *Leptospira* [WERTS ET AL., 2001] und nicht zuletzt *Porphyromonas gingivalis* [HIRSCHFELD ET AL., 2001], einem der wichtigsten Parodontalpathogene.

Die TLR2-vermittelte Immunantwort ist allem Anschein nach von Korezeptoren abhängig. TLR1 und TLR6 konnten als solche identifiziert werden [OZINSKY ET AL., 2000]. Die TLR2-Signaltransduktion erfordert also nicht die Bildung von TLR2-Homodimeren, sondern Heterodimere aus TLR2 mit TLR1 oder TLR6. Das TLR1/TLR2-Heterodimer erkennt eine große Anzahl bakterieller Lipoproteine, einschließlich des 19kDa mycobakteriellen Lipoproteins [TAKEUCHI ET AL., 2002; ALEXOPOULOU ET AL., 2002], Meningokokken-Lipoproteine [OZINSKY ET AL., 2000] und die synthetische Lipoproteinstruktur Pam₃CysK4 [TAKEUCHI ET AL., 2001]. Das

Tabelle 1.2: Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden

TLR-Familie	Liganden	Herkunft
TLR1	Triacylierte Lipoproteine: MALP-2 Pam3CysK4	Bakterien, Mycobakterien synthetisch
TLR2	Lipoprotein/Lipopeptide, LTA LAM Phenollösliches Modulin GPI-Anker Glycolipide MALP-2 Porine Zymosan Atypisches LPS CMV-Virionen HSV-1	div. Bakterien, v.a. Gram- positive Mycobakterien, Meningokokken <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> Mycoplasma Neisserien <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Legionellen, <i>Bordetella</i> , <i>Leptospira interrogans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> Viren
TLR3	Doppelsträngige RNA	Viren
TLR4	LPS Taxol HSP60 HSP60 HSP70	Gram-negative Bakterien Pflanzen <i>Chlamydia pneumoniae</i> Wirt
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR6	Diacylierte Lipoproteine: MALP-2 Phenollösliches Modulin PGN	Mycoplasma
TLR7	einzelsträngige RNA (in der Maus) Imidazoquinoline	 synthetische Komponenten
TLR8	einzelsträngige RNA (im Menschen) Imidazoquinoline	 synthetische Komponenten
TLR9	CpG DNA	Bakterien
TLR10	?	

TLR6/TLR2-Heterodimer hingegen erkennt „Mycoplasma Activating Lipoprotein“ (MALP)-2 [OZINSKY ET AL., 2000; TAKEUCHI ET AL., 2001; SCHRÖDER ET AL., 2004] sowie phenollösliches Modulin [HAJJAR ET AL., 2001; BULUT ET AL., 2001] und wahrscheinlich Peptidoglycan (PGN) [IMLER UND HOFFMAN, 2001]. Entscheidender Unterschied zwischen dem TLR1/TLR2-Heterodimer und dem TLR6/TLR2-Heterodimer liegt in dem Ausmaß der Acylierung der Lipoproteine. Der Großteil der Lipoproteine und Pam₃CysK₄ sind triacyliert, während MALP-2 und PGN diacyliert sind. Somit ist TLR1/TLR2 auf triacylierte und TLR6/TLR2 für diacylierte Lipoproteine spezialisiert, was in Studien mit Knockout-Mäusen bestätigt wurde [AKIRA 2000].

Zu den beschriebenen TLR2-Liganden zählen Zellwandbestandteile wie Lipoproteine und Lipopeptide [BRIGHTBILL ET AL., 1999] unter anderem auch von *Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum* [LIEN ET AL., 1999] und *Shigella spp.* [ALIPRANTIS ET AL., 2001]; des weiteren PGN und Lipoteichonsäure (LTA) Gram-positiver Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis* und *Staphylococcus epidermidis* [SCHWANDNER ET AL., 1999; YOSHIMURA ET AL., 1999; HATAKEYAMA ET AL., 2003], sowie mycobakterielles Lipoarabinomannan (LAM) [MEANS ET AL., 1999]. Auch Glycolipide und LTA von Treponemen [OPITZ ET AL., 2001], das R-Stereoisomer des mycoplastischen Lipopeptids (MALP)-2 [TAKEUCHI ET AL., 2000] und Porine von Neisserien [MASSARI ET AL., 2002] führen zu einer TLR2-vermittelten Signaltransduktion. Auch Protozoen weisen einen TLR2-Liganden in Form der Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankerregion äußerer Membran-Antigene von *Trypanosoma cruzi* auf [CAMPOS ET AL., 2001; ROPERT ET AL., 2002].

CD14 bindet eine Reihe verschiedener Liganden und kann diese effizient zum entsprechenden Rezeptor transferieren. Im Falle von TLR2 verstärkt die Anwesenheit von CD14 die Fähigkeit von TLR2 spezifische Liganden zu erkennen. Dazu gehören Lipoproteine von *Borrelia burgdorferi* [HIRSCHFELD ET AL., 1999], trypanosomale GPI-Anker [CAMPOS ET AL., 2001], Meningokokken-Lipoproteine [INGALLS ET AL., 2001], Mannuronsäurepolymere [FLO ET AL., 2002], mycobakterielles LAM [MEANS ET AL., 1999], PGN UND LTA [SCHWANDNER ET AL., 1999], Gram-positive Zellwandbestandteile von Staphylokokken und Streptokokken [YOSHIMURA ET AL., 1999], Spirochäten-Lipoprotein [LIEN ET AL., 1999] und Leptospira-LPS [WERTS ET AL., 2001]. Eine neuere

Studie zeigt, dass CD14 triacylierte Lipopeptide direkt bindet und die Erkennung von Lipopeptiden durch den TLR2/TLR1-Rezeptorkomplex erleichtert ohne an den Rezeptorkomplex zu binden [NAKATA ET AL., 2006]. Auch für CD36 wurde kürzlich eine Rolle als Korezeptor der TLR2/TLR6-vermittelten Reaktion auf diacylierte Lipopeptide nachgewiesen [HOEBE ET AL., 2005].

Cytomegalievirus (CMV)-Virionen [COMPTON ET AL., 2003] und Herpes simplex Virus (HSV)-1 [KURT-JONES ET AL., 2004; MORRISON, 2004] sind die von TLR2 erkannten Viren. Eine Zeit lang wurden zudem endogene Liganden wie die Hitzeschockproteine HSP60 und HSP70 diskutiert [VABULAS ET AL., 2001 UND 2002; ASEA ET AL., 2002]. Diese Ergebnisse könnten allerdings möglicherweise auf kontaminierte Reagenzien zurückzuführen sein [TSAO UND GAO, 2004].

1.3.2.3 Signaltransduktion

Die Aktivierung der Signaltransduktion durch TLRs führt zur Induktion diverser Gene, die an der Wirtsabwehr beteiligt sind. Dazu zählen inflammatorische Zytokine, Chemokine, „Major Histocompatibility Complex“ (MHC) und kostimulatorische Moleküle [KAWAI ET AL., 1999; TAKEUCHI UND AKIRA, 2001; AKIRA UND TAKEDA, 2004; KAWAI UND AKIRA, 2005]. Zusätzlich werden eine Reihe von Effektormolekülen induziert, wie NO-Synthase und antimikrobielle Peptide, die mikrobielle Pathogene direkt zerstören können.

Nach TLR/Liganden-Interaktion kommt es im Rahmen der intrazellulären Signaltransduktion zur Aktivierung von NF- κ B. Dies reguliert die Genexpression bei einer Vielzahl von Genen, die bei der Immunabwehr, Entzündungen und apoptotischen Prozessen beteiligt sind und bewirkt die Sekretion oder Expression einer Reihe von Effektormolekülen [SANDERINK ET AL., 2004]:

- Antimikrobielle Stoffe bzw. mikrobizide Substanzen: endogene antimikrobielle Peptide und weitere Inhaltstoffe der PMN-Granula, reaktive Sauerstoffmetaboliten und reaktive Stickstoffmetaboliten,

- Zytokine, Chemokine, Akute-Phase-Proteine und Adhäsionsproteine,
- die beiden CD28-Liganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86). Diese Bindungen fungieren als kostimulierendes Signal bei der T-Zell-Aktivierung.

Die Signalwege der TLR-Familie weisen große Ähnlichkeiten zu denen der IL-1R-Familie auf. Man unterscheidet im Wesentlichen zwei Wege: den „Myeloid Differentiation Factor“ (MyD88)-abhängigen und den MyD88-unabhängigen Weg. Alle Rezeptoren außer TLR3 teilen den MyD88-abhängigen Weg, der NF- κ B aktiviert und Gene induziert, die inflammatorische Zytokine kodieren [KAWAI ET AL., 1999; AKIRA UND TAKEDA, 2004; KAWAI UND AKIRA, 2005]. Der MyD88-unabhängige Signaltransduktionsweg wird nur von TLR3 und TLR4 besprochen [TAKEUCHI UND AKIRA, 2001]. Für TLR2 sind noch zwei weitere Signalwege beschrieben. Zum einen kontrollieren „Phosphatidylinositol 3-Kinase“ (PI3K) und die GTPase Rac1 die Aktivierung von NF- κ B unabhängig von „Inhibitor of κ B“ (I- κ B) [ARBIBE ET AL., 2000], zum anderen wird durch Stimulation von TLR2 MyD88-abhängig sowohl NF- κ B aktiviert als auch Apoptose induziert, was über „Fas-Associated Death Domain Protein“ (FADD) und Caspase 8 verläuft [ALIPRANTIS ET AL., 2000].

1.3.2.3.1 MyD88-abhängige Signaltransduktion

MyD88 enthält zwei Domänen, die mit Proteinen interagieren können: eine „death“-Domäne am Amino-Ende und eine TIR-Domäne am Carboxy-Ende. Die TIR-Domäne von MyD88 ist mit der TIR-Domäne von TLR und IL-1R assoziiert. Kommt es zu einer Stimulation, rekrutiert MyD88 eine „death“-Domäne enthaltende Serin/Threonin-Kinase: „IL-1R-Associated Kinase“ (IRAK). Vier Mitglieder der IRAK-Familie wurden identifiziert: IRAK1, IRAK2, IRAK-M und IRAK4. IRAK1 und IRAK4 sind aktive Kinasen, während IRAK-M und IRAK2 nicht aktiv sind. Durch TLR-Stimulation assoziiert IRAK4 mit IRAK1. IRAK1 wird durch Phosphorylierung aktiviert und assoziiert dann mit „TNF Receptor-Associated Factor 6“ (TRAF6), was zur Aktivierung des „I- κ B Kinase“ (IKK)-Komplexes führt. Der IKK-Komplex enthält zwei katalytische

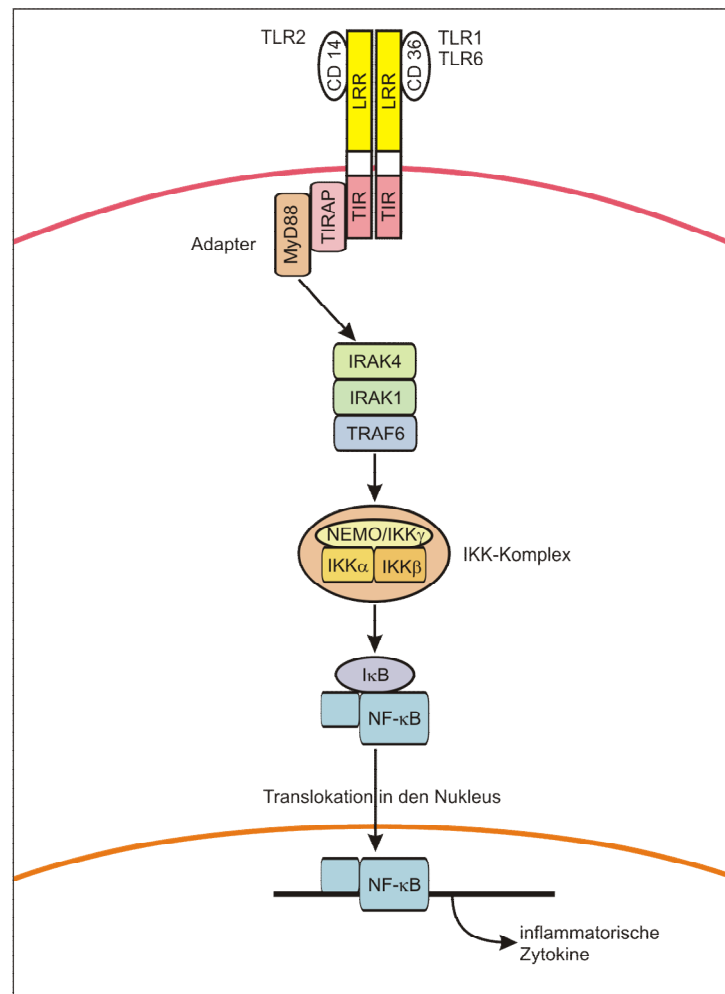


Abbildung 1.3: TLR2-Signaltransduktion. Das TLR2-Heterodimer setzt sich aus TLR2 und TLR1 respektive TLR6 zusammen. Als Korezeptoren fungieren CD14 und CD36. Die transmembranen TLRs weisen eine extrazelluläre Leucin-reiche Region (LRR) und eine intrazelluläre Toll/IL-1-Rezeptor (TIR)-Domäne auf. An die TIR-Domäne lagern sich TIRAP und MyD88 an. Durch TLR-Stimulation rekrutiert MyD88 IRAK. IRAK4 assoziiert mit IRAK1. IRAK1 wird durch Phosphorylierung aktiviert und assoziiert mit TRAF6. Dadurch wird der IKK-Komplex aktiviert. Durch Phosphorylierung wird I-κB degradiert. Es kommt zur Translokation von NF-κB in den Nukleus. Dort wird die Expression von inflammatorischen Zytokinen induziert.

Untereinheiten, IKK α und IKK β , sowie das Protein „NF- κ B Essential Modulator“ (NEMO)/IKK γ . Er induziert die Phosphorylierung von I- κ B. Die Degradation von I- κ B nach der Phosphorylierung führt zur Translokation von NF- κ B in den Nukleus, wo die Expression von proinflammatorischen Zytokin-Genen induziert wird. „TIR-Activating Protein“ (TIRAP), ein weiteres TIR-Domäne-enhaltendes Protein, ist in dem MyD88-abhängigen Signaltransduktionsweg von TLR2 und TLR4 involviert. Einen Überblick gibt Abbildung 1.3. [KAWAI ET AL., 1999; TAKEUCHI UND AKIRA, 2001; AKIRA UND TAKEDA, 2004; YAMAMOTO ET AL., 2004; BEUTLER, 2005; KAWAI UND AKIRA, 2005]

1.3.2.3.2 MyD88-unabhängige Signaltransduktion

TLR4 verfügt zusätzlich und TLR3 ausschließlich über einen MyD88-unabhängigen Signaltransduktionsweg. Im TLR3- und TLR4-vermittelten Signalweg erfolgt die Aktivierung von IRF3 und die Induktion von IFN- γ MyD88-unabhängig. Ein dritter Adapter, der eine TIR-Domäne enthält, TRIF, spielt hier eine essentielle Rolle. TRIF benützt RIP1 und TRAF6 um NF- κ B zu aktivieren. Untypische IKKs, IKKi/IKK ϵ und TBK1, vermitteln die Aktivierung von IRF3. TRAM, ein vierter TIR-Domäne-enhaltender Adapter, ist spezifisch für den TLR4-vermittelten MyD88-unabhängigen (TRIF-abhängigen) Weg. [KAWAI ET AL., 1999; TAKEUCHI UND AKIRA, 2001; AKIRA UND TAKEDA, 2004; YAMAMOTO ET AL., 2004; BEUTLER, 2005; KAWAI UND AKIRA, 2005]

1.3.3 Mutationen des TLR2-Gens

Ein „Single Nucleotide Polymorphism“ (SNP) ist eine Variation in der Identität eines einzelnen Nukleotids an einer bestimmten Stelle des Genoms. Ein SNP definiert zwei Allele, für die drei verschiedene Genotypen in einer Population vorkommen können. SNPs beinhalten unter anderem Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP). Damit sind Nukleotid-Substitutionen gemeint, die die Schnittstellen für Restriktions-Endonuklease im DNA-Molekül zerstören. Man nimmt an, dass

interindividuelle Genomvariationen in erster Linie auf SNPs zurückzuführen sind [TAYLOR ET AL., 2004]. TLR2 besteht aus einer DNA-Sequenz von 2352 Basen, die 784 Aminosäuren kodieren [ROCK ET. AL., 1998]. Die extrazelluläre Leucin-reiche (LRR-) Domäne besteht aus den Aminosäuren 1-588, die Transmembran-Domäne beinhaltet die Aminosäuren 589-609 und die zytoplasmatische Toll/IL-1 (TIR)-Domäne wird durch die Aminosäuren 610-784 charakterisiert. Für das TLR2-Gen wurden bis zum jetzigen Zeitpunkt 89 SNPs beschrieben, wobei bisher aber sehr wenig Information bezüglich der biologischen Konsequenzen vorliegt. 26 dieser SNPs sind am 5´Ende, 17 am 3´Ende, und 29 im Intron des Gens lokalisiert. 17 modifizieren die Basen des dritten Exons des TLR2-Gens [TEXEREAU ET. AL., 2005]. Der Arg753Gln-Polymorphismus befindet sich in der intrazellulären Region des Rezeptors. An dieser Stelle des TLR2-Gens, Position 753, kommt es zu einer Substitution von Arginin durch Glutamin [LORENZ ET AL., 2000]. Durch die gestörte Rezeptorfunktion wird die intrazelluläre Signaltransduktion verhindert, was zu einer veränderten Wirtsabwehr führt. Es konnte eine Assoziation mit verschiedenen Krankheiten festgestellt werden. Bei Lyme-Borreliose scheint sich dieser SNP schützend auf den Wirt auszuwirken, indem Spätformen dieser Erkrankung verhindert werden [SCHRÖDER ET AL., 2005]. Bei Tuberkulose hingegen scheint er einen Risikofaktor für den Wirt darzustellen [OGUS ET AL., 2004]. Die Erstbeschreibung des Arg677Trp-Polymorphismus geht auf KANG UND CHAE [2001] zurück. Dieser SNP ist ebenfalls in der intrazellulären TIR-Domäne angesiedelt. Arginin wurde durch Tryptophan ersetzt. Dieser Polymorphismus führte zu veränderten intrazellulärer Signalen nach mycobakterieller Reizung und wurde mit lepromatöser Lepra assoziiert [KANG UND CHAE, 2001]. Neuere Studien haben aber gezeigt, dass die Ergebnisse zu diesem SNP möglicherweise Artefakte sind, die durch die Existenz eines Pseudogens hervorgerufen wurden [MALHORTA ET AL., 2005]. Die Genotypisierung nach direkter PCR-Sequenzierung ergab, dass der Arg677Trp-Polymorphismus, der in einer koreanischen Population mit lepromatöser Lepra assoziiert ist, kein tatsächlicher TLR2-Polymorphismus ist. Es handelt sich dabei um eine Variation in einer zu 93% homologen duplizierten Region, die sich im TLR2-Exon 3 etwa 23 kb aufwärts befindet. [MALHORTA ET AL., 2005]. Die genannten Polymorphismen sind in Abbildung 1.4 systematisch dargestellt.

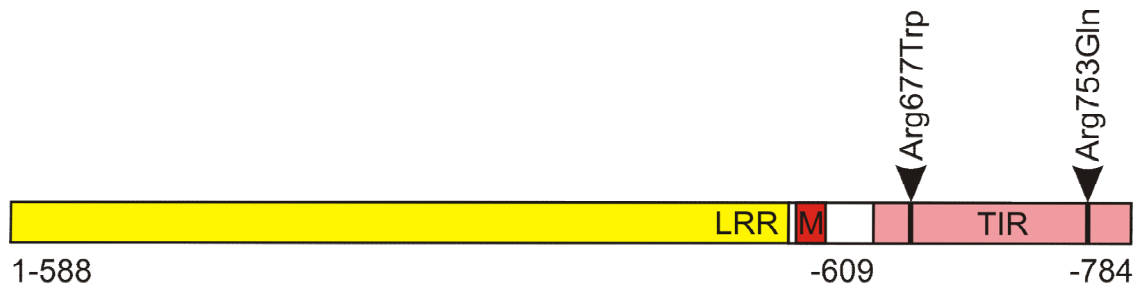


Abbildung 1.4: Polymorphismen des TLR2-Gens. LRR: Leucin-reicher extrazellulärer Rezeptoranteil (Aminosäuren 1-588), Transmembranregion (Aminosäuren 589-609), M: Membran-durchziehende Region, TIR: intrazelluläre Toll/IL-1 Rezeptor-Domäne (Aminosäuren 610-784). [nach SCHRÖDER UND SCHUMANN, 2005]

1.4 TLR2 und Parodontitis

Humane gingivale Fibroblasten [TABETA ET AL., 2000], die Zellen entzündeter Gingiva [MORI ET AL., 2003], parodontale Ligamentfibroblasten [HATAKEYAMA ET AL., 2003] und Zementoblasten [NOCITI ET AL., 2004] zeigten eindeutige TLR2-mRNA-Expression. Auf der Zelloberfläche in entzündetem oralem Epithel wurde deutlich mehr TLR2 nachgewiesen als in gesundem Gewebe [SUGAWARA ET AL., 2006].

Im Gegensatz zum Großteil Gram-negativer LPS, die durch TLR4 erkannt wird, führt *Porphyromonas gingivalis*-LPS in humanen und murinen Makrophagen zur Aktivierung von TLR2 [HIRSCHFELD ET AL., 2001; MARTIN ET AL., 2001] und unterdrückt die Aktivität anderer TLR-Agonisten [YOSHIMURA ET AL., 2002; COATS ET AL., 2003]. *Porphyromonas gingivalis* ist neben *Actinobacillus actinomycetemcomitans* der wichtigste Vertreter der parodontalpathogenen Keime. Zudem nimmt er unter den Gram-negativen Bakterien eine gesonderte Rolle ein: Im Vergleich zu anderen Gram-negativen Bakterien weist er atypisches LPS und Variationen in den Fimbrien auf. Dieses atypische LPS und auch die bakteriellen Fimbrien und deren Peptide erfordern eine TLR2-vermittelte Signaltransduktion, was MyD88- und NF- κ B-abhängig die Produktion proinflammatorischer Zytokine induziert [ASAI ET AL., 2001; BAINBRIDGE ET AL., 2002;

OGAWA ET AL., 2002; HASHIMOTO ET AL., 2004; ASAI ET AL., 2005]. In diversen Studien wurde nachgewiesen, dass *Porphyromonas gingivalis* nicht nur eine spezielle Variante von LPS und Lipid A [OGAWA ET AL., 1993; KUMADA ET AL., 1995] aufweist, sondern auch eine besondere Art von Fimbrien [AMANO ET AL., 2004]. Dies könnte durch unterschiedliche Interaktionen mit der Wirtsabwehr noch zu seiner Pathogenität beitragen, schließt aber auch die Beteiligung anderer TLRs, wie TLR4 nicht aus [BAINBRIDGE ET AL., 2002; DARVEAU ET AL., 2004; ZHOU ET AL., 2005]. Zellaktivierung durch LPS oder Fimbrien von *Porphyromonas gingivalis* erfordert eine Lipidfloß-Funktion und die Formation heterotropher Rezeptorkomplexe (TLR1-2/CD14/CD11b/CD18), wobei Wildtyp-Fimbrien zusätzlich TLR6 rekrutieren [HAJISHENGALLIS ET AL., 2006]. *Porphyromonas gingivalis*-Fimbrien aktivieren einen neuartigen proadhäsiven Weg in humanen Monozyten, der TLR2, Rac1, PI3K und CD11b/CD18 involviert [HAROKOPAKIS ET AL., 2006]. Der aktivierte CD11b/CD18-Komplex befähigt Monozyten zur Bindung von endotheliale ICAM-1-Rezeptor und Transmigration durch Endothelzellen. *Porphyromonas gingivalis*-Fimbrien können Monozyten zur Sekretion von IL-6 und MAP-Kinasen anregen und NF- κ B via TLR2, CD14 und CD11a/CD18 aktivieren [OGAWA ET AL., 2002], im Gegensatz zur IL-8-Ausschüttung von gingivalen Epithelzellen über TLR2 [ASAI ET AL., 2001]. Es werden zwei Fimbrien-Typen unterschieden, die beide auf die Pathogenese der Parodontitis Einfluss nehmen: Major-Fimbrie (FimA) und Minor-Fimbrie [ASAI ET AL., 2001; AMANO ET AL., 2004]. Dabei scheint die Minor-Fimbrie TLR2-vermittelt die Produktion von IL-1 α , IL-1 β , TNF- α und IL-6 zu induzieren und auch die Precursor-Zellen von Osteoklasten zur Differenzierung anzuregen [AMANO ET AL., 2004; HIRAMINE ET AL., 2003]. Zementoblasten exprimieren TLR2, TLR4, CD14 und MD-2. *Porphyromonas gingivalis*-LPS soll fähig sein, Zementoblasten durch die Regulation der Gene und Proteine zu beeinflussen, die mit der Mineralisation und Knochenresorption assoziiert sind [NOCITI ET AL., 2003]. Die *Porphyromonas gingivalis*-Fimbrien induzieren bei ihrem primären Kontakt hohe Level NF- κ B -abhängiger Zytokine. Wiederholte Stimulation inhibierte allerdings die Expression NF- κ B-abhängiger Gene [HAJISHENGALLIS UND GENCO, 2004]. Neuere Studien zeigten, dass rekombinantes *Porphyromonas gingivalis* GroEL, ein Homolog der HSP60-Familie, seine intrazelluläre Signalkaskade in THP-1-Zellen via TLR2 oder TLR4 und über eine Kombination der beiden Rezeptoren

induziert [ARGUETA ET AL., 2006]. Sie konnten dabei eine LPS-Kontamination ausschließen. Triacylierte Lipopeptide von *Porphyromonas gingivalis* sind in der Lage, Wirtszellen in einem TLR2-abhängigen und TLR1-/TLR6-unabhängigen Vorgang zu aktivieren [MAKIMURA ET AL., 2006].

Auch *Prevotella intermedia* [SUGAWARA ET AL., 2001] und orale Treponemen [SCHRÖDER ET AL., 2000] führen zu einer TLR2-vermittelten Signaltransduktion. Dies führt zur NF- κ B-induzierten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-8. *Treponema denticola* besitzt starke proteolytische Aktivität und ist damit in der Lage, exogenes IL-8 zu degradieren [ASAI ET AL., 2003]. Außerdem inhibieren Glykokonjugate von *Treponema medium* die TLR-induzierte Zellaktivierung durch die Blockade von „LPS-Binding Protein“ (LBP) und CD14 [ASAI ET AL., 2003].

Osteoklasten muriner Knochenmarkszellen weisen alle bekannten TLRs auf. TAKAMI ET AL. [2002] stellten fest, dass TLR-Stimulation eine Inhibierung der Osteoklasten-Differenzierung zur Folge hatte. Dadurch waren die Osteoklasten-Precursor während einer Infektion nicht in der Lage sich in reife nicht-inflammatorische Osteoklasten zu differenzieren. Intakte TLR-Funktion vermittelt somit eine verstärkte proinflammatorische Antwort und Knochenresorption nach erfolgter Anaerobier-Infektion. Bei TLR4-defizienten Mäusen konnte unter diesen Umständen eine verminderte Knochenresorption festgestellt werden [HOU ET AL., 2000].

1.5 Aufgabenstellung

Noch sind Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis nicht abschließend geklärt, was eine stete Erforschung der möglichen relevanten Faktoren und ihrer Regulationsmechanismen erforderlich macht. Neben parodontalpathogenen Keimen wurden mittlerweile auch individuelle, die Wirtsabwehr betreffende, Mechanismen für die Gewebedestruktion identifiziert. TLR2 ist als Rezeptor vieler bakterieller PAMPs nachgewiesen worden. Neben Bestandteilen Gram-positiver und -negativer Bakterien erfordern auch einige an Parodontitis beteiligte parodontalpathogene Mikroorganismen eine TLR2-vermittelte Signaltransduktion. Dazu gehört vor allem *Porphyromonas gingivalis*, aber auch *Treponema denticola* und *Prevotella intermedia*. Für TLR2 wurden diverse Polymorphismen in der intrazellulären Region nachgewiesen, für die eine Einschränkung der Signaltransduktion diskutiert wird. Zudem lassen sich interindividuelle Unterschiede in der Empfänglichkeit für diverse Erkrankungen, so auch Parodontitis, auf Genomvariationen zurückführen.

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss des Arg677Trp- und des Arg753Gln-Polymorphismus auf die Inzidenz und den Verlauf der Parodontitis untersucht. Anhand einer hinreichend großen Patienten- und Kontrollgruppe, die für Alter, Geschlecht und Rauchgewohnheiten gematcht wurde, soll die Hypothese überprüft werden, ob das Vorliegen einer der beiden Mutationen des TLR2-Gens mit der Inzidenz der Parodontitis assoziiert werden kann. Davon ausgehend soll nach Unterteilung in chronische und aggressive Parodontitis untersucht werden, ob es einen Einfluss der TLR2-Polymorphismen auf den Verlauf der Parodontitis gibt. Abschließend wird die Frage geklärt, ob Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern bestehen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Probenentnahme

Phosphate Buffered Saline (PBS) GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA

DNA-Extraktion

QIAamp DNA Mini Kit QIAGEN, Hilden, CA

PBS GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA

Ethanol 98-100 % Roth, Braunschweig

Aqua dest. B. Braun, Melsungen

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Taq DNA Polymerase QIAGEN, Hilden, CA

Primer T2combi sense (s) TIB MOLBIOL, Berlin

5'-GCCTACTGGGTGGAGAACCT-3'

Primer T2combi antisense (as) 5'-GGCCACTCCAGGTAGGTCTT-3'	TIB MOLBIOL, Berlin
Desoxyribonucleosidtriphosphat-Mix (dNTP) (200 µM)	Clontech, Heidelberg
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Plasmid-DNA TLR2 wild type (wt)	Stratagene, La Jolla, CA
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Plasmid-DNA K 2256	Stratagene, La Jolla, CA
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Plasmid-DNA K 2029	Stratagene, La Jolla, CA
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen

Verdau

Aqua dest.	B. Braun, Melsungen
Restriktionsendonuclease Aci I	New England BioLabs, Braunschweig
NEBuffer 3	New England BioLabs, Braunschweig

Gelelektrophorese

Agarose GTQ, 1 % Agarose-Gel	Roth, Braunschweig
Biozym agarose, 0,75 % Nusieve	Biozym, Hessisch Oldendorf

5xTBE, auf 1xTBE verdünnen	Tris-Base 54 g, Borsäure 27,5 g, EDTA 0,5 M (pH 8,0) 20 ml oder 3,7 g; auffüllen auf 1 l mit Aqua dest.
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen

2.1.2 Geräte

Eagle Eye II, Imaging Chemiluminescent Western Blotting	Stratagene, La Jolla, CA
Eppendorf Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Gelelektrophoresekammer	Febikon, Wermelskirchen
Mini Oven MK II	MWG-Biotech, Ebersberg
Test Swab, steriler Wattetupfer	Copan Innovation, Brescia Italien
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen

2.2 Methoden

2.2.1 Auswahl der Patienten

Die Ethikkommission stimmte dem Studienantrag zur TLR2-Polymorphismusbestimmung zu. Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Charité, Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Vor jeder Probenentnahme wurde nach schriftlicher und mündlicher Information vom Patienten eine Einwilligungserklärung unterschrieben.

Alle Patienten wurden von Zahnmedizinern untersucht, die von der Abteilung für Parodontologie und synoptische Zahnmedizin der Charité, Universitätsmedizin Berlin, ausgebildet wurden.

2.2.1.1 Einschlusskriterien

Patienten, die an generalisierter Parodontitis leiden, (n=197) wurden in die Studie eingeschlossen. Einschlusskriterien waren ein klinischer Attachment-Verlust von mindestens 3 mm an wenigstens 30 % der Zähne bei vorliegender generalisierter Parodontitis. Voraussetzung war eine schriftliche Zustimmung zur Teilnahme an der Studie.

Die Patienten wurden in Übereinstimmung mit der Klassifikation der Parodontalerkrankungen der American Academy of Periodontology von 1999 [ARMITAGE, 1999] nach ihrem klinischen Erscheinungsbild in chronische (CP) oder aggressive Parodontitis (AP) unterteilt. Zusätzlich zu den oben genannten Kriterien weisen Patienten mit AP ein Alter zwischen 18 und 40 Jahren sowie generalisierten approximalen Attachment-Verlust von mehr als 5 mm an mindestens drei permanenten Zähnen auf. Davon ausgenommen sind erste Molaren und Inzisivi. Von den Parodontitis-Patienten wurde ein Parodontalstatus erstellt, um den klinischen Attachment-Verlust (CAL) zu messen.

Die Kontrollgruppe setzt sich aus 349 gesunden Patienten zusammen, die keine Anzeichen einer Parodontitis zeigten. Zu dieser Kontrollgruppe zählten außerdem 75 Patienten, die älter als 60 Jahre sind und bei einem Restzahnbestand von mindestens 20 Zähnen zeitlebens keine Parodontitis aufgewiesen haben.

Als Raucher wurden all diejenigen Patienten definiert, die in ihrem Leben umgerechnet mindestens zehn Jahre lang 20 Zigaretten am Tag geraucht haben.

Abgesehen von 21 kroatischen Kaukasiern waren alle anderen Patienten deutsche Kaukasier. Das kroatische Patientenkollektiv wurde von V.H. (Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité - Universitätsmedizin Berlin) rekrutiert. Die Kontrollgruppe

stammt aus dem Bereich Berlin, mit Ausnahme von 27 Patienten aus Konstanz, beigesteuert von C.H. (Biochemical Pharmacy, Department of Biology, University of Konstanz).

2.2.1.2 Ausschlusskriterien

War keine Zuordnung zu einer der oben genannten Gruppen möglich oder wurde die Einwilligung zur Studie verweigert, wurden die Patienten ausgeschlossen. Weitere Ausschlusskriterien waren maligne Grunderkrankungen, Diabetes mellitus, immunsuppressive Behandlungen sowie bekannte angeborene oder erworbene Immundefekte.

2.2.1.3 Erfassungsbogen

Im Erfassungsbogen wurden allgemeine und klinische Daten dokumentiert. An allgemeinen Daten wurden Name, Vorname, Geburtsdatum, Nationalität und Geschlecht erfasst. Die klinischen Daten umfassten die Diagnose chronische oder aggressive Parodontitis, in lokalisierter bzw. generalisierter Form, sowie die Zuordnung zur Kontrollgruppe (älter als 60, mehr als 20 Zähne, keine Parodontitis). Des Weiteren wurde auch eine kurze Einschätzung der Mundhygiene bei der Erstvorstellung vorgenommen und als gut oder schlecht eingestuft sowie das Vorliegen von subgingivalem Zahnstein festgehalten. Nach erfolgter Therapie wurde anhand einer Reevaluation beurteilt, ob sie erfolgreich war. Die Anzahl der Zähne wurde dokumentiert, ebenso ein kurzer Raucherstatus, wobei „ja“ all diejenigen Patienten erhielten, die rauchen bzw. rauchten. „Nein“ bezeichnet nur diejenigen, die nie geraucht haben. Um das Rauchverhalten vergleichen zu können, wurden so genannte „pack years“ berechnet. Ein „pack year“ ist das Equivalent für ein Jahr in dem der Patient 20 Zigaretten pro Tag geraucht hätte. Zusätzlich wurden auch die

Ausschlusskriterien erfasst, um die entsprechenden Patienten aus der Studie herausnehmen zu können. Dazu gehören Diabetes mellitus Typ I bzw. Typ II, alle bekannten Begleiterkrankungen und malignen Grunderkrankungen, Immunsuppression und Immundefekte. Um die Daten später anonymisiert randomisieren zu können, wurde jeder Probe eine Nummer zugeordnet.

2.2.2 Wangenschleimhautabstrich

Der Wangenschleimhautabstrich erfolgte sowohl bei Patienten mit Parodontitis als auch der gesunden Kontrollgruppe mit einem sterilen Wattestäbchen, wobei für 10 s mehrmals am Planum buccale des Patienten entlanggestrichen wurde. Anschließend wurde der Tupfer in 300 µl PBS ausgewaschen und danach verworfen. Bis zur weiteren Testung wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

Diese Vorgehensweise lieferte die besten Resultate. Im Vorfeld wurden verschiedene Varianten der DNA-Gewinnung erprobt. Vorheriges Ausspülen des Mundes oder Belassen des Tupfers im Vestibulum brachten keine Verbesserung.

2.2.3 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgte nach dem „Blood and Body Fluid Spin Protocol“ des QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, CA), das in Abbildung 2.1 dargestellt ist. Dazu benötigt man 200 µl Ausgangsmaterial. Wie in Abbildung 2.1 zu sehen wird in einem ersten Schritt die DNA mit QIAamp Proteinkinase K lysiert, anschließend in drei Schritten gewaschen und eluiert, so dass man reine Genom-DNA erhält. Im letzten Schritt wurden 50 statt 200 µl destilliertes Wasser verwendet.

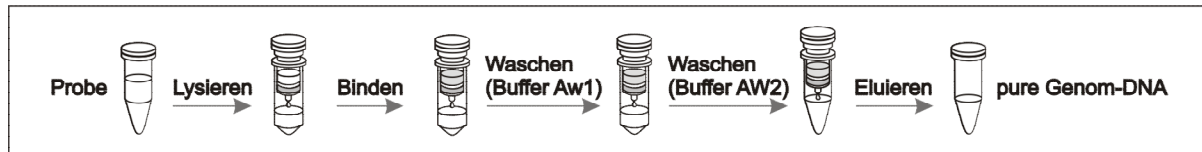


Abbildung 2.1: QIAamp „Blood and Body Fluid Spin Protocol“

2.2.4 Polymorphismus-Bestimmung

Die Polymorphismus-Bestimmung wurde anhand der Allel-spezifischen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für TLR-2 basierend auf dem Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) von SCHRÖDER [SCHRÖDER ET AL., 2003] vorgenommen (siehe Tabelle 2.1). Bei diesem Verfahren können durch PCR und anschließenden Enzymverdau mit *Aci I* die bekannten Polymorphismen Arg753Gln und Arg677Trp vom TLR-2-Wildtyp (wt) unterschieden werden.

2.2.4.1 PCR

Mit Hilfe der PCR wird ein 340 Basenpaare (bp) langes Fragment der aufgereinigten DNA amplifiziert. Die Ausgangs-DNA wird mit zwei passenden Oligonucleotidprimern, Puffer, Nucleotiden und thermostabiler DNA-Polymerase versehen. Im Thermocycler durchläuft der Ansatz drei Schritte: Denaturierungs-, Annelierungs- und Elongationsschritt. Während des Denaturierungsschrittes wird die doppelsträngige Ausgangs-DNA getrennt, so dass im Annelierungsschritt die Oligonucleotidprimer: T2combi sense (s) 5'-GCCTACTGGGTGGAGAACCT-3' und antisense (as) 5'-GGCCACTCCAGGTAGGTCTT-3', an die nun einzelsträngige DNA hybridisieren können. Im Elongationsschritt verlängert die Taq-Polymerase die Primer, womit man wieder doppelsträngige DNA erhält, die der Ausgangs-DNA gleicht.

2 Material und Methoden

Der Master-Mix (25 µl) für die PCR wurde mit 1 µl der aufgereinigten Proben angesetzt. Des Weiteren beinhaltet er 2,5 µl 10x Puffer, 3mM MgCl₂, 2 µl dNTP-Mix (200 µM), und jeweils 25 pmol vom sense (s) und antisense (as) T2 combi-Primer. Die PCR wurde in einem Biometra T3 Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Denaturierung für 10 min bei 95°C, anschließend 30 Zyklen für 30 s bei 95°C, für 30 s bei 58°C und für 25 s bei 72°C, abschließend ein Elongationsschritt für 5 min bei 72°C. Nach Ende der PCR wurden die PCR-Produkte vom Biometra T3 Thermocycler auf 4°C gekühlt.

2.2.4.2 Enzym-Verdau

Für den Enzym-Verdau werden 3 µl des PCR-Produktes mit der Restriktionsendonuclease *Aci* I (0,125 U/Probe) über Nacht bei 37°C verdaut. *Aci* I schneidet die DNA an genau definierter Stelle. Die Zielsequenz für die Restriktionsendonuclease *Aci* I ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

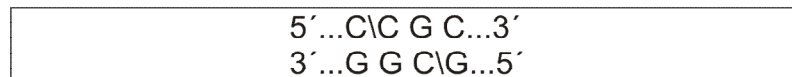


Abbildung 2.2: Zielsequenz und Schnittstelle des Restriktionsenzym *Aci* I

Durch den Enzym-Verdau mit der Restriktionsendonuclease *Aci* I erhält man vom TLR-2-Wildtyp drei unterschiedlich lange Fragmente von 227, 75 und 38 bp. Allerdings sind die Banden der kurzen Fragmente in der Elektrophorese schlechter sichtbar als das lange Fragment mit 227 bp. Die TLR-2-Polymorphismen Arg753Gln und Arg677Trp liefern hingegen zwei Fragmente: Arg753Gln 265 und 75 bp sowie Arg677Trp 302 und 38 bp lange Fragmente. Durch ihre unterschiedlichen Banden lassen sich die beiden Polymorphismen vom TLR-2-Wildtyp abgrenzen (siehe

Abbildung 2.3). Heterozygote Individuen zeigen zusätzlich zu den beiden Banden des jeweiligen Polymorphismus auch Banden des TLR2-Wildtyps.

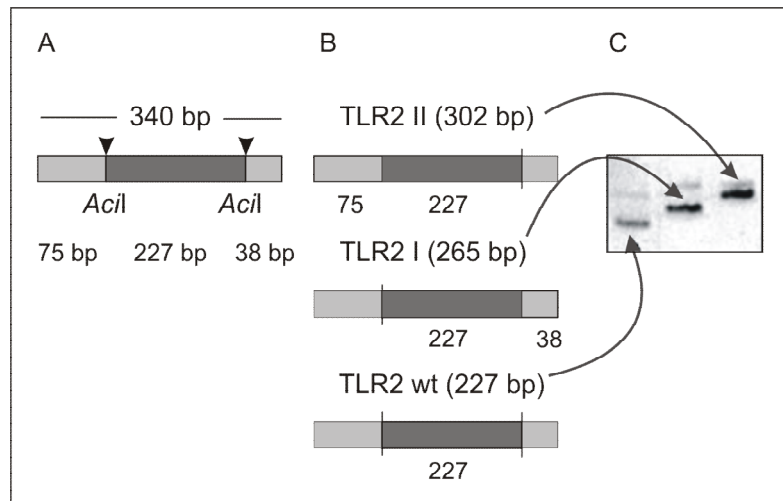


Abbildung 2.3: Basis-Prinzip der RFLP, das für die Erkennung der beiden Polymorphismen designiert wurde. Das beide Polymorphismen umfassende Primer-Set liefert ein PCR-Produkt von 340 bp Länge. Die Pfeile markieren die Schnittstellen für die Restriktionsendonuclease *Aci*I. Der Verdau mit *Aci*I bringt Fragmente von entweder 302 bp (TLR-2 II: Arg677Trp), 265 bp (TLR-2 I: Arg753Gln) oder 227 bp (TLR-2 wt: TLR-2-Wildtyp) hervor [aus SCHRÖDER ET AL., 2003].

2.2.4.3 Gelelektrophorese

In der auf den Verdau folgenden Gelelektrophorese werden die DNA-Fragmente nach ihrer Länge aufgetrennt (siehe Abbildung 2.3). Man erhält unterschiedliche Banden, die mit Hilfe des Eagle Eye II visualisiert werden können. Dazu wird die DNA mit Ethidiumbromid, einem Fluoreszenzmarker, gekennzeichnet. Dadurch kann man die untersuchten Proben mit den beigegebenen Kontrollen vergleichen und die Proben mit einem Polymorphismus identifizieren.

2 Material und Methoden

Tab. 2.1: Protokoll TLR-2 Polymorphismus RFLP

Primer: T2combi s und as, jeweils 1:100 verdünnt		
Ebenso Plasmid-DNA: TLR2 wt, K 2259, K 2029		
<u>PCR-Master-Mix</u> (für 40 Proben a 25 µl):	Primer s	100 (2,5) µl
	Primer as	100 (2,5) µl
	10xPuffer	100 (2,5) µl
	MgCl ₂	80 (2) µl
	dNTP-Mix	80 (2) µl
	Aqua dest.	330 (6,25) µl
	Taq	10 (0,25) µl
	1 µl Probe in 4 µl Aqua dest. vorlegen +20 µl Master-Mix	
Die Methode erkennt zwei Polymorphismen, deshalb vier Kontrollen:		
	TLR-2-Wildtyp	TLR-2 wt
	Arg753Gln	K 2256
	Arg 677Trp	K 2029
		Leer (Aqua dest.)
<u>Thermocyclerparameter</u>		
	1 x	10 min 95°C
	30 x	30 s 95°C
		30 s 58°C
		25 s 72°C
	1 x	5 min 72°C
<u>Enzym-Verdau</u> (40 Proben a 10 µl)	NEBuffer 3	40 (1) µl
	Aqua dest.	240 (6) µl
	<i>Aci I</i> (0,125 U/Probe)	5 (0,125) µl
	3 µl PCR-Produkt	+7 µl
		Über Nacht bei 37°C
<u>Gelelektrophorese</u>	Agarose-Gel	1 %
	Nusieve	0,75 %
		1,5 h bei 70 V

2.2.5 Statistische Auswertung

Die Proben der Patienten- und der gesunden Kontrollgruppe wurden randomisiert und im 1:1-Matching für Geschlecht, Raucherstatus und Alter angepasst.

Zur Auswertung der Genotypisierungs-Daten in den Kontingenztafeln wurde der *Fisher's Exact Test* durchgeführt. Es wurde beidseitig getestet. Als Ergebnis dieses Tests erhält man einen p-Wert (p von *probability*). Dieser beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass der beobachtete (oder ein noch extremerer) Effekt einer Studie aufgetreten sein könnte, wenn die Nullhypothese richtig und der Effekt auf das Spiel des Zufalls zurückzuführen ist. Je kleiner der Wert, desto deutlicher spricht das beobachtete Ergebnis gegen die Nullhypothese. Es ist eine Konvention, dass ein p-Wert gleich oder kleiner 0,05 als statistisch signifikant angesehen wird. Wenn die Signifikanz von Effekten interpretiert wird, sollten p-Werte immer im Zusammenhang mit Konfidenzintervallen verwendet werden.

Das Konfidenzintervall (CI) beschreibt den Bereich, in dem der „wahre“ Wert einer Messung (Effektgröße) mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit erwartet werden kann (üblicherweise 95%). Die Effektgröße kann dabei z.B. ein Therapieeffekt, ein Risiko oder die Sensitivität eines diagnostischen Tests sein. Das Konfidenzintervall beschreibt die Unsicherheit über die Zuverlässigkeit der Aussage zur Effektgröße. Die Breite des Konfidenzintervalls hängt u.a. von der Zahl der in die Studie eingeschlossenen Patienten ab und wird mit zunehmender Patientenzahl enger, d. h. die Effektgröße kann präziser geschätzt werden.

Odds Ratio (OR, Chancenverhältnis) bezeichnet das Verhältnis (Ratio) der Odds, dass ein Ereignis oder Endpunkt in der experimentellen Gruppe eintritt, zu der Odds, dass das Ereignis in der Kontrollgruppe eintritt. Eine OR von 1 bedeutet, dass zwischen den Vergleichsgruppen kein Unterschied besteht.

Die statistische Auswertung wurde unter Verwendung der Programme Microsoft®Excel 97 sowie GraphPad Prism 4.03 für Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com durchgeführt.

3 Ergebnisse

Um den Einfluss von Mutationen des TLR2-Gens auf Inzidenz und Verlauf der Parodontitis herauszufinden, wurden der Nukleotidaustausch an Position 2029C>T resultierend in einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Tryptophan an Position 677 (Arg677Trp) und der Nukleotidaustausch an Position 2258G>A resultierend in einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Glutamin an Position 753 (Arg753Gln) untersucht. Die Häufigkeiten für die Allele bzw. die Genotypen dieser beiden Polymorphismen wurden in den Patientengruppen und der jeweiligen Kontrollgruppe anhand des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) (siehe Abb. 3.1) bestimmt und miteinander verglichen.

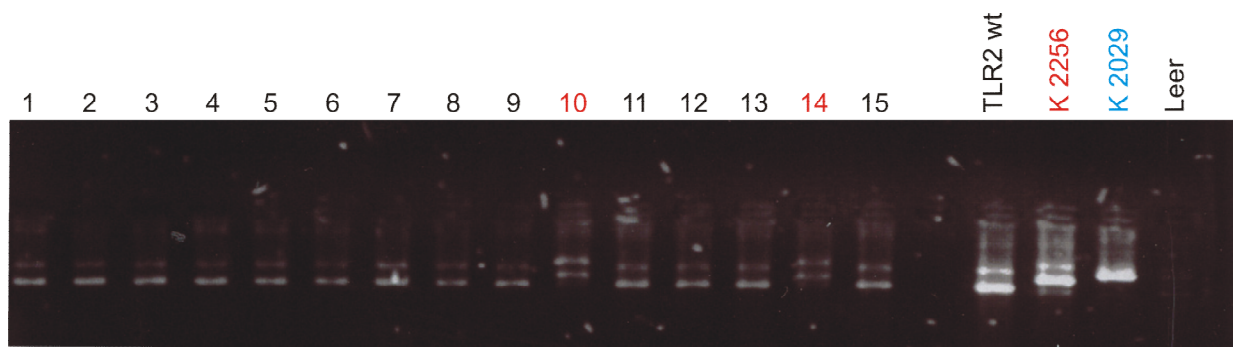


Abbildung 3.1: Auswertung des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP); 1-15 sind Patientenbanden, wobei 10 und 14 des Arg753Gln-Polymorphismus aufweisen; TLR2 wt: Wildtyp, K 2256: Arg753Gln, K 2029: Arg677Trp, Leer: Aqua dest.

In dieser Studie wurde sowohl nach dem Arg677Trp-Polymorphismus als auch dem Arg753Gln-Polymorphismus des TLR2-Gens gesucht. Der Arg677Trp-Polymorphismus wurde bei keinem der untersuchten Studienteilnehmer vorgefunden und wird deshalb in der Auswertung nicht weiter berücksichtigt. Da keine homozygoten Individuen gefunden wurden, ist die statistische Auswertung in Annahme von Häufigkeiten für heterozygote Individuen durchgeführt worden.

3 Ergebnisse

Es wurden 197 Patienten mit Parodontitis sowie 394 gesunde Patienten für die Kontrollgruppe rekrutiert und auf Mutationen des TLR2-Gens untersucht. Zur Auswertung sind 197 Parodontitis-Patienten und 197 Patienten der gesunden Kontrollgruppe nach Alter, Geschlecht und Raucherstatus angepasst worden (siehe Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Studiendesign

	Total	CP	AP
Parodontitis-Patienten			
<i>Anzahl (n)</i>	197	116	81
<i>Alters-Ø* (Jahre)</i>	49,77 ±11,95	57,07 ±8,82	39,31 ±6,94
<i>Skala (Jahre)</i>	22 – 81	40 – 81	22 – 54
<i>Männer (%)</i>	43,2	38,8	49,4
<i>Raucher (%)</i>	34,5	36,2	32,1
Angepasste Kontrollen			
<i>Anzahl (n)</i>	197	116	81
<i>Alters-Ø* (Jahre)</i>	43,71 ±16,03	55,0 ±10,53	27,52 ±4,48
<i>Skala (Jahre)</i>	22 – 83	40 – 83	22 – 39
<i>Männer (%)</i>	43,2	38,8	49,4
<i>Raucher (%)</i>	34,5	36,2	32,1

* Alters-Ø: Altersdurchschnitt

Die Gruppe der Parodontitis-Patienten wurde anhand der aktuellen Klassifikation der Parodontalerkrankungen der American Academy of Periodontology von 1999 [ARMITAGE, 1999] in 116 Patienten mit dem klinischen Erscheinungsbild der chronischen Parodontitis (CP) und 81 Patienten mit dem der aggressiven Parodontitis

(AP) aufgeteilt. Die Patienten mit chronischer Parodontitis wiesen bei vorliegender generalisierter Parodontitis einen klinischen Attachment-Verlust von mindestens 3 mm an wenigstens 30 % der Zähne auf. Demgegenüber zeichneten sich die Patienten mit aggressiver Parodontitis durch geringeres Alter sowie generalisierten approximalen Attachment-Verlust von mehr als 5 mm an mindestens drei permanenten Zähnen, ausgenommen der ersten Molaren und Inzisivi, aus. Die Patienten mit chronischer Parodontitis ($57,07 \pm 8,82$ Jahre) waren im Durchschnitt älter als die Patienten mit aggressiver Parodontitis ($39,31 \pm 6,94$ Jahre) (siehe Tabelle 3.1).

Der mittlere klinische Attachmentverlust aller Patienten lag bei $4,39 \pm 1,23$ mm. Bei den CP-Patienten fiel er mit $4,07 \pm 1,06$ mm geringer aus als bei den AP-Patienten mit $5,45 \pm 1,19$ mm (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Parodontitis-Patienten

	<i>Anzahl</i> (<i>n</i>)	<i>CAL</i> * (<i>mm</i>)
Total	197	$4,39 \pm 1,23$
CP	116	$4,07 \pm 1,06$
AP	81	$5,45 \pm 1,19$

* CAL: klinischer Attachmentverlust (clinical attachment-loss)

3.1 Untersuchung des Einflusses von Mutationen des Toll-like Rezeptors 2 auf die Inzidenz der Parodontitis

Es wurde untersucht, ob das Vorliegen des Arg753Gln-Polymorphismus des TLR2-Gens mit einem erhöhten Risiko für die Inzidenz der Parodontitis verbunden ist.

Für die Auswertung wurden 197 Patienten mit Parodontitis an gesunde Kontrollen in Abhängigkeit von Alter (PA: $49,77 \pm 11,95$ Jahre, Kontrollen: $43,71 \pm 16,03$ Jahre),

3 Ergebnisse

Geschlecht (jeweils 43.2 % Männer) und Raucherstatus (beide 34,5 %) angepasst (siehe Tabelle 3.1).

In Tabelle 3.3 sind die Ergebnisse für den Arg753Gln-Polymorphismus bei Parodontitis-Patienten und Kontrollen aufgeführt. Der Arg753Gln-Polymorphismus wurde bei 11 der 197 Parodontitis-Patienten (5,58 %) gefunden. Es zeichnet sich ein Trend zu geringerer Prävalenz in der Parodontitisgruppe ab. Diese Häufigkeit weist jedoch keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf, in der 18 der 197 Kontrollen (9,14 %) den Polymorphismus aufweisen. Die Odds Ratio liegt bei 0,5881. Da das 95 % Konfidenzintervall von 0,2702 bis 1,280 reicht, liegt kein statistisch signifikanter Unterschied vor. Der p-Wert beträgt 0,2467.

Tabelle 3.3: Arg753Gln-Polymorphismus bei Parodontitis-Patienten und Kontrollen

	Total (n = 197)	CP (n = 116)	AP (n = 81)
<i>Patienten</i>	11 (5,58 %)	5 (4,31 %)	6 (7,41 %)
<i>Kontrollen</i>	18 (9,14 %)	9 (7,76 %)	9 (11,11 %)
<i>Odds Ratio</i>	0,5881	0,5355	0,6400
95% CI°	0,2702-1,280	0,1738-1,650	0,2168-1,890
<i>p-Wert</i>	0,2467	0,4092	0,5891

° 95% Konfidenzintervall

3.2 Untersuchung des Einflusses von Mutationen des Toll-like Rezeptors 2 auf den Verlauf der Parodontitis

Patienten mit chronischer (CP) und aggressiver Parodontitis (AP) wurden hinsichtlich des Vorliegens des Arg753Gln-Polymorphismus für das TLR2-Gen mit den angepassten gesunden Kontrollen verglichen.

3.2.1 Chronische Parodontitis

Es wurde untersucht, ob mit dem Arg753Gln-Polymorphismus des TLR2-Gens ein erhöhtes Risiko für den Verlauf der chronischen Parodontitis besteht.

Das Studiendesign für die Gruppe mit chronischer Parodontitis ist in Tabelle 3.1 zu sehen. Sie wurden für die Kriterien Alter (CP: 57,07 \pm 8,82 Jahre, Kontrollen: 55,0 \pm 10,53 Jahre), Geschlecht (38,8 % Männer) und Raucherstatus (36,2 % Raucher) an die gesunden Kontrollen angepasst.

Von den 116 Patienten mit chronischer Parodontitis weisen fünf Patienten (4,31 %) den Arg753Gln-Polymorphismus auf. In der Kontrollgruppe wurde er neunmal (7,76 %) festgestellt. Der Arg753Gln-Polymorphismus tritt also seltener in der Gruppe der CP-Patienten auf. Diese Tendenz konnte statistisch nicht verifiziert werden. Die statistische Auswertung ergab eine Odds Ratio von 0,5355 mit einem 95 % Konfidenzintervall von 0,1738 bis 1,650 und einem p-Wert von 0,4092 (siehe Tabelle 3.3). Es liegt kein statistisch signifikanter Unterschied vor.

3.2.2 Aggressive Parodontitis

Es wurde nach einem Unterschied der Häufigkeit des Arg753Gln-Polymorphismus bei Patienten mit aggressiver Parodontitis (AP) im Vergleich zu den angepassten Kontrollen gesucht.

Die Gruppe der Patienten mit aggressiver Parodontitis und die der Kontrollen setzte sich aus jeweils 49,4 % Männern und 32,1 % Rauchern zusammen, bei einem Altersdurchschnitt von 39,31 \pm 6,94 Jahren bei den AP-Patienten und 27,52 \pm 4,48 Jahren in der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 3.1).

Der Vergleich der Patienten mit aggressiver Parodontitis mit den angepassten Kontroll-Patienten zeigte bei sechs Polymorphismen der AP-Patienten (7,41 %) und neun in der Kontrollgruppe (11,11 %) eine Odds Ratio von 0,6400 mit einem 95 % Konfidenzintervall von 0,2168 bis 1,890 sowie einem p-Wert von 0,5891 (siehe Tabelle 3.3). Es spiegelt sich auch hier ein Trend zu geringerer Ausprägung des Arg753Gln-Polymorphismus in der Gruppe der Patienten mit aggressiver Parodontitis wieder. Allerdings liegt kein statistisch signifikanter Unterschied vor.

3.3 Vergleich von Rauchern und Nichtrauchern mit Parodontitis

Rauchen ist einer der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung der Parodontitis. Deshalb wurde untersucht, ob die Ausprägung des Arg753Gln-Polymorphismus in Abhängigkeit vom Raucherstatus einen Einfluss auf Parodontitis aufweist.

Da die Studie im angepassten Design durchgeführt wurde, gibt es sowohl bei den Parodontitis-Patienten als auch in der Kontrollgruppe 68 Raucher (34,5 %) und 129 Nichtraucher (65,5 %). Im Kollektiv der 197 Parodontitis-Patienten trat der Arg753Gln-Polymorphismus bei vier Rauchern (5,88 %) und bei sieben Nichtrauchern (5,43 %) auf. In der Kontrollgruppe wiesen sechs Raucher (8,82 %) und zwölf Nichtraucher (9,30 %) den Arg753Gln-Polymorphismus auf (siehe Tabelle 3.4).

Das mit Hilfe des Fisher's Exact Test ermittelte Odds Ratio liegt bei Rauchern bei 0,6458 (95% CI: 0,1738-2,400; p-Wert: 0,7444) und bei Nichtrauchern bei 0,5594 (95% CI: 0,2129-1,470; p-Wert: 0,3407) (siehe Tabelle 3.4). Dies scheint zunächst die Tendenz zu geringerer Polymorphismusfrequenz für die Parodontitispatienten zu bestätigen, wobei der Unterschied bei Nichtrauchern etwas größer ist. Beim Vergleich von Parodontitis-Patienten und Kontrollen innerhalb der Gruppe der Raucher und

Tabelle 3.4: Häufigkeit des Arg753Gln-Polymorphismus in Abhängigkeit vom Raucherstatus

		Raucherstatus	
		<i>Raucher</i>	<i>Nichtraucher</i>
	n	68	129
Total		4 (5,88 %)	7 (5,43 %)
<i>Kontrollgruppe</i>	197	6 (8,82 %)	12 (9,30 %)
<i>Odds Ratio</i>		0,6458	0,5594
<i>95% CI</i>		0,1738-2,400	0,2129-1,470
<i>p-Wert</i>		0,7444	0,3407
	n	42	74
CP		1 (2,38 %)	4 (5,41 %)
<i>Kontrollgruppe</i>	116	4 (9,52 %)	5 (6,76 %)
<i>Odds Ratio</i>		0,2317	0,7886
<i>95% CI</i>		0,02477-2,168	0,2031-3,062
<i>p-Wert</i>		0,3597	1,0000
	n	26	55
AP		3 (11,5 %)	3 (5,5 %)
<i>Kontrollgruppe</i>	81	2 (7,7 %)	7 (12,7 %)
<i>Odds Ratio</i>		1,565	0,3956
<i>95% CI</i>		0,2391-10,25	0,09672-1,618
<i>p-Wert</i>		1,0000	0,3203

° 95 % Konfidenzintervall

Nichtraucher konnte aber kein statistisch signifikanter Unterschied für das Vorliegen des Arg753Gln-Polymorphismus festgestellt werden.

3.3.1 Vergleich von Rauchern und Nichtrauchern mit chronischer Parodontitis

Es wurde untersucht, ob ein Unterschied für die Ausprägung des Arg753Gln-Polymorphismus bei Patienten mit chronischer Parodontitis (CP) in Abhängigkeit vom Raucherstatus besteht.

Tabelle 3.4 zeigt die Häufigkeiten des Arg753Gln-Polymorphismus in Abhängigkeit vom Raucherstatus bei CP-Patienten und gesunden Kontrollen. Die Gruppe der 116 CP-Patienten und 116 Kontrollen setzte sich aus 42 Rauchern (36,2 %) und 74 Nichtrauchern (63,8 %) zusammen. Dabei zeigten ein Raucher (2,38 %) und vier Nichtraucher (5,41 %) der CP-Patienten und in der Kontrollgruppe vier Raucher (9,52 %) sowie fünf Nichtraucher (6,76 %) den Arg753Gln-Polymorphismus (siehe Tabelle 3.4).

Die statistische Auswertung ergab für Raucher eine Odds Ratio von 0,2317 (95% CI: 0,02477-2,168; p-Wert: 0,3597) und für Nichtraucher von 0,7886 (95% CI: 0,2031-3,062; p-Wert: 1,0000) (siehe Tabelle 3.4). Patienten mit chronischer Parodontitis, die gleichzeitig rauchen, weisen einen Trend zu geringerer Prävalenz des Arg753Gln-Polymorphismus als rauchende Kontrollen auf. Es liegen jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede vor. Für Nichtraucher konnte kein Unterschied festgestellt werden.

3.3.2 Vergleich von Rauchern und Nichtrauchern mit aggressiver Parodontitis

Es wurde untersucht, ob ein Unterschied für die Ausprägung des Arg753Gln-Polymorphismus bei Patienten mit aggressiver Parodontitis (AP) in Abhängigkeit vom Raucherstatus besteht.

Die Gruppe von Patienten mit aggressiver Parodontitis und die dazugehörige Kontrollgruppe setzten sich aus 26 Rauchern und 55 Nichtrauchern zusammen. Dabei wiesen von den Patienten mit aggressiver Parodontitis drei Raucher (11,5 %) und drei Nichtraucher (5,5 %) den Arg753Gln-Polymorphismus des TLR2-Gens auf. In der Kontrollgruppe trat er bei zwei Rauchern (7,7 %) und sieben Nichtrauchern (12,7 %) auf (siehe Tabelle 3.4).

Die Nichtraucher der Patienten mit aggressiver Parodontitis weisen demnach die Tendenz zu geringerer Prävalenz des Arg753Gln-Polymorphismus auf. Der statistische Vergleich ergab im Fisher's Exact Test für die Raucher ein Odds Ratio von 1,565 (95% CI: 0,2391-10,25; p-Wert: 1,0000) und für die Nichtrauchern 0,3956 (95% CI: 0,09672-1,618; p-Wert: 0,3203) (siehe Tabelle 3.4). Somit liegt keine statistische Signifikanz vor. Für die Raucher konnte kein Unterschied in Hinsicht auf das Vorliegen des TLR2-Polymorphismus festgestellt werden.

3.4 Vergleich mit über 60-Jährigen parodontal Gesunden

Die Gruppe der Patienten mit chronischer Parodontitis wurde zusätzlich noch mit einer Kontrollgruppe verglichen, die sich aus Probanden zusammensetzt, die älter als 60 Jahre sind und bei einem Restzahnbestand von mindestens 20 Zähnen zeitlebens keine Parodontitis aufgewiesen haben. Dabei wird vorausgesetzt, da sie bis dato keine Parodontitis zeigen, der Erfahrung nach auch keine mehr entwickeln werden. Es wurden 111 Patienten in die Studie aufgenommen, auf die diese Kriterien zutreffen. Von diesen 111 Patienten konnten 75 Patienten in Abhängigkeit von Alter (CP:

3 Ergebnisse

57,45±8,302 Jahre, 60+: 67,45±5,406 Jahre), Geschlecht (34,7 % Männer) und Raucherstatus (0 % Raucher) an CP-Patienten angepasst werden. Alle Patienten sind Nichtraucher. Tabelle 3.5 zeigt das Studiendesign für den Vergleich von Patienten mit chronischer Parodontitis mit über 60-jährigen parodontal Gesunden.

Tabelle 3.5: Studiendesign CP versus 60-jährige parodontal Gesunde

	CP	60+*
<i>Anzahl (n)</i>	75	75
<i>Altersdurchschnitt (Jahre)</i>	57,45±8,302	67,45±5,406
<i>Skala (Jahre)</i>	59 – 81	40 – 75
<i>Männer (%)</i>	34,7	34,7
<i>Raucher (%)</i>	0	0

* über 60-jährige parodontal Gesunde

Es zeigte sich, dass vier Patienten mit chronischer Parodontitis (5,3 %) und zehn der über 60-jährigen parodontal Gesunden (13,3 %) den Arg753Gln-Polymorphismus aufweisen. Die Frequenz des Arg753Gln-Polymorphismus ist in der Gruppe der CP-Patienten geringer. Dies führte zu einer Odds Ratio von 0,3662, was den Trend zu bestätigen scheint. Das 95 % Konfidenzintervall umfasst Werte von 0,1095-1,225 und der p-Wert liegt bei 0,1587, womit keine statistische Signifikanz gegeben ist. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.6 dargestellt.

Tabelle 3.6: Arg753Gln-Polymorphismus bei CP-Patienten und über 60-jährigen parodontal Gesunden

	CP (n = 75)	60+“ (n = 75)
TLR2-Polymorphismus*	4 (5,3 %)	10 (13,3 %)
<i>Odds Ratio</i>		0,3662
<i>95% CI*</i>		0,1095-1,225
<i>p-Wert</i>		0,1587

*° 95 % Konfidenzintervall

“ über 60-jährige parodontal Gesunde

* Arg753Gln-Polymorphismus des TLR2-Gens

3.5 Hardy-Weinberg-Equilibrium

Zusätzlich wurden die Ergebnisse der Genotypisierung auf Übereinstimmung mit dem Gesetz nach Hardy-Weinberg überprüft. Der Mathematiker Hardy und der deutsche Biologe Weinberg haben unabhängig voneinander das sog. Hardy-Weinberg-Gesetz definiert: Es sagt aus, dass in einer so genannten idealen Population die prozentuale Häufigkeit, mit der bestimmte Allele im Genpool vertreten sind (=Allelhäufigkeit), über die Generationenfolge hinweg unverändert bleibt. Unter den Bedingungen einer idealen Population lassen sich nach einer definierten Formel die Frequenzen der jeweiligen Genotypen (Wildtyp, heterozygot, homozygot mutant) bestimmen. Aus diesem Grund vergleicht man die mittels des Gesetzes nach Hardy-Weinberg ermittelten Genotypfrequenzen (erwartet) mit den tatsächlich erhaltenen Genotypisierungsergebnissen (beobachtet). Im Idealfall sollten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Ergebnissen auftreten, so dass von einem Hardy-Weinberg-Equilibrium spricht.

Für die Berechnung der jeweiligen Genotypen nach Hardy-Weinberg wird folgende Formel verwendet:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

p = Häufigkeit Allel 1 (z.B. G2258)

q = Häufigkeit Allel 2 (z.B. A2258)

p² = Häufigkeit für Homozygotie hinsichtlich Allel 1 (z.B. GG)

2pq = Häufigkeit für Heterozygotie (z.B. GA)

q² = Häufigkeit für Homozygotie hinsichtlich Allel 2 (z.B. AA)

Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den erwarteten und tatsächlich beobachteten Ergebnissen der Genotypisierung für beide Polymorphismen, womit ein Hardy-Weinberg-Equilibrium vorausgesetzt werden kann (siehe Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7: Allel- und Genotypfrequenzen des Arg753Gln-Polymorphismus (G2258A) für Parodontitispatienten und Kontrollgruppe in Hinblick auf das Hardy-Weinberg-Equilibrium

	Allel	-häufigkeit (%)	Genotyp	-häufigkeit (%)	
				beobachtet	erwartet*
Total	G	97,21 %	GG	94,42 %	94,50 %
	A	2,79 %	GA	5,58 %	5,42 %
			AA	0	0,08 %
Kontroll- gruppe	G	95,43 %	GG	90,86 %	91,07 %
	A	4,57 %	GA	9,14 %	8,72 %
			AA	0	0,21 %

*nach dem Hardy-Weinberg-Equilibrium

3.6 Statistische Auswertung

In der Statistik besteht beim Testen von Hypothesen ein Fehler 1. Art darin, eine Nullhypothese zurückzuweisen, obwohl sie wahr ist (beruhend auf falsch-positiven Ergebnissen). Man nennt diesen Fehler auch α -Fehler. Mathematisch formuliert bezeichnet er die Wahrscheinlichkeit, dass die so genannte Null- bzw. Ausgangshypothese H_0 abgelehnt wird, obwohl sie richtig ist. Die Ausgangshypothese H_0 ist hierbei die Annahme, die Testsituation befinde sich im "Normalzustand", d.h. der TLR2-Polymorphismus Arg753Gln habe keinen Einfluss auf die Parodontitis. Wird also dieser "Normalzustand" nicht erkannt, obwohl er tatsächlich vorliegt, handelt es sich um einen Fehler 1. Art.

Die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Art wird bei der Berechnung von Signifikanzen als Irrtumswahrscheinlichkeit bezeichnet. Die bei einem Test bzw. einer Untersuchung akzeptierte Wahrscheinlichkeit, bei einer Entscheidung einen Fehler 1. Art zu begehen, nennt man auch Signifikanzniveau. In der Regel akzeptiert man ein α -Niveau von 5% (signifikant) oder 1% (sehr signifikant).

Im statistischen Testen von Hypothesen besteht ein Fehler 2. Art darin, eine Nullhypothese für wahr zu halten, obwohl in Wahrheit die Alternativhypothese korrekt ist (beruhend auf falsch negativen Ergebnissen). Man nennt diesen Fehler auch β -Fehler oder falsch negativ.

3.6.1 Power Analyse und Fallzahlschätzung

Power oder Teststärke beschreibt in der Statistik die Aussagekraft eines statistischen Tests oder auch einer medizinischen Studie. Die Teststärke gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Signifikanztest zugunsten einer spezifischen Alternativhypothese H_1 (der TLR2-Polymorphismus Arg753Gln hat einen Einfluss auf Parodontitis) entscheidet, falls diese richtig ist. Die abzulehnende Hypothese wird H_0 , die Nullhypothese genannt (der TLR2-Polymorphismus Arg753Gln hat keinen Einfluss

auf Parodontitis). Die Teststärke hat den Wert $1-\beta$, wobei β die Wahrscheinlichkeit bezeichnet, einen Fehler 2. Art zu begehen.

Tabelle 3.8: Poweranalyse bei gegebener Fallzahl (n) und Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$

	Fallzahl (n)	Power ($1-\beta$)
Total	197	0,27
CP	116	0,20
AP	81	0,13
CP vs. über 60	75	0,39

Für Wirksamkeitsstudien medizinischer Behandlungen wird für β ein 4-mal so hoher Wert wie für das Signifikanzniveau α vorgeschlagen. Wenn $\alpha = 5\%$ ist, sollte das β -Fehler-Niveau also 20% betragen. Liegt in einer Untersuchung die β -Fehler-Wahrscheinlichkeit (Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 2. Art) unter dieser 20%-Grenze, so ist die Teststärke ($1-\beta$) damit größer als 80%.

In der vorliegenden Studie liegt die Teststärke ($1-\beta$) (siehe Tabelle 3.8) für die Gruppe mit allen Parodontitispatienten (Total) bei 0,27 (27%), für die Gruppe mit chronischer Parodontitis (CP) bei 0,20 (20%), für die Gruppe mit aggressiver Parodontitis (AP) bei 0,13 (13%). Die Patientengruppe mit chronischer Parodontitis, die mit über 60-jährigen parodontal Gesunden verglichen wurde, weist eine Power von 0,39 (39%) auf. Demnach ist die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers 2. Art relativ hoch. Somit wird die Nullhypothese, also die Annahme, dass es keinen Unterschied in der Ausprägung des TLR2-Polymorphismus Arg753Gln zwischen Patienten- und Kontrollgruppe gibt, für richtig gehalten, obwohl eigentlich die Alternativhypothese wahr ist: es gibt einen Unterschied in der Ausprägung des TLR2-Polymorphismus Arg753Gln zwischen Patienten- und Kontrollgruppe.

Die Power ($1-\beta$) wird größer:

- mit wachsender Differenz von $\mu_0 - \mu_1$ (das bedeutet: ein großer Unterschied zwischen zwei Teilpopulationen wird seltener übersehen als ein kleiner Unterschied)
- mit kleiner werdender Merkmalsstreuung σ
- mit größer werdendem Signifikanzniveau α (sofern β nicht festgelegt ist)
- mit wachsendem Stichprobenumfang (da der Standardfehler dann kleiner wird).

Tabelle 3.9: Fallzahlschätzung bei gegebenem Signifikanzniveau $\alpha = 5\%$ und Power ($1-\beta$) = 80%

	Stichprobe (n)	Fallzahlschätzung
Total	197	844
CP	116	747
AP	81	963
CP vs. über 60	75	206

Für die oben genannten Gruppen wurde eine Fallzahlschätzung in Annahme von $\alpha = 5\%$ und $(1-\beta) = 80\%$ durchgeführt (siehe Tabelle 3.9). Dabei zeigte sich, dass man für das Kollektiv aller Parodontitispatienten (Total) statt einer Gruppenstärke von 197 Probanden in Patienten- wie Kontrollgruppe 844 Probanden bräuchte, um die Tendenz zur Alternativhypothese auch statistisch nachweisen zu können. Für die Gruppe mit chronischer Parodontitis (CP) wären 747 anstelle von 116, für die Gruppe mit aggressiver Parodontitis 963 statt 81 Probanden notwendig. Die Gruppen der Patienten mit chronischer Parodontitis und der über 60-jährigen parodontal Gesunden müssten 206 Teilnehmer umfassen [<http://www.charite.de/biometrie/de/index.html>].

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von Mutationen des TLR2-Gens auf Inzidenz und Verlauf der Parodontitis untersucht. In der Familie der Toll-like Rezeptoren ist TLR2 der Rezeptor, der die größte Vielfalt bakterieller Pathogene erkennt. Die TLR2-Aktivierung führt über MyD88-abhängige NF- κ B-Aktivierung zur Induktion von Zytokinen wie TNF- α , IFN- γ und anderer. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert die Expression zahlreicher Gene, die Immun- und Stressantwort, Entzündungsreaktion, Zelladhäsion und Schutz vor Apoptose kontrollieren. Diese spielen auch in der Pathogenese der Parodontitis eine Rolle. Parodontitis ist eine entzündlich bedingte Destruktion von Parodont, Desmodont und Alveolarknochen. Für die bekannten TLR2-Polymorphismen konnten Assoziationen mit verschiedenen Erkrankungen nachgewiesen werden. So scheint der Arg753Gln-Polymorphismus vermehrt bei Tuberkulose und atopischer Dermatitis aufzutreten und der Arg677Trp-Polymorphismus des TLR2-Gens bei Tuberkulose und Malaria.

4.1 Methode

4.1.1 Probandenauswahl und Klassifizierung

Auswahlkriterium für die vorliegende Studie ist das Vorliegen einer generalisierten chronischen oder aggressiven Parodontitis bei den Probanden. Es muss festgestellt werden, dass es zurzeit keine sicheren diagnostischen Hilfsmittel zur exakten Diagnosestellung und Klassifizierung der Parodontitis gibt und somit die Aufnahme von Patienten mit anderen Parodontitisformen im Einzelfall nicht ausgeschlossen werden kann. So stellten auch MOMBELLI ET AL. [2002] fest, dass die Zuordnung zu einer spezifischen Entität für viele Autoren immer noch problematisch sei. Der Begriff „adulte“ bzw. „early onset“ Parodontitis (alte Nomenklatur) werde weiterhin häufiger gebraucht als die jetzt korrekte Bezeichnung „chronische“ bzw. „aggressive“

Parodontitis. Grundsätzlich ist die Forderung nach einer syndrombezogenen Klassifikation erst dann gerechtfertigt, wenn alle pathogenetischen Vorgänge geklärt sind. Des Weiteren befindet sich die Nomenklatur zur Einteilung der parodontalen Erkrankungen in ständigem Umbruch, da neue Erkenntnisse zur Ätiologie, Epidemiologie, Therapie etc. Revisionen erforderlich machen. Dies erschwert zusätzlich den Vergleich verschiedener Studien [MOMBELLI ET AL., 2002].

Da die Definitionen der verschiedenen Parodontitisformen nach der American Academy of Periodontology [ARMITAGE, 1999] großen Spielraum lassen, schränkt jede Studiengruppe ihre Einschlusskriterien nach individuellen klinischen und anamnestischen Kriterien wie Knochenabbau, Sondierungstiefen aber auch Allgemeinerkrankungen ein. Auch für die vorliegende Studie wurden eigene, eindeutige Parameter festgelegt, die zur Diagnose chronische bzw. aggressive Parodontitis führten. Diese Parameter orientieren sich stark an der Definition von 1999 [ARMITAGE, 1999]. Es ist zu berücksichtigen, dass Messergebnisse der Taschensondierungstiefen unter verschiedenen Behandlern differieren können [ARMITAGE, 2003]. Im vorliegenden Fall wurde die klinische Untersuchung der Probanden von vier verschiedenen Behandlern durchgeführt.

Die für die Kontrollgruppe ausgewählten Probanden konnten nach der Befunderhebung eindeutig als gesund eingestuft werden. Man muss jedoch bedenken, dass es sich dabei nur um einen momentanen Zustand handeln kann. Die klinische Erfahrung zeigt, dass sich im weiteren zeitlichen Verlauf beim als gesund eingestuften Probanden doch noch eine profunde Parodontitis entwickeln kann. Der Patient würde dann fälschlicherweise als gesund eingestuft werden. Für diesen Fall wäre deshalb eine Verlaufskontrolle sinnvoll. Hier zeigt sich die Problematik der Nomenklatur, da es keinen sicheren histopathologischen Anhaltspunkt zur genauen Festlegung des Ausbruchzeitpunkts der Erkrankung gibt [MOMBELLI ET AL. 2002]. Um diesem Problem zu begegnen, wurde eine zusätzliche Kontrollgruppe rekrutiert. Bei diesen Patienten wird bei einem Restzahnbestand von mindestens 20 Zähnen und keinen klinischen Zeichen einer Parodontitis davon ausgegangen, dass sie im Weiteren auch keine Parodontitis mehr entwickeln werden. Zudem wurde bei dieser Kontrollgruppe

besonders darauf geachtet, dass sie keinen Risikofaktoren für Parodontitis ausgesetzt sind. So sind alle über 60-jährige parodontal Gesunden Nichtraucher.

Ein zusätzliches Problem bei der Auswahl der Probanden ergibt sich dadurch, dass einige anamnestische Angaben der Patienten nicht oder nur schwer überprüfbar sind. Hierzu zählen hauptsächlich Allgemeinerkrankungen, Medikamenteneinnahmen und Nikotinabusus. Gerade für Patienten mit Diabetes mellitus wurde für TypI als auch TypII eine erhöhte Anfälligkeit für Parodontitis und ein schwerer Krankheitsverlauf nachgewiesen [SALVI ET AL. 1997; KINANE, 1999]. Wichtig für die Studien könnte auch der verschwiegene Nikotinabusus der Probanden sein. Ein chronischer Nikotinabusus ist ebenfalls mit einem deutlich größeren Risiko für eine Erkrankung des Parodonts assoziiert [SALVI ET AL. 1997; KINANE, 1999]. Im Vergleich zu Nichtrauchern wurde ein 5-7 -fach höheres Risiko für die Manifestation einer Parodontalerkrankung festgestellt [PAGE ET AL. 1997]. Gerade bei Studien mit kleinen Untersuchungs- und Kontrollgruppen hat eine Inhomogenität der Studienkohorte große Auswirkungen auf die Ergebnisse. Da bei diesen Studien hochkomplexe Zusammenhänge untersucht werden, muss dringend versucht werden, solch störende Einflüsse zu vermeiden.

4.1.2 Polymorphismusbestimmung

Die in dieser Arbeit angegebene Methode der DNA-Gewinnung aus Wangenschleimhautabstrichen wurde in diversen Vorversuchen verlässlich etabliert. Die Bestimmung der TLR2-Polymorphismen mittels des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) erfolgte anhand des etablierten Protokolls von SCHRÖDER ET AL. [2003]. Mittlerweile besteht auch die Möglichkeit Polymorphismen mit Hilfe der „Light cyler“-Methode direkt nachzuweisen. Diese stellt eine schnellere Methode mit dem Nachteil größerer Störanfälligkeit und höherer Kosten dar [HAMANN ET AL., 2004]. Da wir durch die DNA-Gewinnung mittels Wangenschleimhautabstrichen ein limitiertes DNA-Angebot hatten, wurde die RFLP als Methode gewählt.

4.1.3 Grenzen genetischer Assoziationsstudien

Diverse Autoren weisen auf die Grenzen genetischer Assoziationsstudien hin. So zeigen TAYLOR ET AL. [2004], dass die bis dato durchgeführten Studien eine Vielzahl an Problemen aufweisen. Dazu zählt Mangel an statistischer Aussagekraft, der unter anderem auf zu kleine Populationen zurückzuführen ist. Des Weiteren gibt es variable Kriterien für die Diagnose der Parodontitis, wodurch der Vergleich von Studien erschwert wird. Weitere Schwierigkeiten entstehen bei der Identifikation einer Kontrollgruppe wegen der Variabilität der Diagnose „chronische Parodontitis“. Dies ist vor allem auf das interindividuell unterschiedliche Alter bei Krankheitsbeginn zurückzuführen [TAYLOR ET AL., 2004]. Demzufolge wäre die ideale Studie eine Longitudinalstudie, in der die Kontrollen genau definiert und an die Fälle angepasst werden. Bei Longitudinalstudien werden im Gegensatz zu Querschnittsstudien an mindestens zwei Zeitpunkten Daten erhoben, um zeitliche Zusammenhänge untersuchen und Veränderungen registrieren zu können. Querschnittsstudien haben den Nachteil, dass Änderungen bezüglich der Krankheitsschwere oder primär falsche Diagnose nicht mitberücksichtigt werden können, da nur einmalig Daten erhoben werden. Um diesen Problemen Rechnung zu tragen, haben wir ein Studiendesign gewählt, in dem sowohl Patienten- als auch Kontrollgruppe genau definiert und aneinander angepasst sind. Änderungen der Diagnose „chronische“ oder „aggressive“ Parodontitis wurden bis zum Studienende berücksichtigt.

Die Problematik der korrekten Interpretation der Ergebnisse wurde von KINANE UND HART [2003] angesprochen. Demnach sei eine Ursache-Effekt-Beziehung zwischen einem bestimmten genetischen Allel und einer Krankheit nicht möglich, da eine mathematische Assoziation nicht zwingend eine biologische oder physiologische bedeuten muss. Auch sie kommen auf die Fallzahl als entscheidenden Faktor zu sprechen. Nur so könne man in Fall-Kontroll-Studien nach Populations-Stratifikation aussagekräftige Allelfrequenzen erreichen. In Hinblick auf Parodontitis kamen sie zu dem Schluss, dass eine Anzahl an genetischen Defizienzen und genetischen Variationen in der Wirtsabwehr die Wahrscheinlichkeit der Parodontitis erhöhen

können, wenn mikrobielle Plaque die Möglichkeit hat sich in der gingivalen Zahnhalsregion anzusiedeln.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Einfluss von TLR2 auf Infektionen und andere Erkrankungen

In der Familie der Toll-like Rezeptoren erkennt TLR2 die größte Vielfalt an bakteriellen Pathogenen, einschließlich Lipoproteine und Lipopeptide verschiedener Bakterien und Zymosan [AKIRA, 2003]. Ist TLR4 als LPS-Rezeptor essentiell für die Erkennung Gram-negativer Bakterien, so ist TLR2 vor allem für die Erkennung Gram-positiver Bakterien verantwortlich [TAKEUCHI ET AL., 1999; AKIRA, 2000]. Zur Untersuchung des Einflusses der Ausprägung der Toll-like Rezeptoren auf Infektionen wurden sowohl Studien an Knockout-Mäusen als auch klinische Studien durchgeführt. Eine Übersicht zu Untersuchungen bezüglich des Einflusses der TLR2-Ausprägung auf verschiedene Erkrankungen gibt die Arbeit von SCHRÖDER UND SCHUMANN [2005].

In vivo Studien an Mäusen zeigten, dass TLR2- und MyD88-defiziente Mäuse hyporesponsiv in Bezug auf Zellwandbestandteile grampositiver Bakterien und PGN von *Staphylococcus aureus* [TAKEUCHI ET AL., 1999] und äußerst empfänglich für *Staphylococcus aureus*-Infektion sind [TAKEUCHI ET AL., 2000]. *Staphylococcus aureus* spielt in nosokomialen Infektionen, speziell der Sepsis, eine entscheidende Rolle. Exposition von *Staphylococcus aureus*-PGN beeinträchtigte die Zytokinantwort, Inokulation mit *Staphylococcus aureus* bewirkte eine erhöhte Mortalität der Knockout-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Neben PGN konnten in vitro-Studien an HEK293/CD14- und CHO-Zellen TLR2 außerdem als Rezeptor für LTA von *Staphylococcus aureus* bestätigen [SCHWANDNER ET AL., 1999; YOSHIMURA ET AL., 1999; SCHRÖDER ET AL., 2003]. Klinische Studien schienen zunächst einen Einfluss des Arg753Gln-Polymorphismus des TLR2-Gens auf Staphylokokkeninfektionen aufzuweisen [LORENZ ET AL., 2000]. Zwei von 91 Patienten mit septischem Schock waren heterozygot für den Arg753Gln-Polymorphismus, wobei beide eine

Staphylokokkeninfektion aufwiesen. In einer großen Fall-Kontroll-Studie konnte dieser Trend allerdings nicht bestätigt werden [MOORE ET AL., 2004]. Es wurde keine Assoziation zwischen dem Polymorphismus des TLR2-Gens und Morbidität oder Mortalität verursacht durch *Staphylococcus aureus* festgestellt. Der Mangel an Assoziation mit dem Arg753Gln-Polymorphismus ist aber insofern nachvollziehbar, als kürzlich in vitro anhand von *Staphylococcus aureus* LTA gezeigt werden konnte, dass die Präsenz nur eines Wildtyp-Allels für die vollständige Zytokinantwort genügt [VON AULOCK ET AL., 2004].

Verschiedene Autoren wiesen auf die mögliche Rolle von TLR2-vermittelter Zellaktivierung in der Abwehr von Pathogenen, die TLR2-Liganden enthalten, hin. TLR2 dient als Rezeptor für LTA von *Streptococcus pneumoniae* [YOSHIMURA ET AL., 1999; SCHRÖDER ET AL., 2003]. Bei TLR2-defizienten Mäusen zeigte sich eine erhöhte Empfänglichkeit für *Streptococcus pneumoniae* Meningitis, wobei der TLR2-Mangel mit früherem Tod assoziiert war. Dieser entstand nicht durch Sepsis, sondern ist auf ein vermindertes bakterielles Clearing des Gehirns mit anschließender intrathekaler Inflammation zurückzuführen [ECHCHANNAOUI ET AL., 2002]. Dies verdeutlicht die Bedeutung der TLR2-Liganden von Pneumokokken für die Induktion einer protektiven angeborenen Immunantwort bei Pneumokokken-Meningitis. Die gleichen Autoren konnten außerdem nachweisen, dass auch durch *Listeria monocytogenes* verursachte Meningitis zu einer erhöhten Mortalität in TLR2-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen führte. Einer weiteren Studie zufolge trat der TLR2-Polymorphismus Pro631His bei Patienten mit Meningitis seltener auf als bei den Kontrollen, welches man als einen Schutzmechanismus interpretieren könnte [SMIRNOVA ET AL., 2003].

TLR2 erkennt außerdem Bestandteile verschiedener anderer Bakterien, wie Treponemen, Borrelien, Leptospira, Legionellen und Neisserien [WETZLER, 2003]. *Borrelia burgdorferi* ist der Erreger der Lyme-Borreliose und wird durch Zecken übertragen. Lipoproteine von *Borrelia burgdorferi* rufen in humanen Zelllinien eine TLR2-vermittelte Immunantwort hervor [HIRSCHFELD ET AL., 1999], während Glycolipide dies nicht vermögen [SCHRÖDER ET AL., 2003]. Des Weiteren spielt TLR2 eine kritische Rolle in der Wirtsabwehr: infizierte TLR2-Knockout-Mäuse beherbergten bis zu 100-fach mehr Spirochäten im Gewebe als die Wildtyp-Mäuse [WOOTEN ET AL., 2002].

Die Unfähigkeit, die Spirochäten zu kontrollieren, ist allerdings nicht auf eine unzureichende erworbene Immunantwort zurückzuführen. Während die TLR2-vermittelten Signalwege eine entscheidende Rolle in der angeborenen Immunantwort auf *Borrelia burgdorferi* spielen, sind Inflammation und Ausprägung einer erworbenen humoralen Antwort auch in der Abwesenheit von TLR2 möglich [WOOTEN ET AL., 2002]. Die angeborene Abwehr von *Borrelia burgdorferi* ist also durch TLR2-Mangel stärker beeinträchtigt als die erworbene Abwehr. Es wurde nachgewiesen, dass der Arg753Gln-Polymorphismus im Vergleich zum Wildtyp-TLR2-Gen eine verminderte Reaktionsfähigkeit auf bakterielle Peptide von *Borrelia burgdorferi* und *Treponema pallidum* mit sich bringt [LORENZ ET AL., 2000]. Zudem zeigten SCHRÖDER ET AL. [2005] kürzlich, dass der heterozygote Arg753Gln-Polymorphismus des humanen TLR2-Gens die Immunantwort auf *Borrelia burgdorferi* einschränkt und somit einen Schutz vor dem späten Stadium der Lyme-Borreliose darstellt, was auf reduzierte Signalmöglichkeiten via TLR2/TLR1 zurückzuführen sein könnte [SCHRÖDER ET AL., 2005]. Die TNF α - und IF γ -Induktion durch *Borrelia*-Lysate war in heterozygoten TLR2-Mäusen und humanen Blutproben vermindert. Patienten mit Lyme-Borreliose zeigten eine signifikant niedrigere Frequenz des Arg753Gln-Polymorphismus im Vergleich zu angepassten Kontrollen, vor allem in späten Stadien. Eine weitere Studie konnte den vorherrschenden Einfluss von TLR2-vermittelter Signaltransduktion in durch Zellwandbestandteile von Streptokokken verursachten Gelenkentzündungen nachweisen [JOOSTEN ET AL., 2003]. TLR2- und MyD88-defiziente Mäuse waren unfähig, Gelenkschwellung oder Inhibition der Knorpelmatrixsynthese zu entwickeln.

Auch *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae*, Zellwandbestandteile wie auch vollständige Bakterien, gehören zu den TLR2-Liganden [UNDERHILL ET AL., 1999; MEANS ET AL., 1999]. Da für die beiden TLR2-SNPs, Arg753Gln und Arg677Trp, ein erhöhtes Vorkommen bei Tuberkulose-Patienten in der Türkei bzw. Tunesien gefunden wurden, nimmt man an, dass diese Polymorphismen einen Risikofaktor für Tuberkulose darstellen könnten [OGUS ET AL., 2004; BEN-ALI ET AL., 2004]. TLR2 ist aber nicht alleiniger Rezeptor für *Mycobacterium tuberculosis*, auch TLR4 spielt vermutlich eine Rolle [MEANS ET AL., 1999; FREMOND ET AL., 2004]. Studien mit *Mycobacterium tuberculosis*-Aerosolen an TLR2-, TLR4- und CD14-defizienten Mäusen zeigten, dass nur TLR2-Knockout-Mäuse einen verminderten Widerstand

gegen Tuberkulose nach einer hochdosierten Exposition aufwiesen [REILING ET AL., 2002]. TLR2-defiziente Mäuse haben eine reduzierte bakterielle Clearance nach Exposition zu mycobakteriellem Aerosol, sind unfähig eine effektive granulomatöse Antwort auszubilden und entwickeln trotz einer ausgeprägten pulmonalen Immunantwort eine chronische, letale Pneumonie [DRENNAN ET AL., 2004]. Der Arg677Trp-Polymorphismus wurde zudem auch vermehrt in Asien bei Patienten mit lepromatöser Lepra beobachtet [KANG UND CHAE, 2001]. Von 45 untersuchten Patienten waren zehn für diesen SNP heterozygot, während der SNP bei keinem Patienten mit tuberkulöser Lepra oder gesundem Probanden gefunden wurde. Die angeborene Immunantwort der Monozyten gegen *Mycobacterium leprae* ist TLR2-vermittelt. So sind Monozyten mit einer TLR2-Polymorphismen nicht in der Lage auf *Mycobacterium leprae* zu reagieren und die Patienten weisen einen geringeren IL-12-Level auf [KANG ET AL., 2002; BOCHUD ET AL., 2003; KANG ET AL., 2004]. Allerdings konnte der Arg677Trp-Polymorphismus bisher nicht bei Kaukasiern nachgewiesen werden [SCHRÖDER ET AL., 2003] und scheint auch in einer koreanischen Population nicht ausschlaggebend für lepromatöse Lepra zu sein [MALHORTA ET AL., 2005]. Demnach sei er kein wahrer Polymorphismus des TLR2-Gens, sondern resultiere aus einer Variation, die in 93% der homolog duplizierten Region des TLR2 Exons 3, ungefähr 23 kb aufwärts, vorliegt, und die Assoziation beruhe auf einem unspezifischen Primer [MALHORTA ET AL., 2005].

Weiter sei noch auf den Einfluss von TLR2 auf Atherosklerose hingewiesen [SCHONEVELD ET AL., 2005; TOBIAS UND CURTISS, 2005]. Die Applikation von TLR2-Liganden in vivo führt zu einer Augmentation der Neointima und regt die arterielle Plaqueformation an. Demzufolge scheint TLR2-Stimulation eine Intima-Hyperplasie und die Entwicklung einer atherosklerotischen Läsion zu induzieren [SCHONEVELD ET AL., 2005]. HAMANN ET AL. [2005] konnten zeigen, dass der Arg753Gln-Polymorphismus ein Risikofaktor für koronare Restenose darstellt. Patienten mit Restenose wiesen eine signifikant höhere Frequenz des TLR2-Polymorphismus auf als Patienten ohne Restenose, wohingegen für TLR4-SNPs kein Unterschied festgestellt werden konnte [HAMANN ET AL., 2005]. Bei Kindern wurde eine starke Assoziation des Arg753Gln-Polymorphismus mit akutem rheumatischem Fieber festgestellt [BERDELI ET AL., 2005].

So war die Polymorphismusfrequenz bei Kindern mit rheumatischem Fieber signifikant höher.

Der synthetische TLR2-Ligand Pam₃Cys führt zu einer Aktivierung von APCs mit anschließender Ausschüttung von Th2-assoziierten Zytokinen. Dies ist der Grund, weshalb ein Einfluss des TLR2 auf Asthma angenommen wird [REDECKE ET AL., 2004]. Bei der Untersuchung von Kindern mit Asthma wurde eine Assoziation des SNP TLR2/-16 934 im TLR2-Promoter mit Asthma nachgewiesen, wahrscheinlich aufgrund eines protektiven Effektes der TLR2-Expression [YANG ET AL., 2004]. Dies wurde später mittels einer großen Studie bestätigt, die TLR2/-16 934 als entscheidendes Gen für Asthma in europäischen Bauernkindern nachwies [EDER ET AL., 2004]. Zum atopischen Formenkreis gehört neben Asthma auch die atopische Dermatitis. Patienten, die das Arg753Gln-Allel tragen, wiesen einen ausgeprägten Phänotyp auf, der durch schwere bis moderate atopische Dermatitis charakterisiert ist [AHMAD-NEJAD ET AL., 2004].

4.2.2 Mit Parodontitis assoziierte Polymorphismen

IL-1 und TNF α gehören zu den proinflammatorischen Zytokinen, die als direkte Reaktion auf Gewebeschädigung oder die Anwesenheit von infektiösen Keimen freigesetzt werden [SANDERINK ET AL., 2004]. Die erste Studie zum Einfluss von IL-1-Polymorphismen wurde von KORNMAN ET AL. [1997] durchgeführt. Sie konnten eine Assoziation der „Single Nucleotid Polymorphismen“ (SNPs) in den Genen, die für IL-1 α (-889) und IL-1 β (+3953) codieren, mit einem signifikant häufigeren Auftreten marginaler Parodontopathien feststellen. In weiteren klinischen Studien konnten diese Ergebnisse jedoch nur für Patienten bestätigt werden, die einen regelmäßigen Nikotinkonsum aufweisen. Der spezifische Genotyp des polymorphen IL-1 Gen-Clusters war nur in Rauchern mit der Schwere der Parodontitis assoziiert und unterschied Patienten mit schwerer Parodontitis von solchen mit einem milden klinischen Erscheinungsbild. Funktionell besteht dieser spezifische Parodontitis-assoziierte IL-1-Genotyp aus einer Variante des IL-1 β -Gens, die eine erhöhte IL-1-

Produktion hervorruft [POCIOT ET AL., 1992]. Nach KINANE UND HART [2003] gibt es vier mögliche Interpretationen von positiven Assoziationen: das assoziierte Allel selbst ist das prädisponierende Allel für die Erkrankung, das assoziierte Allel steht in einem „Linkage Disequilibrium“ mit dem tatsächlichen ausschlaggebenden Allel der Krankheit, die Assoziation ist auf eine Populationsstratifizierung zurückzuführen oder die Assoziation ist ein statistisches Artefakt. „Linkage“ bedeutet, dass benachbarte Genloci dazu neigen gemeinsam von Generation zu Generation weitergegeben zu werden. KINANE UND HART [2003] kamen zu dem Schluss, dass der Einfluss des zusammengesetzten IL-1-Genotyps auf aggressive Parodontitis eher irrelevant sei und auf chronische Parodontitis, wenn überhaupt, dann in einem „Linkage Disequilibrium“ bestünde. Wahrscheinlich sei der Polymorphismus einer unter vielen, die das genetische Risiko für chronische Parodontitis mitbestimmen. Da die Prävalenz des Polymorphismus von Gruppe zu Gruppe variiert, ist er nur in genau definierten Gruppen als Marker zu gebrauchen. Außerdem müsse die funktionelle Signifikanz dieses Polymorphismus noch bestätigt werden, wie auch der klinische Nutzen noch etwas voreilig ist [KINANE UND HART, 2003]. In einer japanischen Population wurde eine Assoziation von TNF α -Polymorphismen mit schwerer Erwachsenenparodontitis festgestellt, allerdings anders als in kaukasischen Populationen kein Einfluss von IL-1 β [SOGA ET AL., 2003]. In unseren Breitengraden scheinen die TNF α -SNPs allerdings keine Auswirkung auf das Parodontitis-Risiko zu haben [KINANE UND HART, 2003; DONATI ET AL., 2005].

IL-10 ist ein Mediator der immunvermittelten Entzündung und aktiviert nach Freigabe durch T-Zellen unspezifische Effektorzellen der Entzündung [SANDERINK ET AL., 2004]. Der IL-10-Gen Promoter-Polymorphismus ist mit chronischer [SCAREL-CARMINAGA ET AL., 2004] aber nicht mit aggressiver Parodontitis assoziiert [KINANE UND HART, 2003]. Fc γ -Rezeptoren auf unterschiedlichen Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) binden IgG und sind damit entscheidend für die Opsonierung von Bakterien. Die Expression von Fc γ -Rezeptoren durch Fresszellen ermöglicht die rasche Phagozytose von Immunkomplexen und somit die schnelle Eliminierung von unerwünschten Antigenen aus dem Körper [SANDERINK ET AL., 2004]. Studien aus Japan, Europa und den USA vermuten eine Assoziation der Fc γ RIIIa und Fc γ RIIIb Allele mit aggressiver als auch chronischer Parodontitis, wobei diese Allele aber in einem „Linkage Disequilibrium“ mit

dem tatsächlich verantwortlichen Gen stehen könnten [KINANE UND HART, 2003]. Auch IgG2-Level und Allotypen der leichten und schweren Ketten haben einen Einfluss auf die Immunantwort und sind mit den verschiedenen Formen der Parodontitis assoziiert [KINANE UND HART, 2003]. CD14, als der Korezeptor der Toll-like Rezeptoren bei der Erkennung von bakteriellen PAMPs, zeigte in einer schwedischen Population Assoziation mit chronischer Parodontitis [DONATI ET AL., 2005].

Zusammengefasst scheint sich der Einfluss von Polymorphismen auf das multifaktorielle Krankheitsbild der Parodontitis eher modulierend auszuwirken. Dabei nimmt der IL-1-Gen-Cluster zurzeit die wichtigste Rolle ein und dies vor allem bei Rauchern.

4.2.3 Der Einfluss des Arg753Gln-Polymorphismus auf die Inzidenz der Parodontitis

Zunächst wurde in der hier vorliegenden Studie geprüft, ob das Auftreten einer der beiden TLR2-Polymorphismen, Arg677Trp bzw. Arg753Gln, mit der Inzidenz der Parodontitis assoziiert ist. Dazu wurden 197 Patienten mit Parodontitis sowie 197 gesunde Kontrollpatienten rekrutiert. Der Arg677Trp-Polymorphismus des TLR2-Gens konnte bei keinem der teilnehmenden Probanden festgestellt werden, was mit anderen Studien übereinstimmt, die in unseren Breitengraden durchgeführt wurden [LORENZ ET AL., 2000; SCHRÖDER ET AL., 2003; FOLWACZNY ET AL., 2004; MOORE ET AL., 2004]. Das Auftreten dieses Polymorphismus scheint vielmehr auf den asiatischen und afrikanischen Raum beschränkt zu sein und könnte zudem, wie oben beschrieben, durch die Existenz eines Pseudogens hervorgerufen sein [KANG UND CHAE, 2001; BEN-ALI ET AL., 2004; MALHORTA ET AL., 2005]. Für den Arg753Gln-Polymorphismus wird in der Literatur eine Häufigkeit von 3 – 9,4 % angegeben [LORENZ ET AL., 2000; SCHRÖDER ET AL., 2003]. In der vorliegenden Untersuchung kam der Arg753Gln-Polymorphismus insgesamt bei 29 von 394 Probanden vor, die alle heterozygote Allelträger waren. Das entspricht 7,4 % und ist somit im genannten Bereich. Von den Polymorphismusträgern wiesen elf das klinische Erscheinungsbild einer Parodontitis

auf, während die anderen 18 zu der gesunden Kontrollgruppe zählten. Die statistische Prüfung mittels bedingter logistischer Regression ergab für das Auftreten des Arg753Gln-Polymorphismus des TLR2-Gens eine adjustierte Odds Ratio von 0,588. Dies scheint zunächst auf ein geringeres Risiko hinzuweisen. Das hieße, der Polymorphismus hätte eine protektive Wirkung in Hinblick auf die Inzidenz der Parodontitis. Dieser Schutz könnte auf die fehlende Signaltransduktion durch die defekten Rezeptoren zurückzuführen sein, wodurch es zu einer verminderten Wirtsabwehr käme. Dies hätte wiederum zur Folge, dass die autogene Gewebedestruktion mittels Enzymen, wie Kollagenasen, und Zytokinen ein geringeres Ausmaß annehmen würde. Auch bei Lyme-Borreliose konnte eine protektive Wirkung des Arg753Gln-Polymorphismus nachgewiesen werden, die auf eine verminderte Signaltransduktion des funktionsuntüchtigen TLR2/TLR1-Heterodimers zurückgeführt wird [SCHRÖDER ET AL., 2005]. Betrachtet man in der vorliegenden Studie allerdings das 95% Konfidenzintervall, so wird durch die Reichweite von 0,238 bis 1,248 deutlich, dass hier in dieser Studie aufgrund der begrenzten Patientenzahl noch keine statistische Signifikanz vorliegt. Allerdings zeigte die Poweranalyse, dass dies an einem Fehler 2. Art, also falsch negativen Ergebnissen, liegen könnte. Für einen weiteren Polymorphismus des TLR2-Gens, Pro631His, wurde bei Patienten mit Meningokokken-Infektion eine geringere Prävalenz festgestellt als in der dazugehörigen Kontrollgruppe [SMIRNOVA ET AL., 2003]. Auch der Arg753Gln-Polymorphismus zeigte den Trend zu geringeren Frequenzen in dieser Patientengruppe. Um diesen Trend zu bestätigen, wäre eine groß angelegte Studie mit 844 Probanden in Patienten- und Kontrollgruppe erforderlich.

Interessanterweise lieferten die in einer parallelen Studie untersuchten TLR4-Polymorphismen positive Ergebnisse (adjustierte Odds Ratio: 2,836, 95% Konfidenzintervall: 1,394-6,222) [SCHRÖDER et al., 2005]. Im Gegensatz zum Arg753Gln-Polymorphismus zeigten die beiden TLR4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile eine höhere Frequenz in der Gruppe der Parodontitis-Patienten. Demnach scheinen die TLR4-Polymorphismen ein Risiko für die Inzidenz der Parodontitis darzustellen. Eine andere Gruppe fand im Gegensatz zu diesen Ergebnissen in ihrer Patientengruppe keinen signifikanten Unterschied für das Vorliegen der oben genannten TLR4-Polymorphismen in chronischer Parodontitis vor

[LAINE ET AL, 2005]. Die Gründe für die widersprüchlichen Ergebnisse dieser beiden Studien sind momentan noch nicht klar.

4.2.4 Der Einfluss des Arg753Gln-Polymorphismus auf den Verlauf der Parodontitis

Die Gruppe der Parodontitis-Patienten konnte gemäß ihrem klinischen Erscheinungsbild in 116 Patienten mit chronischer Parodontitis und 81 Patienten mit aggressiver Parodontitis unterteilt werden [ARMITAGE, 1999]. Wie für die gesamte Gruppe der Parodontitis-Patienten zeigten auch die Untergruppen für chronische und aggressive Parodontitis eine gewisse Tendenz zu niedrigeren Frequenzen des Arg753Gln-Polymorphismus als die jeweiligen Kontrollgruppen. Auch hier kann man wieder den Arg753Gln-Polymorphismus als Schutzmechanismus in der Pathogenese der Parodontitis annehmen. Diese Tendenz konnte statistisch jedoch ebenfalls nicht belegt werden, sollte aber Grundlage für zukünftige größere Untersuchungen sein. Die Fallzahlschätzung ergab für die Gruppe mit chronischer Parodontitis eine anzustrebende Gruppenstärke von 747 Probanden und für die Gruppe mit aggressiver Parodontitis von 963 Probanden.

Zusätzlich wurden noch Patienten mit chronischer Parodontitis mit über 60-jährigen parodontal Gesunden verglichen. Bei dieser Kontrollgruppe wird bei einem Restzahnbestand von mindestens 20 Zähnen und dem Fehlen klinischer Zeichen einer Parodontitis davon ausgegangen, dass sie im Weiteren auch keine Parodontitis mehr entwickeln werden. Alle Probanden dieser Gruppe sind Nichtraucher. Wie auch im Vergleich der CP-Patienten insgesamt zeichnete sich die Tendenz hin zu einer geringeren Prävalenz des Arg753Gln-Polymorphismus in der Patientengruppe ab, die statistisch nicht belegt werden konnte. Ergebnisse einer kürzlich im Münchener Raum durchgeführten Studie konnten ebenfalls keine Assoziation zwischen chronischer Parodontitis und dem Arg753Gln-Polymorphismus feststellen [FOLWACZNY et al., 2004].

4.2.5 Der Einfluss des Arg753Gln-Polymorphismus auf Inzidenz und Verlauf der Parodontitis in Abhängigkeit vom Raucherstatus

Sowohl für die Gruppe der Raucher als auch der Nichtraucher konnte der Trend zu niedrigeren Frequenzen in der Gruppe der Parodontitis-Patienten nachgewiesen werden, der sich schon bei Betrachtung der gesamten Gruppe ergab. Die Aufschlüsselung nach chronischer und aggressiver Parodontitis ergab allerdings geringfügig andere Ergebnisse. So zeigte sich die Tendenz zu geringerer Prävalenz des Arg753Gln-Polymorphismus nur bei den Rauchern, wohingegen in der Gruppe der Nichtraucher kein Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen festgestellt werden konnte. Bei aggressiver Parodontitis hingegen konnte diese Tendenz nur in der Gruppe der Nichtraucher beobachtet werden. Raucher zeigten keinen Unterschied. Man muss allerdings beachten, dass durch die weitere Unterteilung die Gruppen kleiner werden und damit die Aussagekraft weiter abnimmt.

4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Der Arg753Gln-Polymorphismus scheint eine protektive Wirkung im Geschehen der Parodontitis zu haben. Zusammenfassend ist zu vermerken, dass sich in allen Parodontitis-Gruppen ein Trend zu niedrigerer Prävalenz des Arg753Gln-Polymorphismus des TLR2-Gens abzeichnete. Bei CP tritt er aber nur bei Rauchern und bei AP nur bei Nichtrauchern zutage. Die Ergebnisse der Gruppe mit über 60-jährigen parodontal Gesunden als Kontrollgruppe unterstützen diesen Trend. Man könnte also annehmen, dass das Vorliegen des Arg753Gln-Polymorphismus einen Schutzmechanismus darstellt, ähnlich wie bei der Lyme-Borreliose. Allerdings ist dies ein Trend, der sich in der statistischen Auswertung bisher nicht beweisen lässt. Die so genannte Power-Analyse stellt fest, ob bei festgestellter Nicht-Signifikanz eine ausreichend große Stichprobe für diese Berechnung zur Verfügung stand. Um diese Tendenz zu bestätigen wäre es notwendig, eine größer angelegte Studie durchzuführen. Die Power-Analyse ergab, dass jede Gruppe, also die Gruppen der

Patienten mit chronischer wie aggressiver Parodontitis als auch die der gesunden Kontrollpatienten, aus knapp 1000 Patienten bestehen müsste [<http://www.charite.de/biometrie/de/index.html>].

5 Zusammenfassung

Das Immunsystem kann durch exogene aber auch endogene Faktoren aktiviert werden. Dabei unterscheidet man ein angeborenes, unspezifisches, und ein erworbenes, spezifisches System. Die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLRs) stellt einen wichtigen Bestandteil der angeborenen Immunantwort dar. Als „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs) sind sie an der Erkennung von „Pathogen Associated Molecular Patterns“ (PAMPs) beteiligt. Sie führen zur Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen, die unter anderem an „Dendritic Cell“ (DC)-Reifung und Ausbildung einer TH1-Antwort beteiligt sind. Darüber können sie auch Einfluss auf das adaptive Immunsystem nehmen. TLR2 ist einer der wichtigsten TLRs, da er die größte Vielfalt bakterieller PAMPs erkennt, zu denen unter anderem Lipoproteine und Lipopeptide Gram-positiver Bakterien, Bestandteile von Mycobakterien und Mycoplasmen sowie atypisches LPS von *Porphyromonas gingivalis* gehören. TLR2 ist kein eigenständiger Rezeptor sondern bildet Heterodimere mit TLR1 bzw. TLR6. TLR2/TLR1 ist für die Erkennung triacylierter und TLR2/TLR6 für die Erkennung diacylierter Lipoproteine verantwortlich. Die Signaltransduktion ist MyD88-abhängig und führt zur Expression proinflammatorischer Zytokine. Für das TLR2-Gen wurden diverse Polymorphismen beschrieben. Der Arg677Trp-Polymorphismus scheint ein Risiko für Tuberkulose und Lepra darzustellen. Allerdings spielt er in unseren Breitengraden wohl keine Rolle und frühere Ergebnisse könnten durch die Existenz eines Pseudogens verfälscht sein. Er konnte in dieser Studie entsprechend auch nicht nachgewiesen werden. Der Arg753Gln-Polymorphismus ist vermutlich ebenfalls ein Risikofaktor für Tuberkulose und für koronare Restenose, stellt aber einen Schutzmechanismus bei Lyme-Borreliose dar, der auf die verminderten Signalmöglichkeiten des TLR2/TLR1-Heterodimers zurückgeführt wird.

Parodontitis ist ein multifaktorielles Geschehen, auf das neben Mundhygiene, bakterieller Flora, Rauchen, Systemerkrankungen und emotionalem Stress auch genetische Faktoren einen Einfluss haben. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss des Arg677Trp- und des Arg753Gln-Polymorphismus des TLR2-Gens auf Inzidenz und Verlauf der Parodontitis untersucht. Dafür wurden an Parodontitis

erkrankte Patienten mit in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Raucherstatus angepassten Kontrollen verglichen. Die Gruppen wurden des Weiteren noch in die Untergruppen chronische und aggressive Parodontitis sowie nach Rauchern bzw. Nichtrauchern aufgeteilt. Bisherige genetische Assoziationsstudien konnten lediglich einen Einfluss des IL-1-Gen-Clusters nachweisen und dies auch nur in der Kombination mit Rauchen. Anders als der IL-1-Gen-Cluster, der bei Rauchern ein Risiko darstellt, scheint sich der Arg753Gln-Polymorphismus des TLR2-Gens eher protektiv auszuwirken und dies unabhängig vom Raucherstatus. So wiesen die Patienten mit Parodontitis - gesamte, chronische wie auch aggressive Parodontitis - einen Trend zu geringeren Frequenzen des Arg753Gln-Polymorphismus auf als die gesunden Kontrollen. Für diese Tendenz konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Um diesen Trend zu bestätigen, müsste eine weitaus größere Studiengruppe untersucht werden, die knapp 1000 Probanden in jeder Gruppe umfassen sollte. Man geht derzeit eher von einem modulierenden als von einem ausschlaggebenden Einfluss genetischer Polymorphismen aus, was durch die hier vorliegende Studie zum Teil unterstützt wird und durch eine größere Studie bewiesen werden sollte.

Literaturverzeichnis

Abe T, Hara Y, Aono M:

Penetration, clearance and retention of antigen en route from the gingival sulcus to the draining lymph node of rats

J Periodont Res, 1991; 26: 429-439

Ahmad-Nejad P, Mrabet-Dahbi S, Breuer K, Klotz M, Werfel T, Herz U, Heeg K, Neumaier M, Renz H:

The Toll-like receptor 2 R753Q polymorphism defines a subgroup of patients with atopic dermatitis having severe phenotype

J Allergy Clin Immunol, 2004; 113(3): 565-567

Akira S:

Toll-like receptors: lessons from knockout mice

Biochemical Society Transactions, 2000; 28(5): 551-556

Akira S:

Mammalian Toll-like receptors

Current Opinion in Immunology, 2003; 155-11

Akira S, Takeda K:

Toll-like receptor signalling

Nat Rev Immunol, 2004; 4: 499-511

Akira S, Takeda K, Kaisho T:

Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity

Nature Immunology, 2001; 2(8): 675-680

Alexopoulou L, Thomas V, Schnare M, Labet Y, Anguita J, Schoen RT, Medzhitov R, Fikrig E, Flavell RA:

Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice

Nature Medicine, 2002; 8(8): 878-884

Aliprantis AO, Weiss DS, Radolf JD, Zychlinsky A:

Release of Toll-like Receptor-2-Activating Bacterial Lipoproteins in *Shigella flexneri* Culture Supernatants

Infection and Immunity, 2001; 69(10): 6248-6255

- Aliprantis AO, Yang R, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A:
The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2
EMBO Journal, 2000; 19(13): 3325-3336
- Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N:
Variations of Porphyromonas gingivalis fimbriae in relation to microbial pathogenesis
J Periodontol Res, 2004; 39: 136-142
- Anderson KV:
Toll signaling pathways in the innate immune response
Current Opinion in Immunology, 2000; 12: 13-19
- Anderson KV, Nüsslein-Volhard C:
Information for the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo is stored as maternal mRNA
Nature, 1984; 311(5983): 223-227
- Arbibe L, Mira J, Teusch N, Kline L, Guha M, Mackman N, Godowski PJ, Ulevitch RJ, Knaus UG:
Toll-like receptor 2-mediated NF- κ B activation requires a Rac1-dependent pathway
Nature Immunology, 2000; 1(6): 533-540
- Argueta JGM, Shiota S, Yamaguchi N, Masuhiro Y, Hanazawa S:
Induction of Porphyromonas gingivalis GroEL signaling via binding to Toll-like receptors 2 and 4
Oral Microbiol Immunol, 2006; 21: 245–251
- Armitage GC:
Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions
Ann Periodontol, 1999; 4(1): 1-6
- Armitage GC:
Diagnosis of periodontal diseases
J Periodontol, 2003; 74(8): 1237-1247
- Asai Y, Hashimoto M, Fletcher HM, Miyake K, Akira S, Ogawa T:
Lipopolysaccharide Preparation Extracted from Porphyromonas gingivalis Lipoprotein-Deficient Mutant Shows a Marked Decrease in Toll-like receptor 2-Mediated Signaling
Infection and Immunity, 2005; 73(4): 2157-2163

Asai Y, Hashimoto M, Ogawa T:

Treponemal glycoconjugate inhibits Toll-like receptor ligand-induced cell activation by blocking LPS-binding protein and CD14 functions

Eur J Immunol, 2003; 33: 3196-3204

Asai Y, Jinno T, Ogawa T:

Oral Treponemes and Their Outer Membrane Extracts Activate Human Gingival Epithelial Cells through Toll-like receptor 2

Infection and Immunity, 2003; 71(2): 717-725

Asai Y, Ohoyama Y, Ogawa T:

Bacterial Fimbriae and their peptides activate human gingival epithelial cells through Toll-like receptor 2

Infect Immun, 2001; 69(12): 7387-7395

Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Baré O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK:

Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular HSP70

The Journal of Biological Chemistry, 2002; 277(17): 15028-15034

Bainbridge BW, Coats SR, Darveau RP:

Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide Displays Functionally Diverse Interactions With the Innate Host Defense System

Ann Periodontol, 2002; 7: 29-37

Ben-Ali M, Barbouche M, Bousnina S, Chabbou A, Dellagi K:

Toll-like Receptor 2 Arg677Trp Polymorphism Is Associated with Susceptibility to Tuberculosis in Tunesian Patients

Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2004; 11(3): 625-626

Berdeli A, Celik HA, Özyürek R, Dogrusoz B, Aydin HH:

TLR-2 gene Arg753Gln polymorphism is strongly associated with rheumatic fever in children

J Mol Med, 2005; 83: 535-541

Beutler B:

The Toll-like receptors: Analysis by forward genetic methods

Immunogenetics, 2005; 1-8

Bochud PY, Hawn TR, Arerem A:

Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling

J Immunol, 2003; 170(7): 3451-3454

Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang R, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL:

Host Defense Mechanisms Triggered by Microbial Lipoproteins Through Toll-like Receptors
Science, 1999; 285: 732-736

Bulut Y, Faure E, Thomas L, Equils O, Arditi M:

Cooperation of Toll-like Receptor 2 and 6 for Cellular Activation by Soluble Tuberculosis Factor and *Borrelia burgdorferi* Outer Surface Protein A Lipoprotein: Role of Toll-Interacting Protein and IL-1 Receptor Signaling Molecules in Toll-like Receptor 2 Signaling

Journal of Immunology, 2001; 167: 987-994

Campos MAS, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente AP, Procópio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT:

Activation of Toll-like Receptor-2 by Glycosylphosphatidylinositol Anchors from a Protozoan Parasite

Journal of Immunology, 2001; 167: 416-423

Coats SR, Reife RA, Bainbridge BW, Pham TT, Darveau RP:

Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide antagonizes *Escherichia coli* lipopolysaccharide at Toll-like receptor 4 in human endothelial cells

Infect Immun, 2003; 71:6799-6807

Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW:

Human Cytomegalovirus Activates Inflammatory Cytokine Responses via CD14 and Toll-like Receptor 2

Journal of Virology, 2003; 77(8): 4588-4596

Darveau RP, Pham TT, Lamley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, Howald WN, Way SS, Hajjar AM:

Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide Contains Multiple Lipid A Species That Functionally Interact with Both Toll-Like Receptor 2 and 4

Infection and Immunity, 2004; 72(9): 5041-5051

Darveau RP, Tanner A, Page RC:

The microbial challenge in periodontitis

Periodontology 2000, 1997; 14: 12-32

Dennison DK, Van Dyke TE:

The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease

Periodontology 2000, 1997; 14: 54-78

Dixon DR, Bainbridge BW, Darveau RP:

Modulation of the innate immune response within the periodontium

Periodontology 2000, 2004; 35: 53-74

Donati M, Berglundh T, Hytönen A, Hahn-Zoric M, Hanson L, Padyukov L:

Association of the -159 CD14 gene polymorphism and lack of association of the -308 TNF α and Q551R IL-4RA polymorphism with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians
J Clin Periodontol, 2005; 32: 474-479

Drennan MB, Nicolle D, Quesniaux VJ, Jakobs M, Allie N, Mpagi J, Fremont C, Wagner H, Kirschning C, Ryffel B:

Toll-like receptor 2- deficient mice succumb to Mycobacterium tuberculosis infection

Am J Pathol; 2004; 164(1): 49-57

Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, Leib SL, Zimmerli W, Landmann R:

Toll-like Receptor 2-Deficient Mice Are Highly Susceptible to Streptococcus pneumoniae Meningitis because of Reduced Bacterial Clearing and Enhanced Inflammation

Journal of Infectious Diseases, 2002; 186: 798-806

Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C, Nowak D, Martinez FD, ALEX Study Team:

Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European children

J Allergy Clin Immunol, 2004; 113(3): 482-468

Ellen RP, Galimanas VB:

Spirochetes at the forefront of periodontal infections

Periodontology 2000, 2005; 38: 13-32

Flemmig TF:

Periodontitis

Ann Periodontol, 1999; 4(1): 32-37

- Flo TH, Halaas O, Torp S, Ryan L, Lien E, Dybdahl B, Sundan A, Espevik T:
Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells
J Leukoc Biol, 2001; 69: 474-481
- Flo TH, Ryan L, Latz E, Takeuchi O, Monks BG, Lien E, Halaas O, Akira S, Skjak-Braek G, Golenbock DT, Espvik T:
Involvement of Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR4 in Cell Activation by Mannuronic Acid Polymers
Journal of Biological Chemistry, 2002; 277(38): 35489-35495
- Folwaczny M, Glas J, Torok HP, Limbersky O, Folwaczny C:
Toll-like receptor (TLR) 2 and 4 mutations in periodontal disease
Clin Exp Immunol, 2004; 135(2): 330-335
- Fremont CM, Yeremeev V, Nicolle DM, Jacobs M, Quesniaux VF, Ryffle B:
Fatal Mycobacterium tuberculosis infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88
Journal of Clinical Investigation, 2004; 114(12): 1790-1799
- Girard R, Pedron T, Uematsu S, Balloy V, Chignard M, Akira S, Chaby R:
Lipopolysaccharides from Legionella and Rhizobium stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2
Journal of Cell Science, 2003; 116: 293-302
- Hajishengallis G, Genco RJ:
Downregulation of the DNA-Binding Activity of Nuclear Factor- κ B p65 Subunit in Porphyromonas gingivalis Fimbria-Induced Tolerance
Infection and Immunity, 2004; 72(2): 1188-1191
- Hajishengallis G, Tapping RI, Harokopakis E, Nishiyama S, Ratti P, Schifferle RE, Lyle EA, Triantafilou M, Triantafilou K, Yoshimura F:
Differential interactions of fimbriae and lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis with the Toll-like receptor 2-centred pattern recognition apparatus
Cellular Microbiology, 2006; 8(10): 1557–1570
- Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, Aderem A, Klebanoff SJ, Wilson CB:
Cutting Edge: Functional Interactions Between Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in Response to Phenol-Soluble Modulin
Journal of Immunology, 2001; 166: 15-19

Hamann L, Gomma A, Schröder NJW, Stamme C, Glaeser C, Schulz S, Gross M, Anker SD, Fox K, Schumann RR:

A frequent toll-like receptor (TLR)-2 polymorphism is a risk factor for coronary restenosis
J Mol Med, 2005; 83: 478-485

Hamann L, Hamprecht A, Gomma A, Schumann RR:

Rapid and inexpensive real-time PCR for genotyping functional polymorphisms within the Toll-like receptor-2, -4, and -9 genes

Journal of Immunological Methods, 2004; 285: 281-291

Harokopakis E, Albrecht MH, Martin MH, Hajishengallis G:

TLR2 Transmodulates Monocyte Adhesion and Transmigration via Rac1- and PI3K-Mediated Inside-Out Signaling in Response to Porphyromonas gingivalis Fimbriae

The Journal of Immunology, 2006; 176: 7645–7656

Hashimoto M, Asai Y, Ogawa T:

Separation and structural analysis of lipoprotein in a lipopolysaccharide preparation from Porphyromonas gingivalis

International Immunology, 2004; 16(10): 1431-1437

Hatakeyama J, Tamai R, Sugiyama A, Akashi S, Sugawara S, Takada H:

Contrasting responses of human gingival and periodontal ligament fibroblasts to bacterial cell surface components through the CD14/Toll-like receptor system

Oral Microbiol Immunol, 2003; 18(1): 14-23

Hertz CJ, Kiertcher SM, Godowski PJ, Bouis DA, Norgard MV, Roth MD, Modlin RL:

Microbial Lipopeptides Stimulate Dendritic Cell Maturation Via Toll-like Receptor 2

Journal of Immunology, 2001; 166: 2444-2450

Hiramane H, Watanabe K, Hamada N, Umemoto T:

Porphyromonas gingivalis 67-kDa fimbriae induced cytokine production and osteoclast differentiation utilizing TLR2

FEMS Microbiology Letters, 2003; 229: 49-55

Hirschfeld M, Kirschning CJ, Schwandner R, Wesche H, Weis JH, Wooten RM,

Weis JJ:

Cutting Edge: Inflammatory Signaling by Borrelia burgdorferi Lipoproteins Is Mediated by Toll-like Receptor 2

Journal of Immunology, 1999; 163: 2382-2386

Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ:

Cutting Edge: Repurification of Lipopolysaccharide Eliminates Signaling Through Both Human and Murine Toll-like Receptor 2

Journal of Immunology, 2000; 165: 618-622

Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, Qureshi N, Michalek SM, Vogel SN:

Signaling by toll-like Receptor 2 und 4 Agonists Results in Differential Gene Expression in Murine Macrophages

Infection and Immunity, 2001; 69(3): 1477-1482

Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Corzat K, Sorvat s, Hartung T, Zahringer U, Beutler B:

CD36 is a sensor of diacylglycerides

Nature, 2005; 433(7025): 523-527

Holt SC, Ebersole JL:

Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis

Periodontology 2000, 2005; 38: 72-122

Hou L, Sasaki H, Stashenko P:

Toll-like Receptor 4-Deficient Mice Have Reduced Bone Destruction following Mixed Anaerobic Infection

Infection and Immunity, 2000; 68(8): 4681-4687

Imler JL, Hoffmann JA:

Toll receptors in innate immunity

Trends Cell Biol, 2001; 11(7): 304-311

Ingalls RR, Lien E, Golenbock CT:

Membrane-Associated Proteins of a Lipopolysaccharide-Deficient Mutant of Neisseria meningitidis Activate the Inflammatory Response through Toll-like Receptor 2

Infection and Immunity, 2001; 69(4): 2230-2236

Ishikawa I, Nakashima K, Koseki T, Nagasawa T, Watanabe H, Arakawa S, Nitta H, Nishihara T:

Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis

Periodontology 2000, 1997; 14: 79-111

Janeway CA Jr:

Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology

Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989; 54(1): 1-13

Janeway Jr CA, Medzhitov R:

Innate Immune Recognition

Annu Rev Immunol, 2002; 20: 197-216

Jepsen S, Glüer CC:

Osteoporose als Risikoindikator für Parodontitis

Deutsche Gesellschaft für Parodontologie: Risikokompodium Parodontitis

Berlin, Quintessenz-Verlag, 2002; 43-46

Joosten LAB, Koenders MI, Smeets RL, Heuvelmans-Jacobs M, Helsen MMA, Takeda K, Akira S, Lubberts E, van de Loo FJA, van den Berg WB:

Toll-like Receptor 2 Pathway Drives Streptococcal Cell Wall-Induced Joint Inflammation: Critical Role of Myeloid Differentiation Factor 88

Journal of Immunology, 2003; 171: 6145-6153

Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Bazan F, Liu Y:

Subsets of Human Dendritic Cell Precursors Express Different Toll-like Receptors and Respond to Different Microbial Antigens

J Exp Med, 2001; 194(6): 863-869

Kaneko T, Silverman N:

Bacterial recognition and signalling by the Drosophila IMD pathway

Cellular Microbiology, 2005; 7(4): 461-469

Kang TJ, Lee S, Chae G:

A polymorphism in the Toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy

Cytokine, 2002; 20(2): 56-62

Kang TJ, Yeum CE, Kim BC, You E, Chae G:

Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation

Immunology, 2004; 112: 674-680

Kang TJ, Chae GT:

Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutations in the lepromatous leprosy patients

FEMS Immunology and Med Microbiol, 2001; 31(1): 53-58

Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S:

Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin

Immunity, 1999; 11: 115-122

Kawai T, Akira S:

Pathogen recognition with Toll-like receptors

Current Opinion in Immunology, 2005; 17: 338-344

Kinane DF:

Periodontitis Modified by Systemic Factors

Ann Periodontol, 1999; 4(1): 54-63

Kinane DF, Hart TC:

Genes and Gene Polymorphisms Associated with Periodontal Disease

Crit Rev Oral Biol Med, 2003; 14(6): 430-449

Kirschning CJ, Wesche H, Ayres TM, Rothe M:

Human Toll-like Receptor 2 Confers Responsiveness to Bacterial Lipopolysaccharide

JEM J Exp Med, 1998; 188(11): 2091-2097

Kornman KS, Page RC, Tonetti MS:

The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players

Periodontology 2000, 1997; 14: 33-53

Kumada H, Haishima Y, Umemoto T, Tanamoto K:

Structural Study on the Free Lipid A Isolated from Lipopolysaccharide of Porphyromonas gingivalis

Journal of Bacteriology, 1995; 2098-2106

Kurt-Jones EA, Chan M, Zhou S, Wang J, Reed G, Bronson R, Arnold MM, Knipe DM, Finberg RW:

Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis
PNAS, 2004; 101(5): 1315-1320

Laine ML, Morre SA, Murillo LS, van Winkelhoff AJ, Pena AS:

CD14 and TLR4 gene polymorphisms in adult periodontitis
J Dent Res, 2005; 84(11): 1042-1046

Lang N, Bartold PM, Cullinan M, Jeffcoat M, Mombelli A, Marukami S, Page R Papapanou P, Tonetti M, Van Dyke T:

Consensus Report: Aggressive Periodontitis
Ann Periodontol, 1999; 4(1): 53

Lee H, Lee J, Tobias PS:

Two Lipoproteins Extracted from Escherichia coli K-12 LCD25 Lipopolysaccharide Are the Major Components Responsible for Toll-like Receptor 2-Mediated Signaling
Journal of Immunology, 2002; 168: 4012-4017

Lemaitre B:

The road to Toll
Nature Reviews, 2004; 4: 521-527

Lien E, Dellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carrol D, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT:

Toll-like Receptor 2 Function as a Pattern Recognition Receptor for Diverse Bacterial Products
J Biol Chem, 1999; 274(47): 33419-33425

Lindhe J, Ranney R, Lamster I, Charles A, Chung CP Flemmig T, Kinane DF, Listgarten M, L e H, Schoor R, Seymour G, Somerman M:

Consensus Report: Chronic Periodontitis
Ann Periodontol; 1999; 4(1): 38

Listgarten MA:

The structure of dental plaque
Periodontology 2000, 1994; 5: 52-65

Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA:

A Novel Polymorphism in the Toll-like Receptor 2 Gene and Its Potential Association with Staphylococcal Infection

Infection and Immunity, 2000; 68(11): 6398-6401

Malhorta D, Relhan V, Reddy BNS, Bamezai R:

TLR2 Arg677Trp polymorphism in leprosy: revisited

Hum Genet, 2005; 116: 413-415

Martin M, Katz J, Vogel SN, Michalek SM:

Differential induction of endotoxin tolerance by lipopolysaccharides derived from Porphyromonas gingivalis and Escherichia coli

J Immunol, 2001; 167: 5278-5285

Massari P, Henneke P, Ho Y, Latz E, Golenbock DT, Wetzler LM:

Cutting Edge: Immune Stimulation by Neisserial Porins Is Toll-like Receptor 2 and MyD88 Dependent

Journal of Immunology, 2002; 168: 1533-1537

Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ:

The biology of Toll-like receptors

Cytokine and Growth Factor Reviews, 2000; 11: 219-232

Means TK, Jones BW, Schromm AB, Shertleff BA, Smith JA, Keane J, Golenbock DT, Vogel SN, Fenton MJ:

Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage responses

J Immunol, 2001; 166(6): 4074-4082

Means TK, Lien E, Yoshimura A, Wang S, Golenbock DT, Fenton MJ:

The CD14 ligands Lipoarabinomannan and Lipopolysaccharide Differ in Their Requirement for Toll-like Receptors

J of Imm, 1999; 163: 6748-6755

Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ:

Human Toll-like Receptors Mediate Cellular Activation by Mycobacterium tuberculosis

J of Imm, 1999; 163: 3920-3927

Medzhitov R:

Toll-like Receptors and Innate Immunity

Nature Reviews Imm, 2001; 1; 135-145

Medzhitov R, Janeway CA Jr:

Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition

Cell, 1997; 91: 295-298

Medzhitov R, Janeway CA Jr:

The Toll receptor family and microbial recognition

Trends Microbiol, 2000; 8(10): 452-456

Medzhitov R, Janeway CA Jr:

Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System

Science, 2002; 296: 298-300

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr:

A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity

Nature, 1997; 388(6640): 394-397

Michelsen KS, Aicher A, Mohaupt M, Hartung T, Dimmler S, Kirschning CJ, Schumann RR:

The Role of Toll-like Receptors (TLRs) in Bacteria-induced Maturation of Murin Dendritic Cells (DCs) - Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2

Journal of Biolog Chem, 2001; 276(28): 25680-25686

Mombelli A, Casagni F, Madianos PN:

Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis?

J Clin Periodontol, 2002; 29(3): 10-21

Moore WEC, Moore LVH:

The bacteria of periodontal diseases

Periodontology 2000, 1994; 5: 66-77

Moore CE, Segal S, Berendt AR, Hill AVS, Day NPJ:

Lack of Association between Toll-like Receptor 2 Polymorphisms and Susceptibility to Severe Disease Caused by Staphylococcus aureus

Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2004; 11(6): 1194-1197

Mori Y, Yoshimura A, Ukai T, Lien E, Espevik T, Hara Y:

Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis

Oral Microbiol Immunol, 2003; 18(1): 54-58

Morrison LA:

The Toll of herpes simplex virus infection

TRENDS in Microbiology, 2004; 12(8): 353-356

Moter A, Hoenig C, Choi B, Riep B, Göbel UB:

Molecular Epidemiology of Oral Treponemes Associated with Periodontal Disease

Journal of Clinical Microbiology, 1998; 36(5): 1399-1403

Müller HP:

Tabakkonsum und destruktive Parodontalerkrankungen - Chancen der Raucherentwöhnung

Deutsche Gesellschaft für Parodontologie: Risikokompandium Parodontitis

Berlin, Quintessenz-Verlag, 2002; 17-26

Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinalli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A:

Differential Expression and Regulation of Toll-like Receptors (TLR) in Human Leukocytes:

Selective Expression of TLR3 in Dendritic Cells

Journal of Immunology, 2000; 164: 5998-6004

Muzio M, Polentarutti N, Bosisio D, Prahladan MKP, Mantovani A:

Toll-like receptors: a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by different leukocytes

J Leukoc Biol, 2000; 67: 450-456

Nakata T, Yasuda M, Fujita M, Kataoka H, Kiura K, Sano H, Shibata H

CD14 directly binds to triacylated lipopeptides and facilitates recognition of the lipopeptides by the receptor complex of Toll-like receptors 2 and 1 without binding to the complex

Cellular Microbiology, 2006; 1-11

Netea MG, Van der Graaf C, Van der Meer JWM, Kullberg BJ:

Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors

Eur J Microbiol Infect Dis, 2004; 23: 672-676

Nishihara T, Koseki T:

Microbial etiology of periodontitis

Periodontology, 2004; 36: 14-26

Nociti FH Jr, Foster BL, Barros SP, Darveau RP, Somerman MJ:

Cementoblast Gene Expression is Regulated by Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide Partially via Toll-like Receptor-4/MD-2

J Dent Res, 2004; 83(8): 602-607

Ogawa T:

Chemical structure of lipid A from Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis lipopolysaccharide
FEBS 13114, 1993;332(1,2): 197-201

Ogawa T, Asai Y, Hashimoto M, Takeuchi O, Kurita T, Yoshikai Y, Miyake K, Akira S:

Cell activation by Porphyromonas gingivalis lipid A molecule through Toll-like receptor 4- and myeloid differentiation factor 88-dependent signaling pathway

Int Immunol, 2002; 14(11): 1325-1332

Ogawa t, Asai Y, Hashimoto M, Uchida H:

Bacterial fimbriae activate human peripheral blood monocytes utilizing TLR2, CD14 and CD11a/CD18 as cellular receptors

Eur J Immunol, 2002; 32: 2543-2550

Ogus AC, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, Olcen S, Keser I, Coskun M, Cilli A, Yegin O:

The Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease
Eur Respir J, 2004; 23: 219-223

Opitz B, Schröder NW, Spreitzer I, Michelsen KS, Kirschning CJ, Hallatschek W, Zahnring U, Hartung T, Göbel UB, Schumann RR:

Toll-like receptor-2 mediates Treponema glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF-kappa B translocation

J Biol Chem, 2001; 276(25): 22041-22047

Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A:

The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors

PNAS, 2000; 97(25): 13766-13771

Page RC, Kornman KS:

The pathogenesis of human periodontitis: an introduction

Periodontology 2000, 1997; 14: 9-11

Page RC, Offenbacher S, Schröder HE, Seymour GJ, Kornman KS:

Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions

Periodontology 2000, 1997; 14: 216-248

Pasare C, Medzhitov R:

Toll-like receptors and acquired immunity

Seminars in Immunology, 2004; 16: 23-26

Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J:

A Taq I polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro

Eur J Clin Invest, 1999; 222(6): 396-402

Redecke V, Häcker H, Datta SK, Fermin A, Pitha PM, Broide DH, Raz E:

Cutting Edge: Activation of Toll-like Receptor 2 Induces a Th2 Immune Response and Promotes Experimental Asthma

Journal of Immunology, 2004; 172: 2739-2743

Reiling N, Holscher C, Fehrenbach A, Kroger S, Kirschning CJ, Goyert S, Ehlers S:

Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4- mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with Mycobacterium tuberculosis

J Immunol, 2002; 169(7): 3480-3484

Reynolds JJ, Meikle MC:

Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis

Periodontology 2000, 1997; 14: 144-157

Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF:

A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll

Proc Natl Acad Sci USA, 1998; 95: 588-593

Ropert C, Ferreire LRP, Campos MAS, Procópio DO, Travassos LR, Ferguson MAJ, Reis LFL, Teixeira MM, Almeida IC, Gazzinelli RT:

Macrophage signaling by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins derived from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes

Microbes and Infection, 2002; 2: 1015-1025

Rüdiger S:

Abgelaufene Parodontitisprogression und Keimspezifität als Risikoprädiktoren der Parodontitis

Deutsche Gesellschaft für Parodontologie: Risikokompandium Parodontitis

Berlin, Quintessenz-Verlag, 2002; 27-36

Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MKB, Dower SK:

Toll-like Receptor (TLR)2 and TLR4 in Human Peripheral Blood Granulocytes: A Critical Role for Monocytes in Leukocyte Lipopolysaccharide Responses

Journal of Immunology, 2002; 168: 4701-4710

Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD:

Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis

Periodontology 2000, 1997; 14: 173-201

Sanderink RBA, Bernhardt H, Knoke M, Meyer J, Weber C, Weiger R:

Orale Mikrobiologie und Immunologie

1.Auflage, Berlin, Quintessenz Verlags-GmbH, 2004

Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Camargo LEA, Line SRP:

Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis

J Clin Periodontol, 2004, 31: 443-448

Schiött CR, Loe H:

The origin and variation in number of leucocytes in the human saliva

J Periodontol Res, 1970; 5: 36-41

Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R:

Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses

Nature Immunology, 2001; 2(10): 947-950

Schoneveld AH, Oude Nijhuis MM, van Middelaar B, Laman JD, de Kleijn DPV, Pasterkamp G:

Toll-like receptor 2 stimulation induces intimal hyperplasia and atherosclerotic lesion development

Cardiovascular Research, 2005; 66: 162-169

Schröder NJW, Diterich I, Zinke A, Eckert J, Draing C, v. Baehr V, Hassler D, Priem S, Hahn K, Michelsen KS, Hartung T, Burmester GR, Göbel UB, Hermann C, Schumann RR:

Heterozygous Arg753Gln Polymorphism of Human TLR-2 Impairs Immune Activation by *Borrelia burgdorferi* and Protects from Late Stage Lyme Disease

The Journal of Immunology, 2005; 175: 2534-2540

Schröder NWJ, Heine H, Alexander C, Manukyan M, Eckert J, Hamann L, Göbel UB, Schumann RR:

Lipopolysaccharide Binding Protein Binds to Triacylated and Diacylated Lipopeptides and Mediates Innate Immune Responses

Journal of Immunology, 2004; 173: 2683-2691

Schröder NW, Hermann C, Hamann L, Göbel UB, Hartung T, Schumann RR:

High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR

J Mol Med, 2003; 81(6): 368-372

Schröder NWJ, Meister D, Wolff V, Cristan C, Kaner D, Purucker P, Hermann C, Moter A, Göbel UB, Schumann RR:

Chronic periodontal disease is associated with single nucleotide polymorphisms of the human TLR-4 gene

Genes and Immunity, 2005; 1-4

Schröder NWJ, Morath S, Alexander C, Hamann L, Hartung T, Zähringer U, Göbel UB, Weber JR, Schumann RR:

Lipoteichoic Acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* Activates Immune Cells via Toll-like Receptor (TLR-2), Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 Are Not Involved

Journal of Biological Chemistry, 2003; 278(18): 15587-15594

Schröder NWJ, Opitz B, Lamping N, Michelsen KS, Zähringer U, Göbel UB, Schumann RR:
Involvement of Lipopolysaccharide Binding Protein, CD14, and Toll-like Receptors in the
Initiation of Innate Immune Responses by *Treponema* Glycolipids
Journal of Immunology, 2000; 165: 2683-2693

Schröder NWJ, Schombel U, Heine H, Göbel UB, Zähringer U, Schumann RR:
Acylated Cholesteryl Galactoside as a Novel Immunogenic Motif in *Borrelia burgdorferi* *Sensu*
Stricto
Journal of Biological Chemistry, 2003; 36: 33645-33653

Schröder NWJ, Schumann RR:
Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease
Lancet Infect Dis, 2005; 5: 156-164

Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ:
Peptidoglycan- and Lipoteichoic Acid-induced Cell Activation Is Mediated by Toll-like
Receptor 2
J of Biol Chem, 1999; 274(25): 17406-17409

Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD:
Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis
Periodontology 2000, 1997; 14: 158-172

Sculean A, Jepsen S:
Diabetes mellitus als Risikofaktor für Parodontitis
Deutsche Gesellschaft für Parodontologie: Risikokompandium Parodontitis
Berlin, Quintessenz-Verlag, 2002; 7-16

Smirnova I, Mann N, Dols A, Derkx HH, Hibberd ML, Levin M, Beutler B:
Assay of locus-specific genetic load implicates rare Toll-like receptor 4 mutations in
meningococcal susceptibility
Proc Natl Acad Sci USA, 2003; 100(10): 6075-6080

Socransky SS, Haffajee AD:
Evidence of bacterial etiology: a historical perspective
Periodontology 2000, 1994; 5: 7-25

Socransky SS, Haffajee AD:
Periodontal microbial ecology
Periodontology 2000, 2005; 38: 135-187

- Soga Y, Nishimura F, Ohyama H, Maeda H, Takashiba S, Murayama Y:
Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF-alpha) -1 β 31/-863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese
J Clin Periodontol, 2003; 30: 524-531
- Sugawara Y, Uehara A, Fujimoto Y, Kusumoto S, Fukase K, Shibata K, Sugawara S, Sasano T, Takada H:
Toll-like Receptors, NOD1, and NOD2 in Oral Epithelial Cells
J Dent Res 85(6):524-529, 2006
- Sugawara S, Yang S, Iki K, Hatakeyama J, Tamai R, Takeuchi O, Akashi S, Espevik T, Akira S, Takada H:
Monocytic Cell Activation by Nonendocytic Glycoprotein from *Prevotella intermedia* ATCC 25611 Is Mediated by Toll-like Receptor 2
Infection and Immunity, 2001; 69(8): 4951-4957
- Tabeta K, Yamazaki K, Akashi S, Miyake K, Kumada H, Umemoto T, Yoshie H:
Toll-like Receptors Confer Responsiveness to Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in Human Gingival Fibroblasts
Infection and Immunity, 2000; 68(6): 3731-3735
- Takami M, Kim N, Rho J, Choi Y:
Stimulation by Toll-Like Receptors Inhibits Osteoclast Differentiation
Journal of Immunology, 2002; 169: 1516-1523
- Takeuchi O, Akira S:
Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system
International Immunopharmacology, 2001; 1: 625-635
- Takeda K, Akira S:
Toll receptors and pathogen resistance
Cellular Microbiology, 2003; 5(3): 143-153
- Takeda K, Kaisho T, Akira S:
Toll-like Receptors
Annu Rev Immunol, 2003; 21: 335-376

Takeuchi O, Hoshino K, Akira S:

Cutting Edge: TLR2-Deficient and MyD88-Deficient Mice Are Highly Susceptible to Staphylococcus aureus Infection

Journal of Immunology, 2001; 65: 5392-5396

Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S:

Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components

Immunity, 1999; 11: 443-451

Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Mühlradt PF, Akira S:

Cutting Edge: Preferentially the R-Stereoisomer of the Mycoplasmal Lipopeptide Macrophage-Activating Lipopeptide-2 Activates Immune Cells through a Toll-like Receptor 2- and MyD88-Dependent Signaling Pathway

Journal of Immunology, 2000; 164: 554-557

Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K,

Akira S:

Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6

International Immunology, 2001; 13(7): 933-940

Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S:

Cutting Edge: Role of Toll-like Receptor 1 in Mediating Immune Response to Microbial Lipoproteins

Journal of Immunology, 2002; 169: 10-14

Taylor JJ, Preshaw PM, Donaldson PT:

Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease

Periodontology 2000, 2004; 35: 158-182

Texereau J, Chiche JD, Taylor W, Choukroun G, Comba B, Mira JP:

The Importance of Toll-like Receptor 2 Polymorphisms in Severe Infections

Clinical Infectious Disease, 2005; 41: 408-415

Thoma-Uszynski S, Kiertscher SM, Ochoa MT, Bouis DA, Norgard MV, Miyake K, Gosowski PJ, Roth MD, Modlin RL:

Activation of Toll-like Receptor 2 on Human Dendritic Cells Triggers Induction of IL-12, But Not IL-10

Journal of Immunology, 2000; 165: 3804-3810

Tobias P, Curtiss LK:

Paying the price for pathogen protection: toll receptors in atherogenesis

J Lipid Res, 2005; 46(3): 404-411

Tsan M, Gao B:

Endogenous ligands of Toll-like receptors

J Leukoc Biol, 2004; 76: 514-519

Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A:

The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens

Nature, 1999; 401: 811-815

Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A:

Toll-like receptor-2 mediates mycobacterial-induced proinflammatory signaling in macrophages

PNAS, 1999; 96(25): 14459-14463

Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Häcker H, Wagner H:

Endocytosed HSP60s Use Toll-like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 to Activate the Toll/Interleukin-1 Receptor Signalling Pathway in Innate Immune Cells

Journal of Biological Chemistry, 2001; 276(33): 31332-31339

Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H:

HSP70 as Endogenous Stimulus of the Toll/Interleukin-1 Receptor Signal Pathway

Journal of Biological Chemistry, 2002; 277(17): 15107-15112

Viau M, Zouali M:

B-lymphocytes, innate immunity, and autoimmunity

Clinical Immunology, 2005; 114: 17-26

von Aulock S, Schröder NWJ, Traub S, Gueinzus K, Lorenz E, Hartung T, Schumann RR, Hermann C:

Heterozygous Toll-like Receptor 2 Polymorphism Does Not Affect Lipoteichoic Acid-Induced Chemokine and Inflammatory Responses

Infection and Immunity, 2004; 72(3): 1828-1831

Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang T, Kravchenko V, Girons IS, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ:

Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism
Nature Immunology, 2001; 2(4): 346-352

Wetzler LM:

The role of Toll-like receptor 2 in microbial disease and immunity
Vaccine, 2003; 21: S2/55-S2/60

Wooten RM, Ma Y, Yoder RA, Brown JP, Weis JH, Zachary JF, Kirschning CJ, Weis JJ:
Toll-like Receptor 2 Is Required for Innate, But Not Acquired, Host Defense to *Borrelia burgdorferi*

Journal of Immunology, 2002; 168: 348-355

Yamamoto M, Takeda K, Akira S:

TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signalling
Molecular Immunology, 2004; 40: 861-868

Yang IA, Barton SJ, Rorke S, Cakebread JA, Keith TP, Clough JB, Holgate ST, Holloway JW:
Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics
Genes Immun, 2004; 5(1): 41-45

Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AL, Godowski PJ:

Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling
Nature, 1998; 395: 284-288

Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D:

Cutting Edge: Recognition of Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components by the Innate Immune System Occurs Via toll-Like Receptor 2
Journal of Immunology, 1999; 163: 1-5

Yoshimura A, Kaneko T, Kato Y, Golenbock DT, Hara Y:

Lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* are antagonists for human Toll-like receptor 4
Infect Immun, 2002; 70:218-225

Zarembler KA, Godowski PJ:

Tissue Expression of Human Toll-like-Receptors and Differential Regulation of Toll-like Receptor mRNAs in Leukocytes in Response to Microbes, Their Products, and Cytokines
Journal of Immunology, 2002; 168: 554-561

Zhou Q, Desta T, Fenton M, Graves DT, Amar S:

Cytokine Profiling of Macrophages Exposed to Porphyromonas gingivalis, Its Lipopolysaccharide, or Its FimA Protein
Infection and Immunity, 2005; 73(2): 935-943

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Ralf R. Schumann dafür danken, dass er mir dieses Thema für meine vorliegende Dissertation zur Verfügung stellte. Besonderer Dank geht auch an das gesamte Team der AG Schumann, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen: Dr. Nicolas W.J. Schröder, Sabine Bobbe und Fränzi. Nicht zu vergessen Daniela Meister, mit der ich die Höhen und Tiefen der Promotionszeit zusammen durchgestanden habe.

Auch der Abteilung für Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin sei für die Unterstützung während Planung und Probensammeln gedankt, v.a. Dr. Dogan Kaner und Dr. Peter Purucker, des weiteren den externen Probensammlern Dr. Heidi Prinz, Dr. Amir Rezaei und natürlich Daniela Meister und meinen Eltern.

Und zu guter Letzt noch ein großes Dankeschön an meine Korrektoren Katja Diercke und Theodor Thiele, sowie an meine Familie und Freunde für ihre Unterstützung.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Valeska Julia Wolff, erkläre an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Thema „Untersuchung des Einflusses von Mutationen des Toll-like Rezeptors 2 auf die Inzidenz und den Verlauf von Parodontalerkrankungen“ von mir persönlich ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar.

Die Arbeit dieser Dissertation wurde von mir selbst im Labor von Herrn Prof. Dr. Ralf R. Schumann, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Charité der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt.

Die benutzten Hilfsmittel sowie Literatur sind vollständig angegeben.

Valeska Julia Wolff