

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

DISSERTATION

Untersuchung des Einflusses von genetischen Polymorphismen des
Toll-like-Rezeptors 4 auf Risiko/Prävalenz und Manifestation
entzündlicher Parodontalerkrankungen

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae dentariae

(Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Daniela Meister

geb. in Hoyerswerda

Dekan: Prof. Dr. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. R.R. Schumann
2. Prof. Dr. N. Suttorp
3. PD Dr. F. Mockenhaupt

Datum der Promotion: 30.01.2009

Zusammenfassung:

Parodontale Erkrankungen sind gekennzeichnet durch einen entzündungsbedingten Abbau der zahntragenden Gewebe. Neben der Lockerung und dem Verlust von Zähnen als Folge müssen auch mögliche Konsequenzen für den Gesamtorganismus durch die komplexen chronischen Entzündungsprozesse in Betracht gezogen werden. Der Entstehung und Manifestation der Parodontitis liegen Wechselwirkungen verschiedenster mikrobiologischer und wirtsspezifischer Faktoren zu Grunde. Dabei haben angeborene Immunvorgänge eine zentrale Bedeutung. Die Gruppe der Toll-like-Rezeptoren ist für die Erkennung mikrobiologischer Strukturen essentiell. Das LPS einiger Gram-negativer Parodontalkeime führt via Toll-like-Rezeptor 4 zur Induktion pro-inflammatorischer Zytokine, z.B. des IL-1 und des TNF- α , die mit der Aggravation der Entzündung assoziiert sind. In der hier beschriebenen Fall-Kontroll-Studie sollte die Rolle der TLR4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile als Parodontitisrisikofaktoren untersucht werden.

Um den Genotyp eines Probanden zu bestimmen, wurde die Restriktionsfragment-Längenspolymorphismus-Analyse (RFLP) verwendet. Es erfolgte jeweils ein Abstrich der Wangenschleimhaut, anschließend die Extraktion der DNA, deren Amplifizierung durch Polymerase-Kettenreaktion und ein Verdau mit Restriktionsendonukleasen. Die Daten von 197 Parodontitispatienten gingen in die statistische Auswertung ein, von denen 116 der Gruppe mit chronischer Parodontitis und 81 der Gruppe mit aggressiver Parodontitis angehörten. Homozygote Träger der untersuchten Merkmale wurden nicht gefunden. In der CP-Gruppe war die Frequenz des kombinierten Haplotyps Asp299Gly/Thr399Ile gegenüber der gematchten Kontrollgruppe signifikant erhöht (OR 3,124; KI {1,633 bis 5,976}; p-Wert 0,0005). Bei isolierter Betrachtung der 74 Nichtraucher mit CP ergibt sich ebenso eine signifikante Assoziation: OR 4,45; KI {1,4 bis 14,14}; p-Wert 0,0123. Diese wurde auch beim Vergleich mit einer speziellen Kontrollgruppe von über 60-jährigen parodontal Gesunden gefunden (OR 4,814; KI {1,526; 15,19}, p-Wert 0,007). Für die AP-Gruppe konnte keine signifikante Beziehung gefunden werden. Die Studienergebnisse deuten auf eine mögliche Rolle dieser TLR4-Polymorphismen als Risikofaktor für chronische Formen der Parodontitis hin. Der Zusammenhang sollte in einer weitergefassten Folgestudie überprüft werden.

Schlagerworte: Angeborene Immunität, Toll-like Rezeptoren, Parodontitis, genetische Polymorphismen

Abstract

Periodontal diseases are characterized by a steady decline of the dental apparatus caused by inflammation. Due to these chronic inflammatory responses periodontitis, beyond causing loosening and loss of teeth, also affect multiple other body compartments as well. Periodontitis is caused by factors originating from microorganisms as well as the host, with innate immune responses being crucially involved. The family of Toll-like receptors is centrally involved in the recognition of microbial partial structures. Lipopolysaccharide (LPS) of Gram-negative periodontal bacteria induces pro-inflammatory cytokines such as IL-1 and TNF- α via activation of TLR-4. In this case-control study, the impact of the Asp299Gly and Thr399Ile single nucleotide polymorphisms (SNPs) of human TLR-4 on the incidence of periodontitis was elucidated.

To determine genotypes of the probands, DNA was extracted from buccal swabs followed by amplification via polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP)-analysis. In total, 197 patients diagnosed for periodontitis were included in the study, with 116 suffering from chronic periodontitis (CP) and 81 suffering from aggressive periodontitis (AP), respectively. The frequency of heterozygous carriers of the Asp299Gly/Thr399Ile polymorphism was significantly elevated within the CP-group as compared to control-probands (OR 3,124; KI {1,633; 5,976}; p-value 0.0005). This association was also eminent when analysis was limited to non-smokers (OR 4,45; KI {1,4; 14,14}; p-value 0.0123), as well as after comparing the patients with matched controls being greater than 60 years of age without any signs of periodontitis (OR 4,814; KI {1,526; 15,19}, p-value 0.007). In contrast, there was no evidence for an association of AP with the TLR4-variants studied.

These results indicate a role for TLR4 in the pathogenesis of chronic, but not aggressive periodontitis and indicate that genetic variants affecting TLR4-function may predispose for the development of CP.

Key words: Innate Immunity, Toll-like receptors, periodontitis, single nucleotide polymorphisms

Meinem Vater Ewald Meister gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung:	3
Abstract	4
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Kurzeinleitung	11
2 Literaturübersicht.....	12
2.1 Parodontitis.....	12
2.1.1 Definition und Einteilung von Parodontalerkrankungen	12
2.1.2 Prävalenz und Symptomatik von CP und AP	13
2.1.3 Entstehung von Parodontalläsionen	15
2.1.4 Destruktion des Parodonts.....	16
2.1.5 Rolle von bakteriellen Mikroorganismen bei Parodontalerkrankungen.....	18
2.2 Angeborene Immunität.....	19
2.2.1 Allgemeine Aspekte	19
2.2.2 Lipopolysaccharide	20
2.2.3 Toll-like-Rezeptoren (TLRs).....	20
2.2.4 TLR4-Signalweg	23
2.2.5 TLRs und Parodontitis	25
2.2.6 Polymorphismen.....	26
2.2.7 SNPs und TLRs	26
2.2.8 Einfluss von SNPs auf Parodontitiden	28
3 Ziel der Studie	30
4 Patienten, Materialien und Methoden.....	30
4.1 Patienten	30
4.2 Materialien und Geräte.....	33
4.2.1 Entnahme des Zellmaterials	33
4.2.2 DNA-Extraktion	33
4.2.3 Polymerase-Kettenreaktion	34
4.2.4 Restriktionsenzym-Verdau	35
4.2.5 Gelelektrophorese.....	35
4.3 Methoden.....	36

4.3.1	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse	36
4.3.2	Entnahme des Zellmaterials (Wangenschleimhautabstrich).....	36
4.3.3	DNA-Aufreinigung	36
4.3.4	Polymerase-Kettenreaktion	37
4.3.5	Restriktionsenzym-Verdau	39
4.3.6	Gelelektrophorese.....	39
4.4	Methode der Auswertung und Statistik	40
5	Ergebnisse.....	42
5.1	Datencharakter der untersuchten Personen	42
5.2	Korrelation von CP-Fällen mit über 60jährigen Kontrollen ohne Parodontitis	43
5.3	Polymorphismusverteilungen der Studiengruppen und statistische Auswertung.....	44
5.3.1	Gesamte Parodontitisgruppe	45
5.3.2	Gruppe mit chronischer Parodontitis.....	45
5.3.3	Gruppe mit aggressiver Parodontitis	46
5.3.4	CP-Gruppe und Kontrollgruppe der über 60-jährigen parodontal Gesunden	48
5.4	TLR4-Polymorphismus und Raucherstatus	49
5.4.1	Gesamte Parodontitispopulation und Raucherstatus	49
5.4.2	Gruppe mit chronischer Parodontitis und Raucherstatus	49
5.4.3	Gruppe mit aggressiver Parodontitis und Raucherstatus.....	50
6	Diskussion	52
6.1	Hinweise auf eine Rolle von genetischen Faktoren in der Pathogenese der Parodontitis	52
6.2	Assoziation des Asp299Gly/Thr399Ile Polymorphismus des TLR4 mit generalisierter CP.....	52
6.3	TLR4-Polymorphismus und Raucherstatus	53
6.4	Korrelation von Asp299Gly/Thr399Ile mit anderen Krankheitsbildern	54
6.5	Polymorphismus und Zytokininduktion nach LPS-Stimulation	55
6.6	TLR4 Liganden in der Parodontitis.....	56
6.7	Wie beeinflussen TLR4-Polymorphismen die parodontale Entzündung?	56
6.8	Weitere Studien zu Parodontitis und TLR4-Polymorphismen	58
6.9	Methodenkritik	60
6.10	Folgerungen.....	62

7	Ausblick.....	64
8	Zusammenfassung	65
	Danksagung.....	82
	Lebenslauf	83

Abkürzungsverzeichnis

AAP	American Academy of Periodontology
AIDS	„aquired immunodeficiency syndrome“
AP	aggressive Parodontitis
API	Approximalraum-Plaque-Index
Asp	Aspartam
CAL	klinischer Attachmentverlust
CD14	„cluster of differentiation“ ¹⁴
CP	chronische Parodontitis
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DMFT	„decayed missing filled teeth“
DNA	Desoxyribonucleinsäure („desoxyribonucleic acid“)
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
Gly	Glyzin
HIV	„human immunodeficiency virus“
IL	Interleukin
Ile	Isoleuzin
IKK	„I- κ B-kinase“
INF	Interferon
IRAK	„IL1-R-associated kinase“
IRF	„interferon regulatory factor 3“
KI	Konfidenzintervall
LBP	Lipopolysaccharid Bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRRs	„leucin-rich-repeats“
LTA	Lipoteichonsäure („lipoteichoic acid“)
NF- κ B	„nuclear factor kappa B“
NIK	„NF- κ B inducing kinase“

NOD	„nucleotide-binding oligomerization domain“
OR	Odds Ratio
PAMPs	„pathogen associated molecular patterns“
PBI	Papillen-Blutungs-Index
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PD	Sondierungstiefe („probing depth“)
<i>PG</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PRRs	Mustererkennungsrezeptoren („pattern recognition receptors“)
RNA	Ribonucleinsäure („ribonucleic acid“)
RSV	„respiratory syncitial virus“
SNP	„single nucleotide polymorphism“
T	Thymin
TGF- β	„transforming growth factor β “
Thr	Threonin
TIR	Toll/IL1-Rezeptor
TLR	„toll like receptor“
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRAF	„TNF- α receptor associated kinase“
TRAM	„Toll-receptor-associated molecule“
TRIF	„Toll-receptor-associated activator of interferon“
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan

1 Kurzeinleitung

Als Parodontitis wird die Entzündung der zahntragenden Gewebe bezeichnet. Diese kann zur massiven Lockerung von Zähnen bzw. dessen Verlust führen. Aufgrund des häufigen Vorkommens dieser Erkrankung werden hohe Kosten durch die Parodontaltherapie bzw. die notwendige prothetische Versorgung verursacht, zu Lasten der Gesundheitssysteme und Privathaushalte (Williams, 1990). Darüber hinaus weisen epidemiologische Studien auf Auswirkungen dieses lokalen Entzündungsgeschehens auf den Gesamtorganismus hin. Es wurde z.B. ein Zusammenhang mit der Entwicklung atherosklerotischer Erkrankungen und dem Risiko von Frühgeburten beschrieben (Goldenberg und Culhane, 2006; Kinane, 1998).

In der Pathogenese von entzündlichen Parodontalerkrankungen sind neben den speziellen mikrobiologischen Voraussetzungen auch Reaktionen der sogenannten „Angeborenen Immunität“ von zentraler Bedeutung. Bestimmte genetische Defekte stehen dabei scheinbar in enger Beziehung zum Erkrankungsverlauf (Michalowicz, 1994). Jedoch werden weitere noch unbekannte erbliche Faktoren vermutet. Der Toll-like-Rezeptor 4 nimmt eine Schlüsselfunktion bei der Erkennung bakterieller Strukturen, insbesondere der Lipopolysaccharide Gram-negativer Bakterienstämme, ein. Die Aktivierung dieses transmembranären Rezeptors hat über verschiedene Signalwege die Anschaltung von Transkriptionsprozessen im Zellkern zur Folge. Dabei ist für die Parodontitis vor allem die Synthese von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und verschiedener Interleukine von pathogenetischer Konsequenz, da diese Stoffe die lokalen Entzündungsprozesse entscheidend beeinflussen. Das LPS der parodontitisassoziierten Erreger gilt als ein grundlegender Pathogenesefaktor der Parodontitis. Also könnte man eine besondere Rolle des TLR4 in der Parodontitispathogenese ableiten. Die Untersuchung dieser Hypothese ist Ziel dieser Studie. Verschiedene Untersuchungen haben Korrelationen der beiden Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile des TLR4 mit bestimmten Krankheitsverläufen gezeigt. In dieser Studie sollen Patienten, bei denen eine chronische oder aggressive Parodontitis diagnostiziert wurde, auf die Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile des TLR4 untersucht werden. Als Vergleichswert soll die Frequenz der Polymorphismen innerhalb bestimmter Kontrollpopulationen analysiert werden. Nach Auswertung der Studienergebnisse soll die Eignung der untersuchten Polymorphismen als Risikomarker für die Parodontitis beurteilt werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Parodontitis

2.1.1 Definition und Einteilung von Parodontalerkrankungen

Als Parodontium werden die Haltestrukturen natürlicher Zähne bezeichnet. Dazu gehören Gingiva (Zahnfleisch), Wurzelzement, Alveolenkortikalis (Kieferknochen) sowie das parodontale Ligament, ein System kollagener Fasern, das die Fixierung des Zahnes bewirkt. Das Saumepithel, das die Anhaftung der Gingiva an die Zahnoberfläche vermittelt, schließt diese Strukturen zur Mundhöhle hin ab und stellt bei klinischer Entzündungsfreiheit eine mechanische Barriere für orale Mikroorganismen dar (siehe **Abbildung 1**).

Marginale Parodontitiden sind entzündliche Erkrankungen, in deren Verlauf mehrere zusammenwirkende Faktoren die Destruktion dieser parodontalen Strukturen (Attachmentverlust) verursachen, was zunächst erhöhte Blutungsneigung, später Zahnlockerung bzw. Zahnverlust zur Folge haben kann. Es kommt zur Bildung parodontaler Läsionen (sogenannte Zahnfleischtaschen), zuerst in supraalveolären Bereichen, im weiteren Verlauf auch auf den Alveolarknochen übergreifend. Parodontitiden unterscheiden sich u.a. aufgrund ihrer Ursachen, klinischen Bilder, der Lokalisation und Schwere des Gewebeverlustes und dessen zeitlichen Verlaufs. Nach der gültigen Nomenklatur American Academy of Periodontology (AAP)(Armitage, 1999) werden neben den gingivalen Erkrankungen chronische Parodontitis (CP) und aggressive Parodontitis (AP) voneinander abgegrenzt. Desweiteren sind Parodontitiden als Manifestation systemischer Erkrankungen, nekrotisierende Parodontitisformen, Parodontal-Abszesse, sowie Parodontitiden im Zusammenhang mit endodontischen Läsionen als gesonderte Kategorien aufgeführt (AAP, 1999) (**Tabelle 1**). Endodontische Läsionen entstehen durch Entzündungsprozesse des Pulpengewebes im Zahninneren und können zum Knochenabbau im Bereich der Wurzelspitze (periapikal) führen.

Tabelle 1 Einteilung von Parodontitiden (modifiziert nach AAP, 1999)

I.	Chronische Parodontitis
	A. Lokalisiert (< 30 % der Zahnflächen)
	B. Generalisiert (> 30 % der Zahnflächen)
II.	Aggressive Parodontitis
	A. Lokalisiert (meist erste Molaren und Frontzähne)
	B. Generalisiert (mindestens drei weitere Zähne)
III.	Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen
	A. Assoziiert mit Bluterkrankungen (u.a. Leukämie, erworbene Neutropenie)
	B. Assoziiert mit genetischen Erkrankungen (u.a. Down-Syndrom, Glykogenspeicher-Syndrome)
IV.	Nekrotisierende Parodontalerkrankungen
V.	Parodontale Abszesse
VI.	Parodontitis assoziiert mit endodontischen Läsionen

2.1.2 Prävalenz und Symptomatik von CP und AP

Die Interpretation epidemiologischer Daten für die Parodontitis ist aufgrund uneinheitlicher Untersuchungsmethoden schwierig. Die chronische Parodontitis tritt vor allem in der älteren Erwachsenenpopulation auf und zeigt in entwickelten Industrienationen eine Prävalenz von ca. 50 %. Etwa 30 % dieser Patienten leiden unter einer schweren Ausprägung der Erkrankung (klinischer Attachmentverlust, CAL, > 5 mm, (Brown und Loe, 1993; Papapanou, 1999)). Sind unter 30 % der Zahnflächen betroffen, so wird von der lokalisierten Form gesprochen. Ein Befall von mehr als 30 % der Flächen bedeutet Zuordnung zur generalisierten Form. Charakteristisch für die chronische Parodontitis ist eine vorwiegend langsame Progression.

Die aggressive Parodontitis (AP) zeichnet sich durch einen relativ frühen Beginn meist vor dem 30. Lebensjahr und einen schubweisen schnell fortschreitenden Abbau der parodontalen Strukturen aus. Die lokalisierte AP betrifft meist die ersten Molaren und die Schneidezähne. Lässt sich außerdem noch an mindestens drei weiteren Zähnen ein Gewebeverlust diagnostizieren, liegt die generalisierte AP vor. Ohne Behandlung kann die aggressive Parodontitis zu frühzeitigem Zahnverlust führen (AAP, 1999). Die AP ist eine seltene Erkrankung, deren Prävalenz abhängig von der Ethnie 0,2 - 3,6 % erreicht (Loe und Brown, 1991).

Hauptsymptome marginaler Parodontitiden sind sondierbare Zahntaschen und röntgenologisch erkennbarer Knochenabbau, Konkremente (subgingivaler Zahnstein), sowie pathologische Zahnbeweglichkeit. Desweiteren können Befunde wie positive Provokationsblutung, Veränderungen der Gingiva, sowie Zahnstellungsänderungen die Diagnose unterstützen (Armitage, 2000). Für beide Formen ist eine zyklische Progression charakteristisch (Socransky, 1984). Aktive Phasen (*engl.*: „bursts“) werden von Ruhephasen (*engl.*: „dormant stages“) unterbrochen, deren Dauer jedoch sehr variieren kann. Progrediente Verläufe bei jungen Erwachsenen mit Abszedierungsneigung, Foetor ex ore, allgemeinem Krankheitsgefühl mit Appetits- und Gewichtsverlust bei relativ geringer Plaqueakkumulation legen eher die Zuordnung zur aggressiven Form nahe. Neben der bakteriellen Infektion als wichtigste Krankheitsursache (Listgarten, 1976) hängen Entstehung und Progredienz der Parodontitis in bedeutendem Maße vom Wirt selbst ab. So wirken sich angeborene Immundefekte als Risikofaktor aus (Newcomb, 1973). Dazu können auch bestimmte Allgemeinerkrankungen wie z.B. schlecht eingestellter Diabetes mellitus Typ II (Taylor et al., 1996) oder HIV-Infektion (Winkler und Murray, 1987), notwendiger Medikamentengebrauch, starker Nikotinkonsum (Kinane und Chestnutt, 2000), Mangelernährung (z.B. Vitamin-C-Mangel) und psychosoziale Faktoren (Genco et al., 1999) gezählt werden (Borrell und Papapanou, 2005).

Die Wirtsfaktoren sind in den letzten Jahren mehr und mehr in den Interessenfokus gerückt. Es ist erkannt worden, dass auch bei parodontal Gesunden Keime mit pathogenem Potential (die ubiquitär verbreitet sind) über längere Zeiträume gefunden werden, ohne die typischen Zeichen marginaler Entzündung. Für die aggressiven Formen der Parodontitis wird eine familiäre Häufung seit längerem beobachtet (Michalowicz et al., 1991).

2.1.3 Entstehung von Parodontalläsionen

Den verschiedenen Parodontitisformen liegen prinzipiell übereinstimmende Entstehungsmuster zugrunde. Eine besondere Rolle in der Pathogenese der Parodontitis spielt die Fähigkeit von Mikroorganismen zur Organisation in Biofilmen. Biofilme sind definiert als räumlich organisierte Gemeinschaften von Mikroorganismen, die mit einer Oberfläche verbunden und in einer extrazellulären Matrix eingebettet sind. Diese Struktur erhöht die Überlebensfähigkeit der Mikroorganismen (Marsh, 2004). Bakterien in Plaquebiofilmen verhalten sich nicht mehr wie Einzeller, sondern funktionieren quasi wie ein mehrzelliger Organismus. Sie sind dazu fähig, die Wirtsimmunabwehr gezielt zu umgehen, indem sie beispielsweise die Chemotaxis von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) hemmen, Phagozytoseprozesse blockieren oder gegen sie gerichtete Immunglobuline abbauen. Die Bildung einer extrazellulären Matrix ist dabei ein entscheidender Faktor. Diese Glycocalyx ist von fester, klebriger Konsistenz und nur mechanisch entfernbar. Sie schützt vor Austrocknung, behindert die Penetration sowohl durch die Wirtsabwehr freigesetzter antibakterieller Substanzen als auch von außen zugeführter Chemotherapeutika.

Am Anfang der Plaquebildung steht das Pellicel, das innerhalb von Minuten nach gründlicher Zahnreinigung aus Speichelglykoproteinen auf der Zahnoberfläche gebildet wird. Diese Struktur bietet die Grundlage für die Besiedlung mit Pionierkeimen, v.a. Gram-positive Kokken, aber auch *Neisseria ssp.* und *Actinomyces ssp.*. Diese bilden extrazelluläre Polysaccharide, wodurch die Adhärenz weiterer Arten, z.B. Gram-negativer *Capnocytophaga ssp.* und *Fusobacterium ssp.* erleichtert wird. Der sinkende Sauerstoffpartialdruck infolge zunehmenden Dickenwachstums und der Ausbreitung in subgingivale Bereiche begünstigt weiter die Ansiedlung obligat anaerober Keime (*Veillonella ssp.*, Spirochaeten)(Listgarten, 1976; Paster et al., 2001). So kann sich subgingival neben der adhärennten Plaque eine sogenannte schwimmende Plaque etablieren, welche virulenter ist und bei aggressiven Parodontitisformen dominiert. Sie enthält hohe Zahlen beweglicher Bakterien, v.a. Spirochaeten und Flagellaten. Das Medium für diese Spezies ist die Sulkusflüssigkeit, deren Fließrate mit dem Entzündungsgrad des Parodonts positiv korreliert. Sie enthält eine Vielzahl immunkompetenter Zellen, wie z.B. PMNs und Makrophagen, sowie Komplementfaktoren, Immunglobuline, Entzündungsmediatoren und verschiedenste Enzyme und Abbauprodukte aus Gewebe und Bakterien. Antimikrobiell wirksame Substanzen wie das Calprotectin sind

ebenfalls nachgewiesen worden und können für diagnostische Zwecke genutzt werden (Cimasoni, 1983).

2.1.4 Destruktion des Parodonts

Schon nach kurzzeitigem Aussetzen der Mundhygiene zeigen sich die klinischen Symptome der Gingivitis, einer Entzündung der oberflächlichen Gewebeanteile ohne Knochenbeteiligung, nämlich Blutung, Rötung und Schwellung. Bei Wiederaufnahme der adäquaten Pflege ist diese Entzündung vollständig reversibel (Loe et al., 1965). Eine persistierende Gingivitis kann jedoch in eine Parodontitis übergehen. Aus einem etablierten Plaquefilm werden kontinuierlich Produkte und Bestandteile der Mikroorganismen freigesetzt, u.a. Lipopolysaccharide (LPS), toxische Metabolite wie organische Säuren, Ammoniak, Schwefelwasserstoff sowie zahlreiche proteolytische Enzyme. In den angrenzenden Geweben werden daraufhin u.a. die Zytokine Interleukin-1 (IL-1) und TNF- α gebildet, die als proinflammatorisch bezeichnet werden, da sie die Entzündungsreaktion befördern. Das parodontale Gewebe reagiert mit Hyperämie und erhöhter Gefäßpermeabilität, wodurch der Einstrom von Sulkusflüssigkeit steigt. Es erfolgt die massive Einwanderung verschiedener immunkompetenter Zellen (PMN, Makrophagen, aber auch T-Lymphozyten und Plasmazellen) auf chemotaktische Reize hin. Das Komplementsystem wird aktiv. Während der Phagozytose werden Granula freigesetzt, die u.a. Hydrolasen und Proteasen enthalten. Dadurch werden Bestandteile der bakteriellen Zellmembran, aber auch körpereigenes Kollagen und Fibrinogen gespalten, d.h. die Wirtsabwehr selbst birgt destruktive Potentiale in sich. Die Rolle der Familie der Matrix-Metalloproteinasen für gewebelysierende Prozesse wurde dabei besonders dokumentiert (Birkedal-Hansen, 1993). Zudem setzen Granulozyten auch Lysozyme sowie Entzündungsmediatoren (Prostaglandine, Leukotriene) frei, die erneut die Permeabilität der Gefäße steigern, wodurch ein *circulus vitiosus* eingeleitet wird. Im Wechsel mit den zytotoxischen Substanzen und aggressiven Enzymen aus Plaquebakterien wird so die Kollagenolyse vorangetrieben. Das führt zu bindegewebigem Attachmentverlust, und weiter durch Osteoklastenaktivierung zu Knochenabbau und Tiefenproliferation des Saumeithels mit Taschenbildung (Page et al., 1997).

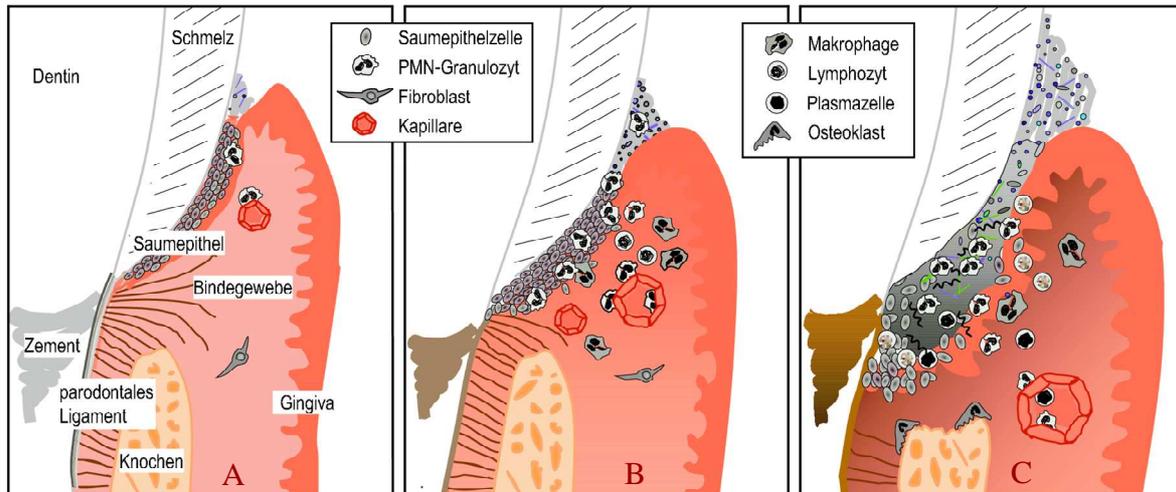


Abbildung 1: Destruktion des Parodonts (modifiziert nach Müller)

A Klinisch entzündungsfreies Parodont Die wichtigen Strukturen des Parodontiums sind schematisch dargestellt. Es findet sich kaum Plaque. Histologisch ist ein reguläres, nicht verzapftes Saumepithel erkennbar, das von wenigen PMN-Granulozyten durchwandert wird.

B Initiale und frühe Parodontitisläsion Durch vermehrte supragingivale Plaqueakkumulation wird die massive Migration von unspezifischen Immunzellen wie PMNs und Monozyten/Makrophagen, sowie Komplement provoziert. Das LPS Gram-negativer Bakterien induziert via TLR4 die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Diese Zytokine bewirken u.a. Veränderungen der Endothelzellen (Vaskulitis, Gefäßpermeabilität steigt), der Fibroblasten und des Saumepithel, dessen laterale Proliferation einsetzt. Im Infiltratbereich wird Kollagen abgebaut.

C Etablierte und fortgeschrittene Parodontitisläsion Wird der Plaquefilm nicht adäquat entfernt, kann sich eine subgingivale schwimmende Plaqueflora ausbilden, aus der kontinuierlich aggressive bakterielle Produkte freigesetzt werden. Die Gewebslyse wird jedoch auch durch potenzierte Immunreaktionen des Wirtes vorangetrieben. Die stetige Produktion von Zytokinen und Entzündungsmediatoren (TNF- α , IL-1 β und Prostaglandine) führt zur Osteoklastenaktivierung. Körper eigene MMPs zerstören Kollagenmatrix. Im Extremfall kann es zu Epithelulzerationen, putriden Exsudationen und Abszedierung führen. Die Rolle der spezifischen Immunität (B-Zellen, T-Zellen, Plasmazellen, Immunglobuline) nimmt zu.

2.1.5 Rolle von bakteriellen Mikroorganismen bei Parodontalerkrankungen

Die Parodontitis wird als opportunistische Infektion angesehen, d.h. eine verminderte Abwehrleistung des Wirtes sowie eine Änderung von Ernährungsgewohnheiten oder der Mundhygiene führen zur Verschiebung des Gleichgewichts der oralen Mischflora, wodurch vorher nicht pathogene Keime zeitweise pathogenen Status erlangen. In der Oralflora Gesunder finden sich über 500 Bakterienspezies, desweiteren Viren, Protozoen und Pilze. Es überwiegen eher Gram-positive Anaerobier bzw. fakultativ anaerobe Kokken und Stäbchen. In aktiven Phasen der Parodontitis werden häufiger Gram-negative, fakultative bzw. obligate Anaerobier und Spirochaeten gefunden. Gut dokumentiert ist das für die Bakterienspezies *Porphyromonas gingivalis* (PG), *Tannerella forsythensis* (vormals *Bacteroides forsythus*) und *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Paster et al., 2001; Socransky et al., 1998). Zu den oralpathogenen Spirochaeten zählen unter anderem *Treponema denticola* und *Treponema maltophilum* (Moter et al., 1998). Weiterhin werden *Campylobacter sp.*, *Prevotella sp.*, *Eikenella nodatum*, *Fusobacterium nucleatum ssp.*, *Streptococcus constellatus*, *Peptostreptococcus micros* mit der Erkrankung assoziiert (Socransky und Haffajee, 2005; Socransky und Manganiello, 1971).

Parodontalpathogene Spezies haben zahlreiche aktive Mechanismen entwickelt, die Wirtsabwehr gezielt zu attackieren. Bakterielle Proteasen lysieren Gewebestrukturen, können aber auch Komplementfaktoren und Zytokine inaktivieren, sowie das Kallikrein-Kinin-System aktivieren, das ebenfalls die Knochenresorption fördert. Weitere Virulenzfaktoren wie Invasine oder Leukotoxine unterminieren aktiv die Wirtsabwehr (Takii et al., 2005). Im Gewebe Parodontitiserkrankter wurden erhöhte Mengen der Zytokine IL-1 und TNF- α nachgewiesen (Stashenko et al., 1991), die durch Reaktionen der angeborenen Immunität des Wirtes gebildet werden. Deren synergistische fördernde Wirkung auf die Knochendestruktion wurde gezeigt (Stashenko et al., 1987). Es ist bekannt, dass die Produktion von IL-1 und TNF- α durch LPS aus der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien induziert wird (Lindemann et al., 1988; Page, 1991). Für die Erkennung von LPS und weiterer mikrobieller Muster sind bestimmte Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr essentiell notwendig, die in der Gruppe der Toll-like-Rezeptoren (TLRs) zusammengefasst werden.

2.2 Angeborene Immunität

2.2.1 Allgemeine Aspekte

Die angeborene Immunität (*engl.*: „innate immunity“) ist der entwicklungsgeschichtlich älteste Bestandteil des Immunsystems und agiert in engem Zusammenhang mit der im Laufe des Lebens erworbenen Immunität (*engl.*: „adaptive immunity“). Infektionen mit pathogenen Mikroorganismen lösen im betroffenen Wirt zuerst immunologische Reaktionen unspezifischer Art aus. Dabei haben Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen zentrale Bedeutung (Medzhitov und Janeway, 1997), u.a. durch die Freisetzung von Zytokinen. Außerdem können Makrophagen eingedrungene Parasiten phagozytieren und deren Antigene auf ihrer Oberfläche T-Lymphozyten präsentieren, was wiederum der spezifischen Abwehr den Weg zu klonaler Selektion und Expansion bestimmter Antigenrezeptoren bereitet (Medzhitov et al., 1997).

Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, *engl.*: „pattern recognition receptors“) können wiederkehrende Strukturmerkmale (sogenannte PAMPs, *engl.*: „pathogen-associated molecular patterns“) eindringender Mikroorganismen als körperfremd detektieren (Schröder und Schumann, 2005). Dazu eignen sich z.B. Lipopolysaccharide Gram-negativer oder Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren Gram-positiver Bakterien. Sie sind für das Überleben der Mikroorganismen essentiell, von relativ konstanter Struktur, können von eukaryoten Zellen jedoch nicht gebildet werden. PAMPs sind abzugrenzen von Virulenzfaktoren. Diese werden von Pathogenen in Adaptation an ein bestimmtes Wirtsmilieu gebildet. Virulenzfaktoren sind sehr veränderlich und deshalb für angeborene Erkennungssysteme ungeeignet. Da PAMPs dagegen wenig unter Mikroorganismen einer Klasse variieren, genügt eine feststehende Zahl keimlinienkodierter Rezeptoren zur Pathogen-Erkennung. Diese PRRs kommen auf Zelloberflächen, v.a. antigen-präsentierender Zellen vor, aber auch intrazellulär oder in Form von löslichen Proteinen in Serum und Gewebeflüssigkeit (Janeway und Medzhitov, 2002). Die Hauptfunktionen sind Opsonierung, Aktivierung von Komplement- und Gerinnungskaskade, der Zytokinproduktion, Phagozytose und Apoptoseinduktion.

2.2.2 Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide (LPS, auch Endotoxin) entstammen der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und werden während des Wachstums und nach deren Tod freigesetzt (Leeson und Morrison, 1994). Im Wirt können sie sowohl lokal begrenzte Entzündungen, aber auch im Falle einer Bakteriämie schwere systemische Entzündungen auslösen, die als Sepsis bezeichnet werden. Als Komplikation der Sepsis kann ein septischer Schock auftreten, für den eine hohe Letalität charakteristisch ist (Schumann, 1992).

Das amphiphile LPS-Molekül besteht aus einer hydrophilen Kohlenhydratkette, durch deren Kernregion es kovalent an das hydrophobe Lipid A gebunden ist (Rietschel et al., 1996). Das Lipid A, das in verschiedenen LPS-Formen relativ konstant aufgebaut ist, bildet den Membrananker, während das O-Antigen als äußerer Teil des Kohlenhydratanteils sehr variiert. Immunstimulatorisch aktiv ist das Lipid A. Dieses wird im Serum von LBP (Lipopolysaccharid bindendes Protein) gebunden, monomerisiert und an ein weiteres Protein, CD14 übertragen (Goyert et al., 1988; Schumann et al., 1994; Wright et al., 1990), wodurch die Zellaktivierungskaskade eingeleitet wird. Das LBP zählt zu den Akutphaseproteinen, deren Expression während akuter Entzündungsprozesse in der Leber hochreguliert wird. CD14 existiert gebunden an der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen, liegt aber auch in löslicher Form im Serum vor (Frey et al., 1992). Antikörper gegen CD14 konnten LPS-Effekte vollständig blockieren (Wright et al., 1990; Zarewych et al., 1996), was die Bedeutung dieses Proteins unterstreicht. Da CD14 keine transmembranäre Domäne aufweist (Haziot et al., 1988), wurde ein anderes Rezeptorelement für die Signalübertragung ins Zellinnere vermutet. Die deswegen durchgeführte intensive Suche nach dem für die Zellaktivierung verantwortlichen Ko-Rezeptor führte schließlich zur Entdeckung der Toll-like-Rezeptoren.

2.2.3 Toll-like-Rezeptoren (TLRs)

Toll wurde erstmalig im Jahr 1984 von Anderson und Nüsslein-Vollhardt als Rezeptor der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) beschrieben (Anderson und Nusslein-Volhard, 1984). Ursprünglich wurde die Funktion des Rezeptors *Toll* ausschließlich in der Embryonalentwicklung von *Drosophila* bei der Festlegung des dorsoventralen Körpermusters gesehen

(Hashimoto et al., 1988). Die Ähnlichkeit der *Toll*-Signaltransduktionskaskade mit der Interleukin-1-Signaltransduktionskaskade führte zu der Hypothese, dass *Toll* auch in *Drosophila* Funktionen in der Immunabwehr übernehmen könne. Tatsächlich sind genetisch veränderte Taufliegen, die *Toll* nicht besitzen, hochanfällig für Pilzinfektionen (Imler und Hoffmann, 2002; Imler und Hoffmann, 2003; Lemaitre et al., 1996). Homologe Gene wurden in Vertebraten, z.B. Mäusen und Menschen, aber auch für Nematoden, Insekten und Pflanzen gefunden. Dieser Weg scheint sich in der Evolution schon sehr früh konfiguriert zu haben und ist ubiquitär verbreitet.

Zunächst wurde von zwei Untersuchern die Beteiligung des humanen Toll-like-Rezeptors (TLR)2 in der LPS-Stimulation von humanen Nierenepithelzellen nach Transfektion des Proteins gezeigt (Kirschning et al., 1998; Yang et al., 1998). Allerdings wurde später herausgefunden, dass diese Ergebnisse durch Kontaminationen des LPS mit Lipoproteinen hervorgerufen wurden. Lipoproteine werden jetzt als klassische TLR2-Agonisten angesehen (Lien et al., 1999; Schwandner et al., 1999). Kurze Zeit später wurde bei den LPS-hyporesponsiven Mausstämmen C3H/HeJ und C57B1/10ScCr eine Mutation in dem Gen gefunden, das für TLR4 kodiert. Diese Mutation verursacht eine inaktive Form des Rezeptors (Hoshino et al., 1999; Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1998). Weiter konnten Zellen nach Transfektion mit TLR4 durch LPS stimuliert werden (Chow et al., 1999). Damit wurde nachgewiesen, dass TLR4 der Rezeptor für bakterielles LPS ist.

Bis heute sind insgesamt zehn TLRs im Menschen identifiziert worden, die z.B. DNA-, RNA-Strukturen oder bakterielle Flagelline erkennen (Alexopoulou et al., 2001; Diebold et al., 2004; Hayashi et al., 2001; Heil et al., 2004; Hemmi et al., 2000; Lund et al., 2004). Es ist beschrieben worden, dass verschiedene TLRs Heterodimere bilden müssen, um aktiv zu werden. So bildet z.B. TLR2 Heterodimere mit TLR1 oder TLR6 (Ozinsky et al., 2000). Im Gegensatz dazu bildet TLR4 jedoch Homodimere (da Silva Correia et al., 2001). Weitere extrazelluläre Komponente des LPS-Rezeptorkomplexes ist das Protein MD2, dem eine transmembranäre Domäne fehlt. Es wird auf Zelloberflächen in Assoziation mit der Ektodomäne von TLR4 exprimiert (Shimazu et al., 1999). MD2 stabilisiert wahrscheinlich TLR4-Dimere und scheint LPS direkt zu binden (Viriyakosol et al., 2001). Studien mit MD2-mutierten Zelllinien, bzw. MD2-defizienten Mäusen bestätigen die essentielle Rolle von MD2 für die LPS-Erkennung (Nagai et al., 2002; Schromm et al., 2001).

Für Toll-like-Rezeptoren charakteristisch ist die extrazelluläre Leuzin-reiche Domäne (*engl.*: „leucin-rich-repeats“, LRRs) (O'Neill und Dinarello, 2000). LRRs führen zur Ausprägung der sogenannte „horseshoe-like“-Struktur und scheinen grundlegend für die Ligandeninteraktion der TLRs zu sein (Kobe und Deisenhofer, 1995). Auch andere PRRs, z.B. CD14 und die NODs weisen diese LRR-Architektur auf (Kirschning und Schumann, 2002). Der LRR-Anteil ist essentiell für die Ligandenerkennung. Die Signalweiterleitung erfolgt über die intrazelluläre Toll/IL1-Rezeptor (TIR)-Domäne, die die Schlüsselregionen für die Signaltransduktion beinhaltet.

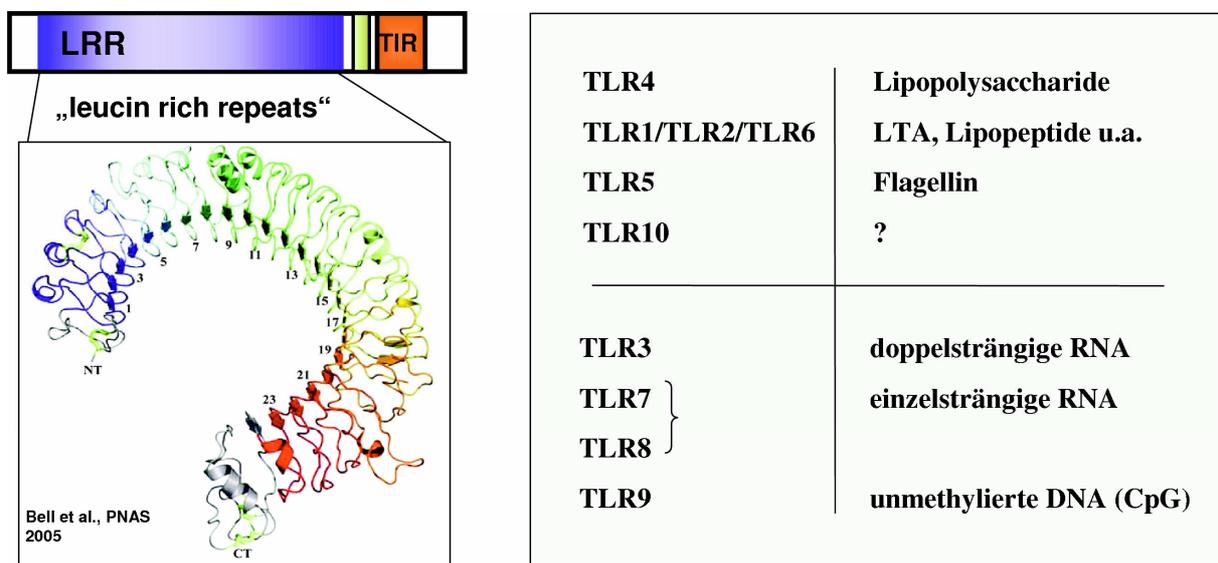


Abbildung 2: Strukturschema der TLRs und bisher bekannte Liganden

Die extrazelluläre Domäne aller bekannten TLRs beinhaltet sogenannte "leucin rich repeats", die, wie im Falle des TLR3 gezeigt (Bell et al., 2005), eine hufeisenförmige Struktur bilden. Diese ermöglicht die Bindung des Liganden. Die intrazelluläre Domäne beinhaltet die sogenannte TIR-Domäne, welche für die Signaltransduktion verantwortlich ist. Die Liganden der meisten TLRs konnten mittlerweile identifiziert werden.

2.2.4 TLR4-Signalweg

Die Mutation des LPS-hyporesponsiven Mausstammes C3H/HeJ betrifft den intrazellulären Anteil des Rezeptorkomplexes im Bereich der TIR-Domäne (Xu et al., 2000). Diese Struktur wurde auch in anderen Spezies und Pflanzen mit Signalübertragungsprozessen assoziiert (O'Neill, 2002). Die TIR-Domäne interagiert mit dem Adapterprotein MyD88, das ebenfalls eine TIR-Domäne trägt. Im folgenden interagieren die sogenannten „Todesdomänen“ von MyD88 und IRAK1 (IL1-R associated kinase) miteinander, und IRAK1 aktiviert TRAF6 (Beutler et al., 2005). Nachfolgend werden NF- κ B Dimere gebildet, welche nach Inaktivierung des inhibierenden Faktors I- κ B durch die I- κ B Kinase (IKK) in den Zellkern translozieren (DiDonato et al., 1997). Der soeben beschriebene Weg wird als „MyD88-abhängig“ bezeichnet. Die Beobachtung, dass Mäuse, denen MyD88 fehlt, eine lediglich abgeschwächte Reaktion auf LPS zeigen führte zur Hypothese eines MyD88-unabhängigen Signalweges nach Aktivierung von TLR4 (Kawai et al., 1999). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass TLR4 neben MyD88 auch TRAM aktiviert, was wiederum zur Aktivierung von TRIF führt (Hoebe et al., 2003; Sato et al., 2003; Yamamoto et al., 2003). Dies führt wiederum zur Freisetzung von Interferon α und β nach Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 (Hoebe et al., 2003; Sato et al., 2003). TLR4 ist der einzige TLR, der beide beschriebenen Wege, also den MyD88-abhängigen und den TRIF-abhängigen Signaltransduktionsweg aktiviert. TLR3 aktiviert ausschließlich TRIF (Hoebe et al., 2003), während die Signale aller anderen bisher beschriebenen TLRs in MyD88-Abhängigkeit transduziert werden (Beutler et al., 2005).

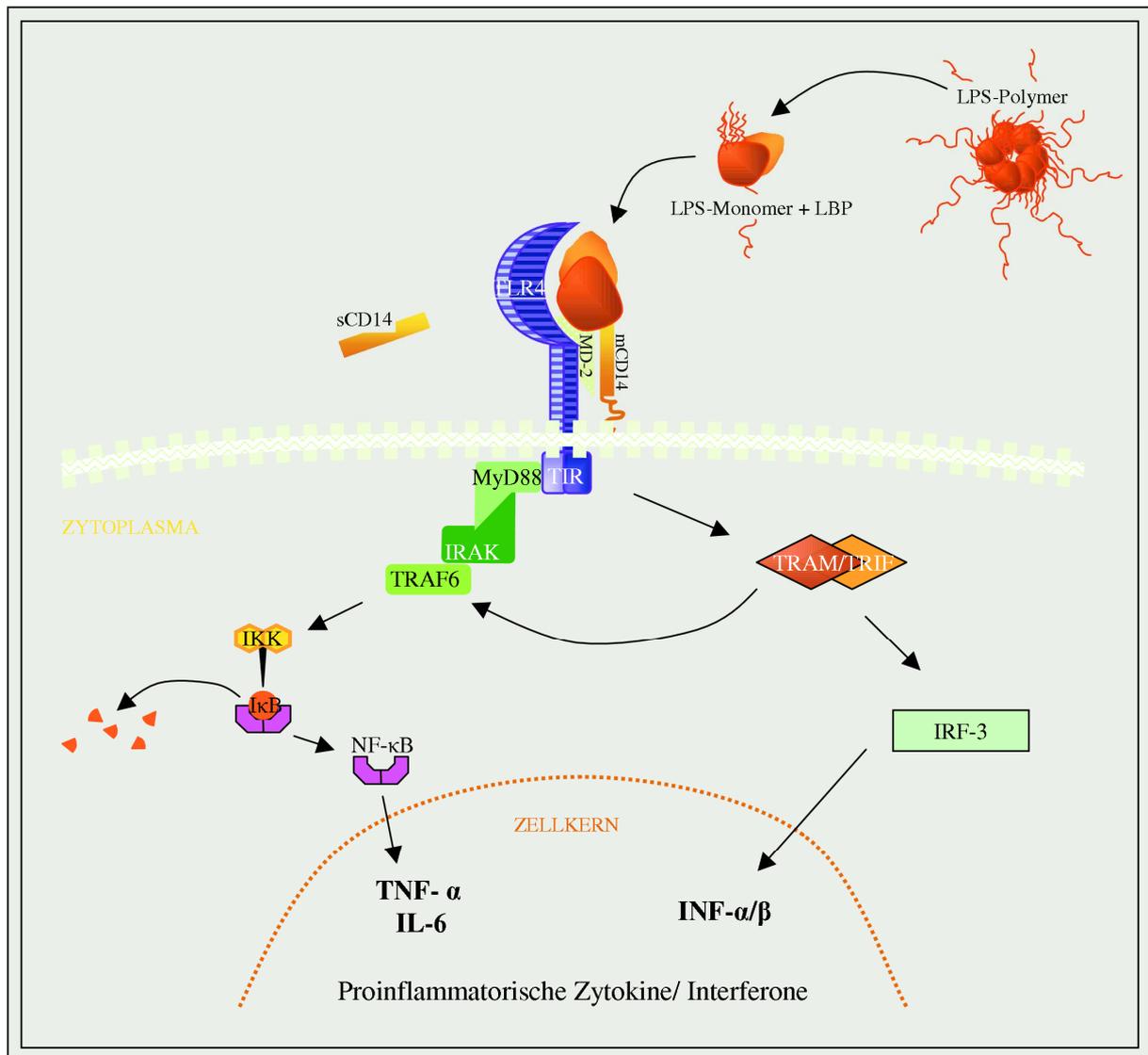


Abbildung 3: Signaltransduktionsweg nach Aktivierung von TLR4

LPS wird durch LBP monomerisiert und an den Rezeptorkomplex transferiert, der aus CD14, einem TLR4-Homodimer sowie MD-2 besteht. Dadurch wird MyD88 aktiviert und es kommt über IRAK und TRAF6 zur Inaktivierung von IKK und nachfolgender Translokation von NF-κB-Dimeren in den Zellkern. Somit wird die Translation von pro-inflammatorischen Zytokinen eingeleitet. Neben MyD88 kann TLR4 auch TRAM und TRIF aktivieren, was zu einer Aktivierung von IRF-3 und Translation von Interferon α und β führt.

2.2.5 TLRs und Parodontitis

Die Expression von TLR2 und -4 in gingivalen Makrophagen und Fibroblasten korreliert mit dem Entzündungsgrad des parodontalen Gewebes (Mori et al., 2003). Sugawara et al. fanden außerdem eine höhere Expression von LBP und CD14 im Speichel von Parodontitiskranken (Sugawara et al., 2002). Bei einer weiteren Untersuchung von Gewebe aus parodontalen Läsionen wurde eine erhöhte Expression von TLR2 und -4, sowie membrangebundenem CD14 im Vergleich zu gesundem Gewebe dokumentiert, wodurch die pathogenetische Rolle dieser PRRs unterstrichen wird (Ren et al., 2005). Desweiteren wurde in einem Mausmodell reduzierter periapikaler Knochenabbau bei dem Mausstamm C3H/HeJ, dessen TLR4 inaktiv ist, im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (Hou et al., 2000). Korrespondierend dazu wurden geringere Mengen der Zytokine IL-1 α und - β sowie des proinflammatorischen IL-12 freigesetzt, die die Knochenresorption fördern. Aufgrund dieser Ergebnisse kann ein Einfluss der TLRs auch auf die Parodontitispathogenese vermutet werden.

Lipopolysaccharide Gram-negativer Bakterien wurden wiederholt als hochrelevante pathogenetische Faktoren der Parodontitis beschrieben (Jensen et al., 1966) und TLR4 wird als klassischer Rezeptor für LPS angesehen (Barton und Medzhitov, 2002; Beutler und Rietschel, 2003; Hirschfeld et al., 2000). Zu den Gram-negativen Bakterien zählen auch Parodontalpathogene, wie *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Bacteroides sp.* (Gutierrez-Venegas et al., 2006; Hashimoto et al., 2003). Im Unterschied zu den übrigen oben genannten Parodontalkeimen gab es bezüglich der Erkennung von *Porphyromonas gingivalis* (PG)-LPS innerhalb der vergangenen Jahre zahlreiche Kontroversen. Ursprünglich wurde beschrieben, dass PG-LPS im Unterschied zu den meisten anderen LPS-Formen ein Ligand des TLR2 ist (Hirschfeld et al., 2001), ein Phänomen, dass auch schon für LPS aus *Leptospira interrogans* aus der Familie der Spirochaeten beschrieben wurde (Werts et al., 2001). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass PG-LPS ausschließlich mit TLR4-MD2 interagiert und dass Effekte mit TLR2 auf Kontaminationen mit typischen TLR2-Liganden zurückzuführen sein könnten (Hashimoto et al., 2003). Nach spezieller Aufreinigung der Lipid A-Fraktion des PG-Stammes 381 sank die NF- κ B-Aktivierung durch TLR2 einer Mauszelllinie, jedoch nicht die via TLR4. Das entsprechende synthetisch hergestellte Lipid A aktivierte Immunzellen jedoch allein über TLR4 (Ogawa et al., 2002).

2.2.6 Polymorphismen

Als genetischer Polymorphismus wird eine Genvariation (eines Allels) bezeichnet, die mit einer Häufigkeit von mindestens einem Prozent innerhalb einer Population auftritt, andernfalls wird von einer Mutation gesprochen. Eine häufige Variationsmöglichkeit besteht im Austausch eines Nukleotids und folglich eines Basenpaares des DNA-Moleküls. Sie wird als Einzelnukleotid-Polymorphismus (*engl.*: „single nucleotide polymorphism“, SNP) bezeichnet. Wenn ein SNP im für ein Protein kodierenden Bereich eines DNA-Abschnittes liegt, kann ein Aminosäureaustausch resultieren. Dieser muss jedoch nicht zwingend stattfinden, da der genetische Code redundant ist, sodass viele Aminosäuren durch mehrere Basentriplets verschlüsselt sind. Es wurde beobachtet, dass Mutationen nicht zufällig im Genom vorkommen, sondern von der speziellen Region des Genoms und vom selektiven Druck abhängig sind (Zhang und Hewitt, 2003). Demzufolge scheinen Gene, die für Proteine kodieren, die bei immunologischen Prozessen mitwirken, eine hohe Anzahl von Polymorphismen aufzuweisen. Diese Hypothese konnte durch Genomsequenzierungen bekräftigt werden (Marth et al., 2001; Sachidanandam et al., 2001). In den letzten Jahren sind zahlreiche SNPs für immunologisch relevante Gene beschrieben worden, so auch für PRRs und Zytokine (Stuber et al., 1996). Ob sich diese SNPs bei den Trägern auf das Eintrittsrisiko bzw. den Verlauf bestimmter Erkrankungen auswirken und ob in positiver oder negativer Weise, wurde inzwischen vielfach untersucht.

2.2.7 SNPs und TLRs

Durch mehrere Untersucher wurde bestätigt, dass die Inhalation von Lipopolysacchariden bei den meisten Probanden zu starken asthmaähnlichen Reaktionen führt (Schwartz, 1996; Schwartz et al., 1994). Allergische Asthmatiker reagieren heftiger als gesunde Individuen (Michel et al., 1989). Da es jedoch Menschen gibt, die nicht in dieser Weise auf LPS-Inhalation reagieren, wurde ein unbekannter genetischer Hintergrund vermutet (Kline et al., 1999). Von Arbour et al. wurden 2000 zwei Polymorphismen des TLR4 und deren Assoziation mit der Unempfindlichkeit (Hyporesponsivität) auf die Inhalation von LPS beschrieben (Arbour et al., 2000). Durch Gensequenzierung wurde ein Austausch der Base Adenin gegen Guanin bei Nucleotid 896 festgestellt, was den Einbau der Aminosäure Aspartam statt Glycin an Position 299 zur Konsequenz hat (Asp299Gly). Ein weiterer SNP (C1196T, Thymin statt

Cytosin bei Nucleotid 1196) erzeugt den Einbau von Isoleuzin statt Threonin an Position 399 (Thr399Ile). Durch beide Mutationen wird die extrazelluläre Domäne des Rezeptors verändert, wobei der Genotyp Asp299Gly den dominierenden funktionellen Einfluss zu haben scheint. Vermutlich wird die Ligandenerkennung beeinträchtigt. Diese beiden Varianten treten bei den meisten kaukasischen Trägern in Kombination auf und zeigten eine Häufigkeit zwischen 6 und 10 % innerhalb der untersuchten kaukasischen Populationen. Epithelzellen und Alveolarmakrophagen der Polymorphismusträger zeigten eine herabgesetzte Zytokinausschüttung nach LPS-Stimulation *in vitro*. Desweiteren konnten für THP1-Zellen nach Transfektion mit dem mutierten TLR4 nur noch abgeschwächte Reaktionen auf LPS festgestellt werden.

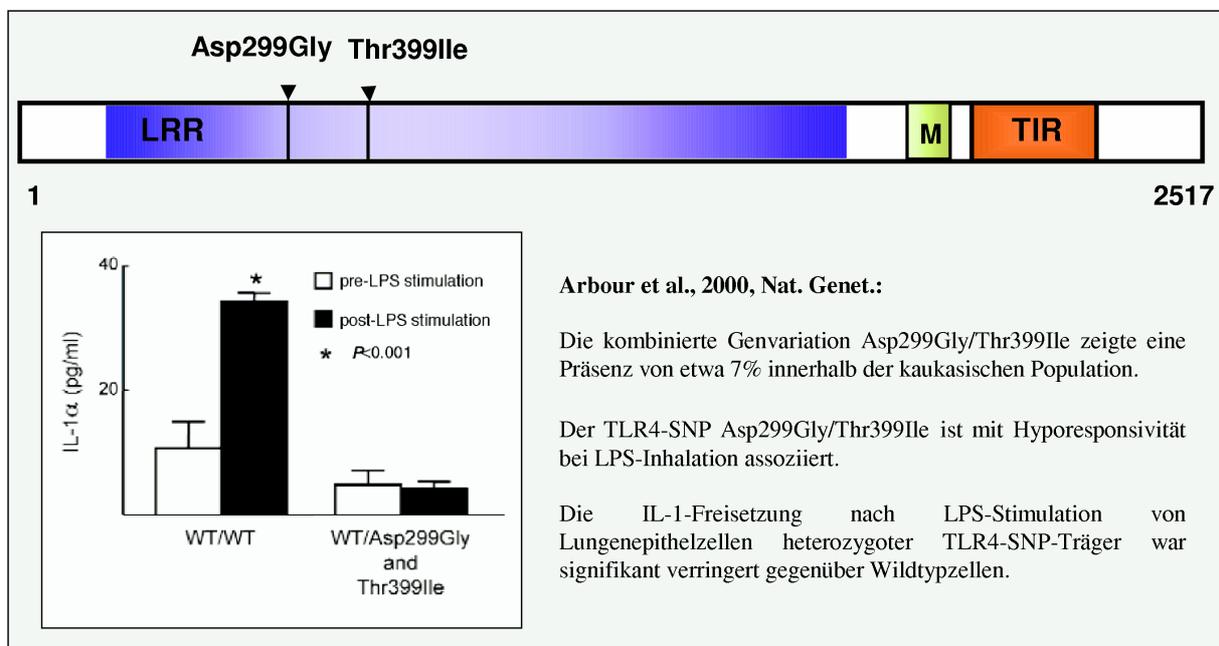


Abbildung 4: Struktur des TLR4 und Lage der Polymorphismen, Aussage der Erstpublikation

Oben: Struktur des TLR4. Der N-terminale Bereich besitzt mehrere sogenannter Leuzin-reicher repetitiver Strukturen (engl.: "leucin rich repeats", LRR). Die in dieser Studie behandelten Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile befinden sich innerhalb dieser LRRs. Der C-terminale, intrazelluläre Bereich beinhaltet die Signaltransduktionsdomäne (TIR-domain). M: innermembranärer Bereich. Unten: Das Vorliegen beider Polymorphismen verhindert die Freisetzung von IL-1α nach LPS-Stimulation von primären Epithelzellen.

Infolge dieser Publikation gab es eine Reihe von Studien zu diesen SNPs (Schröder und Schumann, 2005). Es wurde sowohl ein erhöhtes Sepsisrisiko aufgrund von Infektionen mit

Gram-negativen Bakterienspezies als auch ein höheres Risiko zur Ausbildung eines septischen Schocks dokumentiert (Lorenz et al., 2002). Von Agnese et al. wurde 2002 ebenfalls eine höhere Inzidenz der Polymorphismusträger für Gram-negative Infektionen festgestellt (Agnese et al., 2002). Für beide TLR4-SNPs konnte eine klare Assoziation (vierfache Frequenz) mit schwerer RSV-Bronchiolitis (RSV; *engl.*: „respiratory syncytial virus“) bei israelischen Kindern aufgezeigt werden (Tal et al., 2004). Eine Studie in England mit Meningokokkenerkrankten zeigte keinen Einfluss des TLR4-SNP Asp299Gly auf Eintritt und Verlauf der Infektion (Read et al., 2001). Ausserdem wurde in einer späteren Studie in Großbritannien eine größere Häufigkeit von seltenen TLR4-Mutationen bei Meningokokkenerkrankten registriert (Smirnova et al., 2003). Im Gegensatz dazu wurde bei einer Studie mit Legionärskranken (*Legionella pneumophila*) in den Niederlanden eine erniedrigte Frequenz dieser SNPs festgestellt, hinweisend auf einen schützenden Effekt (Hawn et al., 2005). Protektive Assoziationen sind auch für Atherosklerose bei einer italienischen Population (Kiechl et al., 2002) und schwere Malaria bei afrikanischen Kindern (Mockenhaupt et al., 2006) beschrieben worden.

2.2.8 Einfluss von SNPs auf Parodontitiden

Genetische Risikofaktoren der Parodontalerkrankungen stehen seit langem im Mittelpunkt des Interesses. Wegen der bereits zuvor beschriebenen besonderen Rolle der angeborenen Immunität in der Pathogenese der Parodontitis wurde auch ein möglicher Einfluss auf das Erkrankungsrisiko durch SNPs in Genen für proinflammatorische Zytokine vermutet. Kornman et.al. untersuchten 1997 SNPs in Genen für IL-1 α bzw. IL-1 β (mit gesteigerter Produktion von IL-1 assoziiert (Kornman et al., 1997). Dabei wurden Korrelationen mit einem besonders schweren Verlauf bei Nichtrauchern festgestellt. Es folgten zahlreiche Studien in verschiedenen Populationen mit CP und AP, die diese Ergebnisse teilweise bestätigten (Cullinan et al., 2001; Parkhill et al., 2000; Socransky et al., 2000), teilweise widerlegten (Hodge et al., 2001; Meisel et al., 2003; Papapanou et al., 2001), siehe (Borrell und Papapanou, 2005; Kinane und Hart, 2003). Zusammenfassend wurde von Kinane formuliert, dass sich der IL-1-SNP auf die chronische Form (unabhängig von Risiko durch Rauchen) auszuwirken scheint (Kinane und Hart, 2003). Der Einfluss ist jedoch nicht sicher einschätzbar und deshalb eine Anwendung im klinischem Umfeld zur Zeit nicht möglich. Da

das Parodontitisrisiko wahrscheinlich multigenassoziiert ist, stellen Polymorphismen des IL-1-Gens eventuell nur einen von vielen verschiedenen Faktoren dar. Die bisherigen Daten zur AP lassen keine Assoziation vermuten. Auch für TNF- α (Galbraith et al., 1998), IL-10 (Kinane et al., 1999) und weitere wichtige Elemente der Immunität wurden schon Polymorphismusstudien für Parodontitis publiziert. Sichere Aussagen lassen sich jedoch in Analogie zur IL-1-Diskussion noch nicht treffen.

3 Ziel der Studie

In dieser Studie sollte untersucht werden, ob sich die bekannten Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile des Toll-like-Rezeptors 4 auf Ausprägung und Verlauf von Parodontitiden auswirken. Dazu sollte Zellmaterial von Patienten, bei denen eine chronische oder aggressive Parodontitis diagnostiziert wurde, nach der Methode der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP) auf die SNPs Asp299Gly und Thr399Ile des TLR4 untersucht werden. Als Vergleichswert sollte die Frequenz der Polymorphismen innerhalb bestimmter Kontrollpopulationen bestimmt werden. Aus den Ergebnissen soll beurteilt werden, inwieweit sich die Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile des Toll-like-Rezeptors 4 als Risikomarker für entzündliche Parodontalerkrankungen eignen.

Diese Studie entstand in Kooperation des Labors für molekulare Sepsisforschung am Institut für Mikrobiologie und Hygiene mit der Abteilung für Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin der Charité.

4 Patienten, Materialien und Methoden

4.1 Patienten

Die Durchführung dieser Studie wurde von der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin genehmigt. Es nahmen 197 Patienten männlichen und weiblichen Geschlechts im Alter von 22 bis 81 Jahren mit diagnostizierter Parodontitis an dieser Studie teil. Eingeschlossen waren sowohl Raucher als auch Nichtraucher. Alle Patientenuntersuchungen wurden von Zahnärzten durchgeführt, die am zahnmedizinischen Zentrum der Charité-Universitätsmedizin Berlin ausgebildet wurden oder dort lehren. Es wurden die anerkannten klinischen Untersuchungsmethoden gemäß den Richtlinien der American Academy of Periodontology (AAP) angewendet (AAP, 1999). Die Diagnose einer generalisierten Parodontitis erfolgte bei klinischem Verlust parodontaler Stützgewebe („Attachmentverlust“) von mehr als 3 mm an mindestens 30 % der vorhandenen Zähne. Es wurde desweiteren zwischen aggressiver (AP) und chronischer Form (CP) unterschieden. Dabei wurden ebenfalls die aktuellen Kriterien zur Klassifikation der Erkrankungen des Parodontium der AAP zugrunde gelegt, deren Nomenklatur auch für die Deutsche Gesellschaft für Parodontologie verbindlich ist (AAP, 1999). Patienten im Alter zwischen 18

und 40 Jahren, bei denen sich ein Attachmentverlust von mehr als 5mm an mindestens 3 weiteren bleibenden Zähnen neben den ersten Molaren und Schneidezähnen diagnostizieren ließ, wurden der Gruppe mit aggressiver Parodontitis zugeordnet.

Die Kontrollpopulation setzte sich aus einer Gesamtzahl von 349 gesunden Individuen ohne anamnestische Hinweise auf Parodontalerkrankungen zusammen. Für die Population mit aggressiver Parodontitis wurde deren Altersbereich entsprechend eine Kontrollgruppe mit einer Altersspanne von 22 bis 39 Jahren, gebildet. Die Kontrollprobanden für die Gruppe mit chronischer Parodontitis sollte älter als 40 Jahre alt sein. Aufgrund der Korrelation der chronischen Parodontitis mit zunehmendem Alter, und da sich nicht vorhersagen lässt, ob und wann ein junger Mensch mit gesunden parodontalen Verhältnissen in späteren Lebensjahren eine chronische Parodontitis entwickeln wird, sollten Kontrollpersonen gefunden werden, die relativ wenig anfällig für parodontale Entzündungen sind. Es wurde eine Gruppe von Personen gebildet, die älter als 60 Jahre sind und noch mindestens 20 Zähne haben, keine Anzeichen von generalisierter chronischer Parodontitis zeigen und deren Anamnese keine Hinweise auf parodontaltherapeutische Maßnahmen in der Vergangenheit enthält.

Alle Patienten waren deutsche Kaukasier mit Ausnahme von 21 kroatischen Kaukasiern mit diagnostizierter AP, die im Rahmen einer Kooperation von Dr. med. Annette Moter und Vesna Haban, Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité, mit der Universität Zagreb rekrutiert wurden. Die Kontrollgruppe setzt sich aus deutschen Kaukasiern des Raumes Berlin, sowie 27 Individuen des Raumes Konstanz zusammen. Bei allen Patienten und Kontrollpersonen wurde eine Raucheranamnese erhoben. Die konsumierte Menge wurde dabei in „pack years“ umgerechnet. Ein packyear ist durch den äquivalenten Konsum von täglich einer Schachtel mit 20 Zigaretten während eines Jahres definiert. D.h. 10 Zigaretten täglich in einem Jahr bedeuten z.B. ein halbes pack year. Zuordnung zur Rauchergruppe erfolgte ab 10 pack years. Alle beteiligten Personen erklärten sich mit der Untersuchung einverstanden. Vor Beginn der Untersuchungsphase wurde ein Erfassungsbogen in Abstimmung aller beteiligten Untersucher über die Auswahl der erhobenen Daten und deren Umsetzbarkeit erstellt. Neben den allgemeinen Daten zur Person und der gestellten Diagnose wurden folgende Kriterien als dichotome Größen bewertet: Mundhygiene, Plaqueakkumulation, Vorhandensein von subgingivalen Konkrementen sowie Zahnengstand. Angaben zum Raucherstatus, Sanierungszustand (DMFT-Index, ist die Summe aller

zerstörten, fehlenden und gefüllten Zähne) und zu vorhandenen Ausschlusskriterien wurden dokumentiert. (**Tabelle 2**)

Tabelle 2: Kriterien für die Studienteilnahme

Einschlusskriterien	<ol style="list-style-type: none">1. chronische Parodontitis diagnostiziert2. aggressive Parodontitis diagnostiziert3. Einwilligung der Studienteilnahme
Ausschlusskriterien	<ol style="list-style-type: none">1. Diabetes mellitus Typ I und II2. maligne Grunderkrankung3. immunsuppressive Behandlung (auch Steroide > 100 mg/d Prednisolonäquivalent)4. bekannte angeborene/erworbene Immundefekte5. Verweigerung der Studienteilnahme

Für die Parodontitispatienten ist ein Parodontalstatus mit sechs Messpunkten pro Zahn und Angaben zur Zahnbeweglichkeit und dem Grad der Furkationsbeteiligung erstellt worden, aus dem die Sondierungstiefen entnommen wurden. Dafür wurde bei den CP-Patienten eine konventionelle Parodontalsonde (PCP-UNC 15, Hu-Friedy, USA) verwendet. Sondierungstiefen und klinischer Attachmentverlust wurden bei den AP-Patienten mit einer druckkalibrierten elektronischen Parodontalsonde (Florida Probe FP 32 mit Software 3.0.6.8, Florida Probe Corporation, USA) gemessen. Desweiteren wurde anhand der Einzelröntgenaufnahmen, die von allen Zähnen der Patienten in Paralleltechnik angefertigt wurden, die Diagnosestellung überprüft.

4.2 Materialien und Geräte

4.2.1 Entnahme des Zellmaterials

Test Swab, steriler Wattetupfer	Copan Innovation, Brescia Italien
Mikroröhrchen 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
PBS („Phosphate buffered saline“):	GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA
0,01 M Na ₂ HPO ₄ (Natriumhydrogenphosphat) 0,0015 M KH ₂ PO ₄ (Kaliumhydrogenphosphat) 0,025 M KCL (Kaliumchlorid) 0,14 M NaCl (Natriumchlorid) pH 7,4	

4.2.2 DNA-Extraktion

QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN, Hilden, CA
PBS	GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA
Ethanol 98-100 %	Roth, Braunschweig
Aqua dest	B. Braun, Melsungen
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Heizblock	

4.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Primer TLR4/Asp299Gly sense (s)	TIB MOLBIOL, Berlin
5'-GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCC <u>C</u> ATG-3'	
Primer TLR4/Asp299Gly antisense (as)	TIB MOLBIOL, Berlin
5'-GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC-3'	
Primer TLR4/Thr399Ile sense (s)	TIB MOLBIOL, Berlin
5'GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGAG <u>A</u> A-3'	
Primer TLR4/Thr399Ile antisense (as)	TIB MOLBIOL, Berlin
5'- <u>A</u> CCTGAAGACTGGAGAGTGAGTTAAATGCT-3'	
Qiagen PCR Buffer, 10× konzentriert, enthält:	QIAGEN, Hilden, CA
Tris Cl (Tris-hydroxymethyl-aminomethan-chlorid) KCl (NH ₄) ₂ SO ₄ (Natriumhydrogensulfat) 15 mM MgCl ₂ (Magnesiumdichlorid) pH 8,7 (20°C)	
MgCl ₂ solution, 25 mM	QIAGEN, Hilden, CA
Desoxyribonucleosidtriphosphat-Mix (dNTP)	Clontech, Heidelberg
dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM	
Aqua dest.	B.Braun, Melsungen
Taq DNA Polymerase	QIAGEN, Hilden, CA
Konzentration: 5 units/μl	
T3 Thermocycler	

4.2.4 Restriktionsenzym-Verdau

Restriktionsendonuclease <i>Nco</i> I	New England BioLabs, Braunschweig
NEBuffer 4:	New England BioLabs, Braunschweig
50 mM Kaliumacetat, 20 mM Tris-acetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM Dithiothreitol	
Restriktionsendonuclease <i>Hinf</i> I	New England BioLabs, Braunschweig
NEBuffer 3	New England BioLabs, Braunschweig
Aqua dest.	B.Braun, Melsungen
Mini Oven MK II	MWG-Biotech, Ebersberg

4.2.5 Gelelektrophorese

Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Agarose GTQ, 1 % Agarose-Gel	Roth, Braunschweig
Biozym agarose, 0,75 % Nusieve	Biozym, Hessisch Oldendorf
Gelelektrophoresekammer	Febikon, Wermelskirchen
5×TBE, auf 1×TBE verdünnen	Roth, Braunschweig
(Tris-Base 54 g, Borsäure 27,5 g, 3,7 g oder 0,5 M (pH 8,0) 20 ml EDTA; auf 1 Liter mit Aqua dest auffüllen)	
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
DNA-Längenmarker	New England BioLabs, Braunschweig
Eagle Eye II, Imaging Chemiluminescent Western Blotting	Stratagene, La Jolla, CA

4.3 Methoden

4.3.1 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse

Zur Untersuchung auf TLR4-Polymorphismen wurde von Patienten und Kontrollprobanden DNA-Material entnommen, unter Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt mit anschließendem Restriktionsendonukleasen-Verdau der PCR-Produkte. Durch Gelelektrophorese wurden die unterschiedlich langen und schweren Schnittfragmente aufgetrennt und mittels des Farbstoffes Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Diese Methode wird als Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP) bezeichnet.

4.3.2 Entnahme des Zellmaterials (Wangenschleimhautabstrich)

Zur Untersuchung des Genoms der Patienten und Kontrollpersonen wurden Abstriche der Wangenschleimhaut verwendet. Vor Entnahme wurde der Mund gründlich ausgespült und die Wangenschleimhaut getrocknet, damit möglichst wenig Speichel aufgesaugt wird. Der sterile Wattetupfer wurde etwa zehn Sekunden kräftig an der Wangenschleimhaut gerieben und anschließend sofort gründlich in drehenden Bewegungen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Schraubverschluss in 200 µl steriler Pufferlösung ausgepresst. Nach sorgfältigem Verschluss wurden sie bei -20°C aufbewahrt.

4.3.3 DNA-Aufreinigung

Im Anschluss wurde eine DNA-Extraktion mittels QIAamp DNA Mini Kit durchgeführt. Dabei wurde nach dem Herstellerprotokoll für Körperflüssigkeiten in folgender Weise vorgegangen. Zum Pipettieren wurden Spitzen mit Filtereinsatz verwendet, um Kontaminationen so gering wie möglich zu halten. Die DNA-Proben wurden bei Raumtemperatur gegebenenfalls auf das einheitliche Volumen von 200 µl mit PBS aufgefüllt. Zuerst wurden 20 µl Qiagen Protease in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, danach die 200 µl Probe dazugegeben und sorgfältig per Hand gemischt. Nach etwa 5 min Einwirkungszeit wurden 200 µl Lysepuffer AL dazu pipettiert, 15 s lang kräftig durchmischt und dann für 10 min bei 56°C inkubiert (vorbereiteter Heizblock). Nach diesen 10 min ist das Maximum an DNA-Ausbeute erreicht.

Nun wurden 200 µl Ethanol (96-100 %ig) hinzugefügt, 15 s gemischt und kurz zentrifugiert. Diese Mischung wurde nun sorgfältig in 2 ml Qiam Spin Column Gefäße überführt und zentrifugiert bei 6000 x g (8000 rpm) für 1 min. Danach wurde das Spin Column Gefäß in ein sauberes 2 ml Sammelgefäß umgesetzt, das Filtrat entsorgt. Anschließend wurde 500 µl Waschpuffer AW1 dazu pipettiert und wiederum zentrifugiert bei 6000 x g (8000 rpm) für 1 min, die Sammelgefäße erneuert, das Filtrat entsorgt. Nach Zugabe von 500 µl Waschpuffer AW2 wurde für 3 min bei 20000 x g (14000 rpm) zentrifugiert. Nun wurde das Spin Column Gefäß in ein steriles 1,5 ml Mikrozentrifugengefäß gesetzt, das Filtrat entsorgt. Direkt auf den Filter wurden 50 µl destilliertes Wasser pipettiert und nach etwa 10 min Einwirkungszeit bei Raumtemperatur abschließend zentrifugiert bei 6000 x g (8000 rpm) für 1 min. Diese DNA-Extrakte wurden bei -20°C aufbewahrt.

4.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht es, exakt definierte DNA-Abschnitte zu vervielfältigen. Diese Methode findet sehr häufig Anwendung und zeichnet sich durch hohe Sensitivität und Spezifität aus. Eine PCR zeigt folgenden grundsätzlichen Ablauf: Im ersten Denaturierungsschritt bei ca. 95°C wird die Doppelhelixstruktur der DNA in zwei Einzelstränge getrennt. Danach wird die Temperatur abgesenkt, um das Anlagern (*engl.*: „annealing“) der „primer“ an das jeweils entgegengesetzte Ende dieser Einzelstränge zu ermöglichen. Als Primer wird ein Molekül aus etwa 18-24 Basenpaaren bezeichnet (Oligonukleotid), dessen Sequenz das Gegenstück zu einem charakteristischen Abschnitt innerhalb der zu vervielfältigenden DNA darstellt. Die Annealingtemperatur ist von den Primern abhängig und liegt um 55°C. Die Primer dienen als Erkennungspunkt für die DNA-Polymerase und bilden den Anfang eines neu synthetisierten Stranges, der während des Elongationsschrittes durch die DNA-Polymerase vervollständigt wird. Das Temperatur-Optimum ist von der verwendeten Polymerase abhängig (zwischen 68 und 72°C). Im Anschluss folgt wiederum ein Denaturierungsschritt. Dieser Zyklus wird 30-50 mal wiederholt. Zum Schluss wird ein finaler Elongationsschritt durchgeführt, um sicher zu gehen, dass die Polymerase ihre Synthese beenden kann.

Die PCR erfolgte zeitlich getrennt für die TLR4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile. Die Protokolle basieren auf der Publikation von Lorenz et al., 2001 (Lorenz et al., 2001). Die Primer wurden so entwickelt, dass eine Unterscheidung von Wildtyp- und Mutanten-TLR4-Allelen möglich wird durch die Präsenz von Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme. Für beide Polymorphismen wurden die Sequenzen der Vorwärtsprimer so verändert, dass durch die PCR eine Restriktionsschnittstelle im entsprechenden Mutantenallel eingebaut wird. Der Mastermix (20 µl für den PCR-Ansatz von 5 µl Probe) wurde für beide Polymorphismen nach gleichem Protokoll (siehe **Tabelle 3**) hergestellt.

Tabelle 3: PCR-Protokoll für ein Reaktionsvolumen von 25 µl

Komponenten	Volumen in µl	Endkonzentration
Primer sense (s), 1 nM	2,5	40 pM
Primer antisense (as), 1 µM	2,5	40 pM
PCR Buffer, 10× konzentriert	2,5	1× konzentriert
MgCl ₂ solution, 25 mM	2	2 mM
dNTP-Mix, je 10 mM	2	je 200 µM
Aqua dest.	8,25	
Taq DNA Polymerase (5 units/µl)	0,25	1,25 units/Probe
DNA-Probe	5 µl	

Die Taq-DNA-Polymerase stammt aus *Thermophilus aquaticus*, einem hitzestabilen Bakterienstamm. Das Aktivitätsmaximum der Taq-Polymerase liegt bei 74°C und einem pH-Wert von über 8. Ihre Syntheserate liegt bei etwa 2800 Nukleotiden pro Minute. Um Kontaminationen auszuschließen, wurden zum Pipettieren des PCR-Ansatzes gefilterte Spitzen verwendet, und für jeweils etwa 20 Proben wurde ein Kontrollgefäß mit destilliertem Wasser mitgeführt. Die PCR fand unter folgenden Bedingungen statt: 95°C für 10 min, dann 40 Zyklen mit jeweils 95°C/30 s, 56°C/30 s und 72°C/25 s und schließlich 72°C für 5 min.

4.3.5 Restriktionsenzym-Verdau

An die PCR anschließend wurde die Reaktion mit der Restriktionsendonuklease durchgeführt. Diese Restriktionsenzyme erkennen je nach Spezifität 4 bis 8 Basenpaare in einem DNA-Strang und schneiden mit sehr hoher Präzision nur ihre Zielsequenz. Die Erkennungssequenzen sind meist Palindrome, d.h. symmetrische Basenabfolgen, die in beiden Strängen gleich sind. Die PCR-Produkte für den Polymorphismus Asp299Gly wurden mit dem Enzym Nco I verdaut. Nco I erkennt die Sequenz 5' CCATGG 3' (Palindrom) und schneidet nach dem ersten Cytosin. Für die Bestimmung des Polymorphismus Thr399Ile wird das Restriktionsenzym Hinf I verwendet, das die Sequenz 5' GANTC 3' erkennt und nach dem Guanin schneidet. Für einen Ansatz wurden 4 ml PCR-Produkt mit 4,5 µl destilliertem Wasser, 1 µl Puffer (NEBuffer 4 für Nco I, NEBuffer 2 für Hinf I) und 0,5 µl Enzym gemischt und bei 37°C über Nacht inkubiert.

4.3.6 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung unterschiedlicher Moleküle mittels Einwirkung eines elektrischen Feldes. Dabei laufen kürzere DNA-Stränge schneller als die längeren durch die Gelmatrix auf die Anode zu. Als Referenz dient eine DNA-Leiter mit Fragmenten bekannter Größe. Durch den Zusatz von Ethidiumbromid können die DNA-Banden unter UV-Licht (Eagle Eye II, Imaging Chemiluminescent Western Blotting, Strategene, La Jolla, CA) sichtbar gemacht werden. Für die Gelelektrophorese wurde ein Gel aus 1 % Agarose und 0,75 % Nusieve hergestellt. In 200 ml 1x Puffer werden dafür 3 g Agarose und 1,5 g Nu Sieve aufgelöst, gekocht bis die Lösung klar ist, mit 2 µl Ethidiumbromid versetzt und gegossen. Zu 10 µl Verdauprodukt wurden je 2 µl Bromphenolblau gegeben. Pro Geltasche wurden 10 µl dieses Gemisches aufgetragen und pro Reihe auf dem Gel möglichst eine Wasserkontrolle. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 Volt für etwa 90 min.

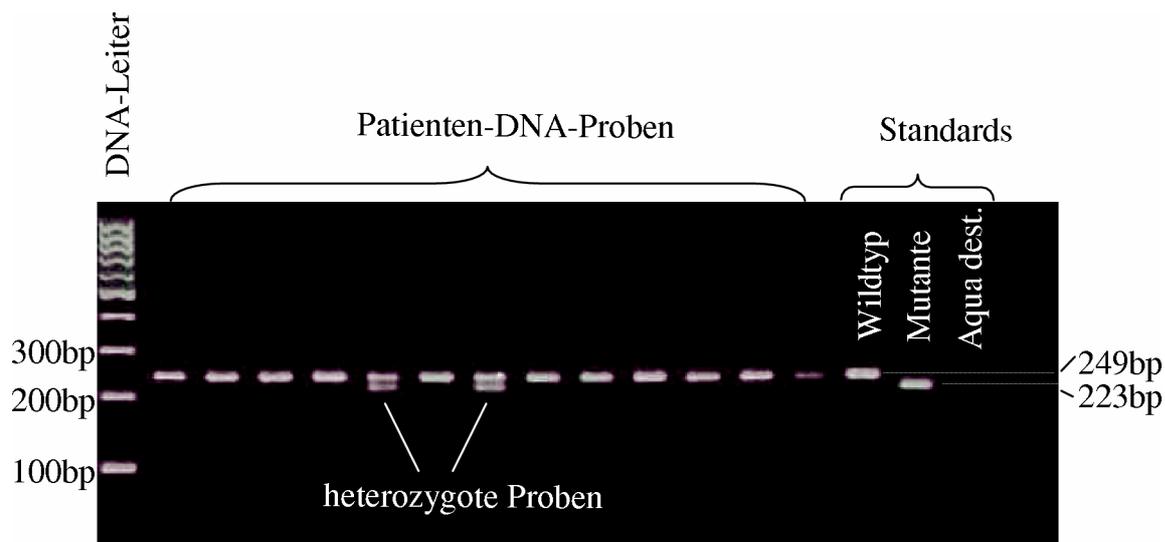


Abbildung 5: RFLP-Analyse für den Polymorphismus Asp299Gly/TLR4

Patienten-DNA wurde aufgereinigt und das Vorliegen des Asp299Gly Polymorphismus wurde wie in Materialien und Methoden beschrieben bestimmt. Zu Erkennen ist die typische Doppelbande bei Vorliegen eines Polymorphismus im heterozygoten Zustand.

Die durch PCR amplifizierten DNA-Fragmente zum Nachweis des Polymorphismus Asp299Gly/TLR4 sind 249 Basenpaare (bp) lang. Während des anschließenden Enzymverdaus mit Nco I wird vom Mutantenallel ein Fragment von 26 bp abgeschnitten. Bei heterozygoten SNP-Trägern werden somit zwei DNA-Banden sichtbar (249 bp/223 bp). Da die Wildtypfragmente keine Schnittstelle haben, erscheint nur eine Bande (249 bp). Die Fragmente von homozygoten Trägern würden vollständig auf 223 bp gekürzt werden. Es wäre eine Bande erkennbar (siehe Kontrollstandart/Mutation). Analog dazu haben die Wildtypfragmente des Polymorphismus Thr399Ile/TLR4 eine Länge von 409 bp. Vom Mutantenallel wird durch die Restriktionsendonuklease ein Fragment von 29 bp abgetrennt, sodass ein 380 bp langes Fragment resultiert.

4.4 Methode der Auswertung und Statistik

Um Zufallsfehler und Verzerrungen von Studienergebnissen möglichst gering zu halten, besteht die Möglichkeit der Paarbildung (*engl.*: „matching“; anpassen). Dieses gilt als um so sinnvoller, je stärker die Assoziation zwischen Matchingvariable und untersuchter Krankheit

ist. Es werden eine oder mehrere Matchingvariablen festgelegt. Diese basieren auf potentiellen Störfaktoren (Confoundern), die nicht den Gegenstand des Untersuchungsinteresses darstellen. Die Verteilung dieser Störfaktoren wird beim Matching so angelegt, dass sie in den zu vergleichenden Gruppen analog ist. In der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie wurde nach den Variablen Alter, Geschlecht und Raucherstatus gematcht. Es wurde ein individuelles 1:1-Matching durchgeführt, d.h. jeder konkreten Fallperson wurde randomisiert eine konkrete Kontrollperson zugeordnet. Das Altersmatching erfolgte durch Zuteilung einer Kontrollperson mit korrespondierendem Altersbereich.

Zur Erfassung und Auswertung des Datenmaterials wurden die Softwareprogramme SAS und SPSS sowie Excel für Windows genutzt. Die statistischen Werte wurden durch Anwendung der Software GraphPad Prism 4.0 (San Diego, USA) für Windows errechnet. Es wurde Pearsons Chi-Quadrat-Test mit zweiseitiger Fragestellung angewendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit der statistischen Auswertung wurde mit $\alpha = 0,05$ festgesetzt. Eine Nullhypothese wurde dann verworfen und das statistische Ergebnis als statistisch signifikant bezeichnet, wenn dieser Wert unterschritten wurde ($p < 0,05$).

5 Ergebnisse

5.1 Datencharakter der untersuchten Personen

Insgesamt wurden in dieser Studie 197 Patienten untersucht, die an generalisierter Parodontitis erkrankt waren. Von diesen wiederum wurden 116 Patienten aufgrund des klinischen Bildes der Gruppe der chronischen Parodontitis (CP) zugeordnet. Bei den anderen 81 Patienten wurde wegen des frühzeitigen Erkrankungsbeginnes und der ausgeprägten Progression eine aggressive Parodontitis (AP) diagnostiziert. Der Altersdurchschnitt aller 197 Fallpersonen betrug $49,8 \pm 11,9$ Jahre (Standardabweichung), wobei das Minimum bei 22 Jahren und das Maximum bei 81 Jahren lag. Der Altersmittelwert der CP Patienten betrug $57,1 \pm 8,8$ Jahre (Minimum 40; Maximum 81 Jahre). Das Durchschnittsalter der AP Patienten ergab $39,3 \pm 6,9$ Jahre (Minimum 22; Maximum 54 Jahre). Der ausgeprägte Unterschied dieser Werte zwischen beiden Gruppen ist durch die jeweiligen Klassifikationskriterien erklärbar (d.h. Erkrankungsdiagnose vor dem 40. Lebensjahr bedeutet Diagnose AP). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen CP und AP Patienten in Bezug auf die Geschlechtsverteilung und den Raucherstatus.

Im Einzelnen ergaben sich folgende Verteilungen (**Tabelle 4**): Die gesamte Studiengruppe setzte sich aus 112 Frauen und 85 Männern zusammen. Davon waren 68 Raucher und 129 Nichtraucher. In Betrachtung der 116 CP-Fälle gab es 71 Frauen und 45 Männer, von denen 42 Raucher und 74 Nichtraucher waren. Von 81 AP-Fällen waren 41 weiblich und 40 männlich, wobei 26 Raucher waren und 55 Nichtraucher. Die Kontrollgruppen, die für die statistische Auswertung der verschiedenen Patientengruppen verwendet wurden, sind aus einer Population mit insgesamt 349 parodontal gesunden Personen zusammengestellt worden. Aufgrund der 1:1-Paarbildung sind die Verteilungen nach Geschlecht und Raucherstatus in Kontrollgruppe und Parodontitisgruppe identisch. Der Altersmittelwert bezogen auf alle 197 Kontrollpersonen lag bei 43,7 mit einer Standardabweichung von ± 16 Jahren (Altersspanne von 22 - 83 Jahren). Die Kontrollpersonen für die 116 CP-Fälle hatten ein Durchschnittsalter von $55 \pm 10,5$ Jahren (Spanne von 40 - 83 Jahren) während die Kontrollen für die AP-Fälle im durchschnittlich $27,5 \pm 4,5$ Jahre alt waren (bei einer Spanne von 22 - 39 Jahren). Als Mittelwert der Sondierungstiefen der parodontalen Taschen aller 197 Parodontitispatienten ergaben sich 3,9 mm ($\pm 1,0$ mm Standardabweichung). Nur die Messungen der CP-Patienten

betrachtet, ergaben sich durchschnittlich 3,5 mm ($\pm 0,8$ mm). Die Mittelwerte der AP-Patienten lagen bei 4,6 mm ($\pm 1,0$ mm).

Tabelle 4: Datenübersicht der untersuchten Personen (* mit Standardabweichung)

	Parodontitisfälle			Kontrollpersonen (gematcht)		
	gesamt	CP	AP	gesamt	für CP	für AP
Anzahl	197	116	81	197	116	81
Frauen	112 (56,8 %)	71 (61,2 %)	41 (50,6 %)	112 (56,8 %)	71 (61,2 %)	41 (50,6 %)
Männer	85 (43,2 %)	45 (38,8 %)	40 (49,4 %)	85 (43,2 %)	45 (38,8 %)	40 (49,4 %)
Raucher	68 (34,5 %)	42 (36,2 %)	26 (32,1 %)	68 (34,5 %)	42 (36,2 %)	26 (32,1 %)
Nichtraucher	129 (65,5 %)	74 (63,8 %)	55 (67,9 %)	129 (65,5 %)	74 (63,8 %)	55 (67,9 %)
Altersmittel* (Jahre)	49 ($\pm 11,9$)	57,1 ($\pm 8,8$)	39,3 ($\pm 6,9$)	43,7 ($\pm 16,0$)	55,0 ($\pm 10,5$)	27,5 ($\pm 4,5$)
Altersspanne (Jahre)	22 - 81	40 - 81	22 - 54	22 - 83	40 - 83	22 - 39

5.2 Korrelation von CP-Fällen mit über 60jährigen Kontrollen ohne Parodontitis

Es sollte für die Gruppe mit chronischer Parodontitis unter Berücksichtigung der Altersstruktur eine spezielle Kontrollgruppe von Personen, die älter als 60 Jahre sind und noch mindestens 20 Zähne ohne Anzeichen von generalisierter chronischer Parodontitis haben, gebildet werden. Es zeigte sich, dass sich deren Zusammensetzung bezüglich des Raucherstatus stark von der CP-Patientengruppe unterschied, sodass bei dieser gesonderten Gegenüber-

stellung nur Nichtraucher einbezogen werden konnten. Außerdem ist das Geschlechterverhältnis zugunsten der Frauen verschoben. Es wurden 75 Kontrollen dieser Auswahl mit 75 CP-Patienten nach Altersbereich und Geschlecht zufallsgemacht. Es fanden 49 Frauen und 26 Männer Berücksichtigung. Der Altersmittelwert der Kontrollen liegt bei 67,5 Jahren \pm 5.4 (Spanne von 60 - 81 Jahren), der der Patienten bei 57,5 \pm 8,3 (Spanne von 40 - 75 Jahren). (Tabelle 5)

Tabelle 5: Datenübersicht CP/ über 60jährige Kontrollen ohne Parodontitis

(*Standardabweichung)

	Parodontitisfälle CP (gemacht)	Kontrollen (\geq 60 Jahre, parodontal gesund)
Personenzahl	75	75
Frauen	49 (65,3%)	49 (65,3%)
Männer	26 (38,8 %)	26 (38,8 %)
Nichtraucher	75 (100%)	75 (100%)
Altersmittelwert (J.)/*	57,5 \pm 8,3	67,5 \pm 5.4
Altersspanne (Jahre)	40 - 75	60 - 81

5.3 Polymorphismusverteilungen der Studiengruppen und statistische Auswertung

Es wurde das aus Wangenschleimhautabstrichen der Parodontitispatienten extrahierte genetische Material auf das Vorliegen der Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile des Toll-like-Rezeptors 4 hin untersucht. In Auswertung der Untersuchung wurden Patienten mit Ausprägung beider Polymorphismen in Kombination registriert, solche, die Träger nur einer von beiden Variationen waren und Patienten, die keinen der gesuchten Polymorphismen zeigten. Alle der identifizierten Polymorphismusträger waren heterozygot, d. h. nur eines der beiden für das Merkmal codierenden Allele war vom Basenaustausch betroffen. Ein homozygoter Polymorphismusträger wurde in der gesamten Untersuchung einschließlich der Kontrollpopulation nicht gefunden. Deshalb werden in den folgenden Abschnitten nur die

jeweiligen Frequenzen der Polymorphismusträger dokumentiert und nicht die Allelfrequenz (durch Halbieren des gegebenen Wertes zu errechnen). Die vorliegenden Daten wurden nach den Variablen Alter, Geschlecht und Raucherstatus gematcht (s.o.). Es wurde eine individuelle 1:1-Paarbildung durchgeführt, indem jedem Parodontitisfall eine konkrete passende Kontrollperson zugeordnet wurde. Die Werte für das Odds Ratio und die Konfidenzintervalle wurde mittels GraphPads Prism 4.0 errechnet.

5.3.1 Gesamte Parodontitisgruppe

Bezogen auf insgesamt 197 untersuchte Parodontitisfälle wurden 38 heterozygote Träger des kombinierten Haplotyps Asp299Gly/Thr399Ile identifiziert (19.3 % aller Patienten). Diese Frequenz war signifikant höher im Vergleich zur gematchten Kontrollgruppe, in der bei 14 von 197 Individuen (7,1 %) dieser Haplotyp auftrat. Das Odds Ratio (OR) für dieses Ergebnis beträgt 3,124 mit dem Konfidenzintervall (KI) von 1,633 bis 5,976 und einem p-Wert von 0.0005 (**Tabelle 6**). Bei insgesamt 5 der 197 Patienten (2,5 %) wurde nur jeweils einer der möglichen Polymorphismen Asp299Gly oder Thr399Ile isoliert gefunden, in 2 Fällen war es Asp299Gly und in 3 Fällen Thr399Ile (ausschließlich in der Gruppe mit chronischer Verlaufsform), wohingegen keiner der Kontrollprobanden diese einzeln auftretenden Polymorphismusformen zeigte. Das bedeutet, dass insgesamt 43 der 197 untersuchten Patienten mit generalisierter Parodontitis (21,8 % aller Patienten) Varianten des Toll-like-Rezeptors 4 aufwiesen, während 14 der 197 Kontrollprobanden (7,1 %) Polymorphismusträger waren (OR 3,650; KI {1,573; 8,467}; p-Wert 0,0001, **Tabelle 6**).

5.3.2 Gruppe mit chronischer Parodontitis

Aufgrund der Einteilung der Patientenpopulation nach klinischem Krankheitsbild in chronische, beziehungsweise aggressive Parodontitisform, wurden die Polymorphismushäufigkeiten separat für beide Untergruppen bestimmt. Von 116 Patienten mit chronischer Parodontitis wurden 22 Träger des kombinierten Haplotyps Asp299Gly/Thr399Ile gefunden (19,0 %). Dieses Verhältnis ist signifikant erhöht im Vergleich zur zugehörigen Kontrollgruppe, bei der in 6 von 116 Fällen (5,2 %) der kombinierten Haplotyp

Asp299Gly/Thr399Ile (OR 4,3; KI {1,67; 11,03}; p-Wert 0,002) nachgewiesen wurde. Berücksichtigt man auch die Träger der getrennt auftretenden Formen (2 mit Asp299Gly, 3 mit Thr399Ile), dann wurden zusammen 27 Polymorphismusträger unter 116 CP-Patienten festgestellt. Damit erhöht sich der signifikante Unterschied (p-wert 0,0001). Das Odds Ratio steigt auf 5,562 bei einem Konfidenzintervall von {2,199; 14,04} (**Tabelle 6**).

5.3.3 Gruppe mit aggressiver Parodontitis

Von den der aggressiven Verlaufsform zugeordneten 81 Patienten hatten 16 die kombinierte Rezeptorvariante Asp299Gly/Thr399Ile (19,8 %). Andere Varianten waren nicht ausgeprägt. In der zugehörigen Kontrollgruppe wurden 8 Fälle des Typs Asp299Gly/Thr399Ile gezählt. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen nachweisen (p-Wert 0,1203). (**Tabelle 6**)

Tabelle 6: Häufigkeiten und statistische Werte

TLR4-Varianten		gesamt (n = 197)	CP (n = 116)	AP (n = 81)
Asp299Gly und Thr399Ile	Patienten, n (%)	38 (19,3)	22 (19,0)	16 (19,8)
	Kontrollen, n (%)	14 (7,1)	6 (5,2)	8 (9,9)
	Odds Ratio	3,124	4,291	2,246
	95 % - KI	(1,633; 5,976)	(1,669; 11,03)	(0,902; 5,593)
	p-Wert	0,0005	0,002	0,1203
Asp299Gly oder Thr399Ile	Patienten, n (%)	5 (2,5)	5 (2,5)	0
	Kontrollen, n (%)	0	0	0
	Odds Ratio	11,29	11,49	
	95 % - KI	(0,619; 205,6)	(0,628; 210,4)	
	p-Wert	0,609	0,0598	
Summe aller Varianten	Patienten, n (%)	43 (21,8)	27 (23,3)	16 (19,8)
	Kontrollen, n (%)	14 (7,1)	6 (5,2)	8 (9,9)
	Odds Ratio	3,650	5,562	2,246
	95 % - KI	(1,573; 8,467)	(2,199; 14,04)	(0,902; 5,593)
	p-Wert	< 0,0001	0,0001	0,1203

5.3.4 CP-Gruppe und Kontrollgruppe der über 60-jährigen parodontal Gesunden

In der Kontrollgruppe der über 60-jährigen parodontal Gesunden wurde bei 4 von 75 Probanden der kombinierte Haplotyp Asp299Gly/Thr399Ile nachgewiesen (5,3 %). Andere Varianten traten nicht auf. Demgegenüber wurde die kombinierte Variante in der Gruppe der entsprechend zufallsgematchten CP-Gruppe in deutlich erhöhter Frequenz festgestellt (16 der 75 Fälle, 21,3 %). Der Unterschied ist statistisch signifikant (OR 4,814; Konfidenzintervall {1,526; 15,19}, p-Wert 0,007). Darüber hinaus wurde in 2 weiteren Fällen der Haplotyp Asp299Gly und in einem Fall Thr399Ile allein gefunden (gemeinsam 4 %), d.h. bei insgesamt 19 der 75 Patienten gab es Varianten des Toll-like-Rezeptors 4 (23,3 %). Dadurch wird das signifikante Ergebnis bekräftigt (Odds Ratio 6,022; KI {1,938; 18,72}, p-Wert 0,0011). (siehe **Tabelle 7**)

Tabelle 7: Häufigkeiten und statistische Werte der Kontrollen älter als 60/ CP-Gruppe (KI Konfidenzintervall, signifikante Werte hervorgehoben)

TLR4-Varianen		Patienten (CP) n = 75	Kontrollen (≥ 60 Jahre) n = 75
Asp299Gly und Thr399Ile	Anzahl	16 (21,3 %)	4 (5,3 %)
	Odds Ratio/ KI	4,814 (1,526; 15,19)	
	p-Wert	0,007	
Asp299Gly oder Thr399Ile	Anzahl	3 (4,0 %)	0
	Odds Ratio/ KI	7,290 (0,307; 143,7)	
	p-Wert	0,2450	
Summe aller Varianten	Anzahl	19 (25,3 %)	4 (5,3 %)
	Odds Ratio/ KI	6,022 (1,938; 18,72)	
	p-Wert	0,0011	

5.4 TLR4-Polymorphismus und Raucherstatus

Für alle untersuchten Patienten und Kontrollpersonen wurde ein Raucherstatus erhoben. Dabei wurde der Konsum von täglich 20 Zigaretten während eines Jahres als ein Raucherjahr (*engl.*: „pack year“) festgelegt. Der Gruppe der Raucher wurden Personen zugeordnet, für die sich mindestens 10 Raucherjahre errechnen ließen. Es wurde untersucht, in welchem Verhältnis die Anzahl von TLR4-Polymorphismusträgern der Parodontitisgruppe zur Kontrollgruppe steht, wenn Nichtraucher bzw. Raucher als getrennte Gruppen betrachtet werden.

5.4.1 Gesamte Parodontitispopulation und Raucherstatus

Der kombinierte Haplotyp Asp299Gly/Thr399Ile wurde signifikant häufiger (p-Wert 0,0032) in der Gruppe nichtrauchender Parodontitispatienten (26 von 129; 20,2 %) festgestellt im Vergleich zu den nichtrauchenden Kontrollpersonen (9 von 129; 7 %), OR 3,37; KI {1,51; 7,51}. Bei Betrachtung aller Polymorphismus-Varianten wird der Zusammenhang noch deutlicher (OR 3,87; KI {1,75; 8,55}; p-Wert 0,0007). Werden nur die Raucherdaten in analoger Weise ausgewertet, ergeben sich folgende Relationen: Während 12 der 68 rauchenden Parodontitispatienten den kombinierten Haplotyp Asp299Gly/Thr399Ile trugen, waren es 5 von 68 rauchenden Kontrollprobanden (OR 2,70; KI {0,90; 8,13}; p-Wert 0,1179). Bei Einbeziehung der seltenen Varianten Asp299Gly oder Thr399Ile lautet das Verhältnis der Polymorphismusträger 14 von 68 Parodontitispatienten zu 5 von 68 Kontrollpersonen (OR 3,27; KI {1,11; 9,66}; p-Wert 0,0457). Damit zeigt die Datenbeziehung statistische Signifikanz (**Tabelle 8**).

5.4.2 Gruppe mit chronischer Parodontitis und Raucherstatus

Bei Analyse der nichtrauchenden CP-Patienten kann ebenso eine höhere Frequenz von TLR4-Varianten im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Für den kombinierten Haplotyp ergibt sich ein p-Wert von 0,0123 (OR 4,45; KI {1,40; 14,14}). Dieser signifikante

Zusammenhang verstärkt sich noch, wenn alle Polymorphismusvarianten einbezogen werden (p-Wert 0,0021; OR 5,63; KI {1,80; 17,57}; **Tabelle 8**).

Von den 42 CP-Patienten mit positivem Raucherstatus wurden 7 als Träger des kombinierten Haplotyps identifiziert. Damit verglichen waren es 2 der 42 zugehörigen Kontrollpersonen (OR 4,00; KI {0,78; 20,54}; p-Wert 0,1555). Werden alle Rezeptorvarianten einschließlich der seltenen unabhängig voneinander auftretenden Haplotypen Asp299Gly oder Thr399Ile in die Analyse einbezogen, so ergibt sich ein Verhältnis von 9 CP-Patienten zu 2 Kontrollen mit Polymorphismus und damit eine signifikante Korrelation (OR 5,46; KI {1,10; 27,00}; p-Wert 0,0485). (**Tabelle 8**)

5.4.3 Gruppe mit aggressiver Parodontitis und Raucherstatus

Der Einfluss des Raucherstatus auf die Polymorphismusverteilungen wurde auch für die Gruppe mit aggressiver Parodontitis gesondert untersucht. Dabei ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zur zugehörigen Kontrollgruppe. Die statistischen Werte sind in **Tabelle 8** dokumentiert. In dieser Gruppe wurden keine Träger der isolierten Haplotypen identifiziert.

Tabelle 8: Häufigkeiten und statistische Werte bei Einteilung nach Raucherstatus
(signifikante Werte hervorgehoben)

TLR4- Varianten	Anzahl n	Nichtraucher			Raucher		
		Gesamt 129	CP 74	AP 55	Gesamt 68	CP 42	AP 26
Asp299Gly und Thr399Ile	Pat., n (%)	26 (20,2)	15 (20,3)	11 (20,0)	12 (17,7)	7 (16,7)	5 (19,2)
	Kontr., n (%)	9 (7,0)	4 (5,4)	5 (9,1)	5 (7,4)	2 (4,8)	3 (11,5)
	Odds Ratio	3,37	4,45	2.50	2,70	4,00	1.825
	Konfidenz- Intervall	(1,51; 7,51)	(1,40; 14,14)	(0.81; 7.76)	(0,90; 8,13)	(0,78; 20,54)	(0.39; 8.59)
	p-Wert	0,0032	0,0123	0.1751	0,1179	0,1555	0.7030
Asp299Gly oder Thr399Ile	Pat., n (%)	3 (2,3)	3 (4,1)	0 (0)	2 (2,9)	2 (4,8)	0 (0)
	Kontr., n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Odds Ratio	7,17	7,29		5,15	5,25	
	Konfidenz- Intervall	(0,37; 140)	(0,37; 143)		(0,24; 109)	(0,24; 112)	
	p-Wert	0,2471	0,2449		0,4963	0,4940	
Summe aller Varianten	Pat., n (%)	29 (22,5)	18 (24,3)	11 (20,0)	14 (20,6)	9 (21,4)	5 (19,2)
	Kontr., n (%)	9 (7,0)	4 (5,1)	5 (9,1)	5 (7,4)	2 (4,8)	3 (11,5)
	Odds Ratio	3,87	5,63	2.50	3,27	5,46	1.825
	Konfidenz- Intervall	(1,75; 8,55)	(1,80; 17,57)	(0.81; 7.76)	(1,11; 9,66)	(1,10,; 27,00)	(0.39; 8.59)
	p-Wert	0,0007	0,0021	0.1751	0,0457	0,0485	0.7030

6 Diskussion

6.1 Hinweise auf eine Rolle von genetischen Faktoren in der Pathogenese der Parodontitis

Für bestimmte Krankheiten sind Anfälligkeitsunterschiede in Abhängigkeit vom Genotyp gesichert. Bestes Beispiel ist die malariaprotektive Wirkung eines heterozygoten Status für Hämoglobin S, während homozygote Träger an Sichelzellanämie erkranken. Die hohe Frequenz des Sichelzell-Genotyps wurde durch natürliche Selektion erreicht (Allison, 1954). Ähnliche jedoch bisher nahezu unbekannt protektive Auswirkungen werden als Grund für das relativ häufige Vorkommen bzw. fast völlige Fehlen einiger Polymorphismen innerhalb bestimmter Populationen angeführt (Schroder und Schumann, 2005). Eine dänische Studie mit hoher Stichprobenzahl (etwa 1000) kam zu dem Ergebnis, dass Kinder, deren biologische Eltern einem frühzeitigen Tod durch eine Infektion erlagen, selbst ein 5,8-fach erhöhtes Risiko dafür in sich tragen (Sorensen et al., 1988).

Zwillingsstudien weisen darauf hin, dass Wirtsfaktoren eine wichtige Rolle in Pathogenese und Verlauf von Parodontalerkrankungen spielen (Michalowicz et al., 1991). Desweiteren wurde gezeigt, dass durch die Zytokine IL-1 und TNF- α , die als Reaktion auf eindringende Mikroorganismen vom Wirt freigesetzt werden, die Knochenresorption gesteigert wird (Stashenko et al., 1987; Stashenko et al., 1991). Die Ausschüttung dieser Zytokine wird durch die Interaktion von Toll-like-Rezeptoren mit bakteriellen Liganden wie z.B. das LPS Gram-negativer Bakterien hervorgerufen (Barton und Medzhitov, 2003). In dieser Studie sollte untersucht werden, ob sich die bekannten Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile des Toll-like-Rezeptors 4 auf Ausprägung, Verlauf und Schweregrad von Parodontitiden auswirken.

6.2 Assoziation des Asp299Gly/Thr399Ile Polymorphismus des TLR4 mit generalisierter CP

Der bekannte Haplotyp Asp299Gly/Thr399Ile des TLR4 wurde bei 38 von 197 Parodontitispatienten gefunden, im Vergleich zu 14 der 197 zugeordneten Kontrollpersonen.

Gemeinsam mit den selteneren Haplotypen Asp299Gly oder Thr399Ile (nicht in Kombination), die nur bei Fällen mit chronischer Parodontitis gefunden wurden, waren sogar 43 der 197 Parodontitispatienten Träger eines der 3 hier nachzuweisenden Haplotypen. (siehe Ergebnisteil, **Tabelle 6**) Diese 197 Patienten wurden noch einmal entweder der chronischen oder der aggressiven Verlaufsform zugeordnet. Von den 116 CP-Patienten zeigten 22 Fälle den Haplotyp Asp299Gly/Thr399Ile verglichen mit 6 der zugeordneten Kontrollen. Damit war der Unterschied statistisch signifikant. Werden die 5 Träger der seltenen Haplotypen dazugezählt, ergibt das ein Verhältnis von 27 Polymorphismusträgern der 116 chronisch Erkrankten zu 6 der 116 Kontrollen. Eine Tendenz in die entsprechende Richtung konnte auch für die AP-Gruppe festgestellt werden. Jedoch zeigt das statistische Ergebnis keine Signifikanz. Von 81 AP-Patienten trugen 16 den kombinierten Haplotyp, in der Kontrollgruppe waren es 8 Probanden. Das heißt, im Falle der chronischen Parodontitis deuten die Ergebnisse mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf den TLR4-Polymorphismus Asp299Gly/Thr399Ile bzw. Asp299Gly oder Thr399Ile als einen Risikofaktor hin. Die Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass chronische und aggressive Parodontitis zwei weitestgehend eigenständige Krankheitsbilder sind (Wiebe und Putnins, 2000).

6.3 TLR4-Polymorphismus und Raucherstatus

Diese positive Korrelation zeigt sich auch, wenn nur die Daten der Nichtraucher in gleicher Weise ausgewertet werden. Unter den 74 nichtrauchenden CP-Patienten waren 18 Polymorphismusträger, während nur 4 SNP-Träger in der entsprechenden Kontrollgruppe nachgewiesen wurden (p-Wert 0,0021; OR 5,63; KI {1,80; 17,57}; siehe **Tabelle 8** im Ergebnisteil). Diese deutlich signifikanten Daten stehen im Kontrast zu den Beobachtungen, die bei Untersuchungen von Varianten des Interleukin-1-Gen gemacht wurden, wonach IL-1-Polymorphismen bei einigen Untersuchern nur als Risikofaktor in Kombination mit dem Rauchen zu sehen sind (Kornman et al., 1997; Parkhill et al., 2000).

Die signifikanten Resultate, die bei Auswertung der Gruppe mit chronischer Parodontitis gematcht nach Alter, Geschlecht und Raucherstatus erzielt wurden, konnten durch den weiteren Vergleich der Daten der Gruppe mit chronischer Parodontitis mit denen der speziell ausgewählten Kontrollpopulation (über 60 Jahre alt, keine Zeichen generalisierter

Parodontitis, mehr als 20 Zähne) bestätigt werden. Diese Kontrollpopulation wurde aufgrund der hohen Prävalenz der chronischen Parodontitis von 50 % (10 - 15 % schwere Formen) (Papapanou, 1999) bzw. des gehäufteten Auftretens nach dem 60. Lebensjahr ausgewählt, um den Fehler möglichst klein zu halten. Neben der bekannten TLR4-Variante Asp299Gly/Thr399Ile in kombiniertem heterozygoten Status konnte in 5 Fällen chronischer Parodontitis seltene Varianten des Rezeptors beobachtet werden, indem ein Basenaustausch nur bei Asp299Gly oder Thr399Ile zu finden war. Für sich genommen, ist diese Verteilung wegen der zu geringen Fallzahl nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. Jedoch wird die Beobachtung, dass TLR4-Polymorphismen insgesamt ein Risikofaktor für chronische Parodontitis sein könnten, bekräftigt. (siehe **Tabelle 7**).

6.4 Korrelation von Asp299Gly/Thr399Ile mit anderen Krankheitsbildern

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen Übereinstimmung mit mehreren Studien, die einen positiven Zusammenhang dieser Polymorphismen mit bestimmten Krankheitsbildern festgestellt haben. Asp299Gly/Thr399Ile ist assoziiert mit herabgesetzter Empfindlichkeit (Hyporesponsivität) auf inhaliertes LPS (Arbour et al., 2000), einem erhöhten Schweregrad von allergiebedingtem Asthma (Yang et al., 2004), Infektionen durch Gram-negative Bakterien (Agnese et al., 2002), sowie bei septischem Schock (Lorenz et al., 2002) und RS-Virus-Erkrankungen (Tal et al., 2004). Zwei Veröffentlichungen, die eine mögliche Assoziation des kombinierten Haplotyp Asp299Gly/Thr399Ile mit Meningokokken-Meningitis untersuchten, stellten keinerlei signifikante Korrelationen fest (Read et al., 2001; Smirnova et al., 2003). Jedoch beschrieben Smirnova et al. eine höhere Frequenz der seltenen Varianten einschließlich der separat vorkommenden Haplotypen Asp299Gly und Thr399Ile bei Meningokokken-Infektion. Diese Beobachtung weist in eine ähnliche Richtung wie die hier beschriebenen Resultate. In einer weiteren Untersuchung wurde ein positiver Zusammenhang zwischen dem TLR4-SNP Asp299Gly und dem Risiko für Infektionen mit Gram-negativen Bakterien und für eine hämatogene Osteomyelitis dokumentiert. Homozygote Träger des Polymorphismus Asp299Gly waren signifikant häufiger unter den 80 Osteomyelitispatienten zu finden als in der Vergleichsgruppe mit 155 gesunden Probanden (3/80, 3.8% versus 0/155, 0%; $p = 0.038$ (Montes et al., 2006). Zusammenfassend läßt sich also feststellen, dass der Befund eines erhöhten Risikos von TLR4-Polymorphismusträgern an

einer infektiösen bzw. Infekt-assoziierten Erkrankung (der Parodontitis) zu erkranken, durch zahlreiche andere Studien gestützt wird.

6.5 Polymorphismus und Zytokininduktion nach LPS-Stimulation

Innerhalb der Originalpublikation, welche die hier untersuchten Polymorphismen des Toll-like-Rezeptors 4 zuerst darstellte, wurden auch in-vitro-Daten veröffentlicht, die besagen, dass THP-1-Zellen nach Transfektion der Variante auf LPS-Stimulation mit herabgesetzter Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen im Vergleich zum Wildtyp-Plasmid reagierten (Arbour et al., 2000). Diese Daten deuten darauf hin, dass diese SNPs einen hyporesponsiven Phänotyp zur Folge haben. Das konnte bestätigt werden durch Anwendung epithelialer Zellen von heterozygoten Spendern, die ebenfalls verringerte Mengen IL-1 ausschütteten (Arbour et al., 2000). Michel et al. untersuchten bei 116 gesunden Individuen die Spiegel von systemischen Entzündungsmarkern in Antwort auf LPS-Stimulation in Assoziation zu TLR4-SNPs (Michel et al., 1989). Dabei wurden bei den 18 heterozygoten Trägern der SNPs Asp299Gly oder Thr399Ile signifikant weniger weiße Blutzellen gezählt, niedrigere Mengen des C-reaktiven Proteins und von LBP gemessen. Interessant ist, dass von den 98 Wildtypprobanden 36 LPS-„high-responder“ waren, dagegen wurde nur einer der 18 SNP-Träger dieser Kategorie zugeordnet. Dies spricht für einen Einfluss dieser TLR4-SNPs auf die Erkennung von LPS. Im Gegensatz dazu wurden von Erridge et al. (2003) keinerlei Unterschied in der Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen aus Monozyten zwischen heterozygoten Probanden und Wildtypträgern registriert (Erridge et al., 2003). Von Aulock et al. (2003) fanden ebenfalls keine Unterschiede bei der Induktion pro-inflammatorischer Zytokine durch LPS-Stimulation des Vollblutes heterozygoter Spender, allerdings wurden signifikant niedrigere Mengen des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 gemessen (von Aulock et al., 2003). Das könnte bedeuten, dass der Phänotyp heterozygoter Individuen verschieden in Erscheinung tritt, abhängig davon, welche Zelltypen und welche Zytokinmuster untersucht wurden. So kann eine je nach Zelltyp variierende TLR4-Expression verantwortlich für diese Ergebnisse sein. Es gibt z.B. deutliche Unterschiede zwischen Fibroblasten und Epithelzellen desselben Individuum in der Rezeptorexpression (Kinane et al., 2006). Der Polymorphismus Asp299Gly beeinflusst scheinbar v.a. die LPS-Aktivierung von Stromazellen (Stützgewebezellen) und weniger die von Blutzellen. Diese Hypothese

wurde durch aktuelle Untersuchungsdaten bekräftigt, die zeigen, dass gingivale Epithelzellen von heterozygoten TLR4-SNP-Trägern abgeschwächt auf *PG*-LPS reagierten. Es wurden reduzierte Mengen von IL-6 and IL-8 gemessen (Kinane et al., 2006).

6.6 TLR4 Liganden in der Parodontitis

Die hier vorgestellten Daten weisen auf einen Einfluss von TLR4-Polymorphismen auf die Pathogenese der chronischen Parodontitis hin. Der Toll-like-Rezeptor 4 wird als der Rezeptor angesehen, der hauptsächlich verantwortlich für die Erkennung bakterieller Lipopolysaccharide ist (Barton und Medzhitov, 2003). Die Lipopolysaccharide zweier Bakterienspezies, die mit Parodontitis beim Menschen assoziiert sind, *Prevotella intermedia* und *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, wurden als Liganden des TLR4 identifiziert (Hashimoto et al., 2003; Suzuki et al., 2004). Das LPS der Spezies *Porphyromonas gingivalis*, dessen Parodontalpathogenität ebenfalls anerkannt ist (Socransky et al., 1998), wurde bisher als Ligand des Toll-like-Rezeptors 2 angesehen (Bainbridge und Darveau, 2001). Die chemische Struktur des *PG*-LPS unterscheidet sich deutlich von der des typischen LPS von *Escherichia coli* (Hirschfeld et al., 2001). Jedoch wurde bei einer weiteren Untersuchung mit hochgereinigtem Lipid A aus *Porphyromonas gingivalis* dessen alleinige Wechselwirkung mit TLR4 festgestellt, was die Frage hervorrief, ob die vorherigen Beobachtungen durch die Kontamination mit Lipoproteinen (TLR2-Liganden) verursacht worden sein könnten (Ogawa et al., 2002). Eine neuere Publikation unterstützt die Ansicht, dass das *PG*-LPS sowohl mit TLR2 als auch mit TLR4 interagiert (Darveau et al., 2004), und damit die Hypothese, dass die Aktivierung von TLR4 durch Parodontalkeime eine Rolle in der Entstehung der Parodontitis beitzen könnte.

6.7 Wie beeinflussen TLR4-Polymorphismen die parodontale Entzündung?

Bei Untersuchungen mit dem LPS-hyporesponsiven Mausstamm C3H/HeJ, dessen TLR4-Variante nicht funktionsfähig ist, wurde eine geringere Knochenresorption periapikal im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (Hou et al., 2000). Zusammen mit den hier beschriebenen Ergebnissen weisen diese Daten darauf hin, dass die Funktionsfähigkeit des TLR4 eine

mitbestimmende Rolle für die Pathogenese der Parodontitis einnimmt. TLR4 ist unter anderem auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen zu finden. Für diese Zellen wurde die Präsenz in entzündetem Gingivagewebe demonstriert (Mori et al., 2003). Makrophagen spielen eine bedeutende Rolle bei der Bekämpfung von Bakterien, die in den subgingivalen Raum eindringen (Kornman et al., 1997), was wiederum der Etablierung der Infektion entgegen wirkt. Andererseits können Zytokine, die als Antwort auf TLR4-Aktivierung u.a. von Makrophagen ausgeschüttet werden, sowie Entzündungsmediatoren aus Granulozyten eine schädigende Wirkung auf das parodontale Gewebe ausüben (Assuma et al., 1998; Stashenko et al., 1987; Stashenko et al., 1991; Waddington et al., 2000) und damit zu einer schwereren Ausprägung der Erkrankung führen.

Die hier gezeigten Daten deuten darauf hin, dass heterozygote Träger des Asp299Gly/Thr399Ile Polymorphismus ein höheres Risiko besitzen, an einer chronischen Parodontitis zu erkranken. Dieser SNP verändert die extrazelluläre Domäne des Rezeptors, die in erster Linie die Ligandenwechselwirkung steuert. Es gibt Hinweise darauf, dass dies eine herabgesetzte Aktivierbarkeit von Epithelzellen durch LPS hervorruft (Arbour et al., 2000). In Bezug auf den Effekt des Polymorphismus auf Entzündungszellen existieren jedoch widersprüchliche Ansichten. In der Erstbeschreibung der Variante durch Arbour *et al.* wurde eine eingeschränkte Zytokinfreisetzung in mit Asp299Gly/Thr399Ile transfizierten THP1-Zellen (einer humanen Monozyten/Makrophagen-Zelllinie) gezeigt (Arbour et al., 2000). Im Gegensatz dazu fand eine nachfolgende Studie keine Unterschiede in der durch LPS hervorgerufenen Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen in Vollblut von Probanden die heterozygot für Asp299Gly/Thr399Ile waren im Vergleich zu Probanden, die diese Variante nicht aufwiesen (von Aulock et al., 2003). Diese Unterschiede könnten dadurch hervorgerufen sein, dass einerseits differenzierte THP1-Zellen, die Makrophagen ähneln (Arbour et al., 2000), andererseits vornehmlich Monozyten untersucht wurden (von Aulock et al., 2003). Außerdem wurde kürzlich gezeigt, dass Gingival-Epithelzellen von Trägern der Asp299Gly/Thr399Ile Variante eine geringere Freisetzung von Zytokinen nach Stimulation mit *P. gingivalis* im Vergleich zu Kontrollen zeigen (Kinane et al., 2006). Unter der Annahme, dass der Asp299Gly/Thr399Ile-Polymorphismus die Aktivierbarkeit von Epithelzellen und Makrophagen durch Parodontalkeime herabsetzt, ließe sich postulieren, dass das höhere Risiko, als Träger/Trägerin der Variante, an einer CP zu erkranken, durch die leichtere Etablierung von Initialläsionen durch Parodontalkeime hervorgerufen sein könnte. In diesem

Szenario würde der Wirt zu spät und/oder zu schwach auf eingedrungene Mikroorganismen reagieren. Diese Hypothese wird durch Experimente in TLR- oder MyD88-defizienten Mäusen gestützt, die in bestimmten Infektionsmodellen eine verspätete, dann aber stärkere Immunantwort im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen zeigen (Naiki et al., 2005; Stenzel et al., 2008).

Andererseits wurde beschrieben, dass die Interleukin-10-Sekretion der Monozyten von Asp299Gly/Thr399Ile-Polymorphismusträgern, im Gegensatz zu pro-inflammatorischen Zytokinen, im Vergleich zum Wildtyp herabgesetzt ist (von Aulock et al., 2003). IL-10 hat anti-inflammatorische Eigenschaften, u.a. kann es die Freisetzung von IL-1, TNF- α und anderer Mediatoren aus den Makrophagen hemmen (de Waal Malefyt et al., 1991; Fiorentino et al., 1991). So könnte man spekulieren, ob diese geringeren Interleukin-10-Spiegel bei den Polymorphismusträgern aufgrund der eingeschränkten Gegenregulation zu einem übermäßigen Wirken der pro-inflammatorischen Zytokine führen könnten und dadurch zu lokalem Zerstören von Parodontalgewebe. Diese Hypothese wurde mit einer neueren Untersuchung bekräftigt, bei der eine hohe Anfälligkeit IL-10-defizienter Mäuse zur Ausbildung parodontaler Läsionen in einem Modell mit anaerober Mischinfektion festgestellt wurde (Al-Rasheed et al., 2003).

Beide dargestellten Hypothesen werden durch publizierte Daten gestützt, zu diesem Zeitpunkt kann allerdings keine abschließende Aussage über den exakten Mechanismus der gesteigerten CP-Inzidenz in TLR4-Polymorphismusträgern getroffen werden.

6.8 Weitere Studien zu Parodontitis und TLR4-Polymorphismen

Es wurden weitere Studiendaten zum Einfluss von TLR4-Polymorphismen auf die Parodontitis veröffentlicht, die den hier beschriebenen Daten teilweise widersprechen. Eine Studie über den Einfluss der Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile auf Parodontitis dokumentierte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Daten von Patienten- und Kontrollgruppe (Folwaczny et al., 2004). In dieser Studie wurden insgesamt 122 Patienten mit einer Altersstruktur von 25 bis 74 Jahren untersucht. Obwohl der jüngste Patient bei Diagnosestellung erst 25 Jahre alt war, was eine Zuordnung zur AP-Form bedeuten würde,

wurde für alle Patienten die Diagnose einer CP festgelegt. Die Einteilung in die drei Schweregrade mild, moderat und schwer ist als sehr subjektiv einzuschätzen, wird maßgeblich durch den momentanen Entzündungsstatus („aktives“ oder „ruhendes“ Stadium) bestimmt und ist deshalb kaum reproduzierbar. Diese ungewöhnliche Einteilung folgt außerdem nicht den empfohlenen Kriterien der AAP 1999, wonach chronische und aggressive Formen mit jeweils lokalisierter oder generalisierter Ausprägung unterschieden werden. Die von uns angewendeten Kriterien für generalisierte chronische Parodontitis trafen auf 52 Patienten dieser Studie zu, bei denen keine Einteilung in chronische und aggressive Form vorgenommen wurde. Bei der statistischen Analyse dieser Studie fanden ferner Geschlechtsverteilung, Altersunterschiede und Raucherstatus keine Berücksichtigung. In einer weiteren Studie wurden 100 Patienten mit diagnostizierter schwerer Erwachsenenparodontitis im Alter von 28 bis 66 Jahren auf die bekannten TLR4-Polymorphismen untersucht (Laine et al., 2005). Dass auch in dieser Studie keine Assoziation gefunden wurde, könnte daran liegen, dass das Alter bei der Diagnosestellung nicht ausreichend berücksichtigt wurde. Zudem wurde die Verteilung von Geschlecht und Raucherstatus unzureichend berücksichtigt. Von Brett et al. (2005) wurden Polymorphismusdaten für verschiedene Zytokine und TLR4 publiziert, die auf Untersuchung von 108 Patienten mit chronischer (n = 57) oder aggressiver Parodontitis (n = 51) basieren (Brett et al., 2005). Die Kontrollpopulation, bei der keinerlei parodontologische Befunde erhoben wurden, diente sowohl für die AP-Gruppe als auch für die CP-Gruppe als Bezugsgröße. Altersverteilung, Geschlecht und Raucherstatus wurden nicht berücksichtigt. Es wurde, in Übereinstimmung mit der hier vorgelegten Untersuchung eine höhere Frequenz des SNP Asp299Gly (14 % der Patienten versus 7 % der Kontrollen) festgestellt, jedoch ohne statistische Signifikanz. In der Publikation wird eine signifikante Assoziation des SNP Thr399Ile mit der gesamten Parodontitisgruppe beschrieben (7 % der Patienten versus 18 % der Kontrollen sind SNP-Träger) mit Angabe einer OR von 3,0. Aus den gezeigten Daten folgt allerdings eine protektive Beziehung. Auffällig ist die sehr hohe Frequenz von isoliert vorkommenden Thr399Ile Varianten, die in dieser Form bisher noch nicht dokumentiert, von den Autoren jedoch nicht näher erläutert wurde.

Bei kritischer Analyse dieser Studien fällt auf, dass sie im Vergleich zu der durch uns durchgeführten Untersuchung 1) nicht die Kriterien der AAP zur Diagnosestellung verwenden sowie 2) geringere Patientenzahlen untersucht wurden. In dieser Konstellation wäre es in Zukunft wichtig, eine auf AAP-Kriterien beruhende Studie unter Einschluß von größeren

Patientenzahlen durchzuführen, um unseren Befund eines erhöhten Risikos für TLR4-Polymorphismusträger, eine CP zu entwickeln, zu überprüfen.

6.9 Methodenkritik

In der Planungsphase der Studie gab es noch keine Literatur über den Zusammenhang von TLR4-Polymorphismen und Parodontitis. Es wurde deshalb eine Patientenzahl von etwa 100 Patienten pro Gruppe vorausgesetzt, um ein erstes statistisch aussagefähiges Ergebnis zu erreichen. Am Studienende lagen auswertbare Daten von 197 Patienten vor. Davon wurden 116 der Gruppe mit CP zugeordnet und 81 der AP-Gruppe. Die Anzahl der AP-Patienten ist unter Berücksichtigung des relativ seltenen Vorkommens dieser Form positiv einzuschätzen.

Patientenuntersuchungen und Diagnosestellung erfolgten überwiegend in der Abteilung Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin der Charité mit genau abgestimmten Gruppenkriterien (nach AAP 1999), bzw. in enger Kooperation. Systemische Defekte und Erkrankungen mit möglichem Einfluss auf parodontale Entzündungsprozesse wurden erfragt und hatten den Studienausschluss zur Konsequenz. Im Studienerfassungsbogen wurden wichtige Daten der allgemeinen und speziellen Anamnese dokumentiert. Da das Rauchen ein bestimmender Pathogenesefaktor der Parodontitis ist, wurde eine gründliche Raucheranamnese durchgeführt. Der Raucherstatus wurde nach der packyear-Methode als dichotome Größe festgelegt (siehe **Abschnitt 3.1**). Die Auswirkung sozialer Faktoren auf die Patientenpopulation ist nicht genau einschätzbar, jedoch ist ein breitgefächertes Bevölkerungsspektrum an einer Universitätsklinik in zentraler Lage zu erwarten. Die Mundhygiene-Indizes Approximalraum-Plaque-Index (API), (Lange et al., 1977) und Papillen-Blutungs-Index (PBI), (Saxer und Muhlemann, 1975) wurden routinemäßig während der Untersuchung zur Diagnosefindung erhoben, sind jedoch in diesem Studienrahmen nicht gesondert dokumentiert worden, da sie für die Zielstellung der Gesamtauswertung nicht relevant waren. Die Auswertbarkeit dieser Werte kann im Rahmen einer Folgestudie mit deutlich höheren Fallzahlen überprüft werden, allerdings ist die Eignung der Werte dafür kritisch zu betrachten, da sie sehr veränderlich sind.

Für die Parodontitispatienten ist ein Parodontalmessstatus mit sechs Messpunkten pro Zahn erstellt worden. Bei den CP-Patienten erfolgte das vorrangig im Studentenkurs unter Kontrolle der ausbildenden Parodontologen. Deshalb kam eine konventionelle

Parodontalsonde (PCP-UNC 15, Hu-Friedy, USA) zum Einsatz. Dagegen wurden die AP-Patienten von nur zwei speziell ausgebildeten Zahnärzten untersucht. Die Messungen der Sondierungstiefen (PD) und des klinischen Attachmentverlust (CAL) erfolgten mit einer druckkalibrierten elektronischen Parodontalsonde (Florida Probe FP 32 mit Software 3.0.6.8, Florida Probe Corporation, USA). Im Vergleich zur Verwendung der konventionellen Sonde zeichnet sich diese Messmethode durch eine höhere Reproduzierbarkeit und Präzision aus. Wegen des hohen finanziellen Aufwandes war die Anwendung dieser Methode jedoch im Studentenkurs nicht realisierbar. Um individuelle Messfehler so gering wie möglich zu halten und bestmögliche Vergleichbarkeit zu erreichen, sollten alle Messungen durch eine Person mit demselben Instrumentarium erfolgen. Diese idealen Bedingungen waren in dieser Studie mit relativ hohen Fallzahlen nicht erfüllbar. Für eine Folgestudie sollte der Einsatz von einheitlichen druckkalibrierten Parodontalsonden in Betracht gezogen werden. So könnten die Patientenpopulationen weiterführend nach den Sondierungswerten unterteilt werden mit detaillierter Analyse der Polymorphismusfrequenzen. Das wäre jedoch nur bei höheren Fallzahlen sinnvoll (mindestens 300 Probanden pro Gruppe). Der Röntgenstatus in Paralleltechnik ist eine anerkannte Methode zur Bewertung des Knochenabbaus bei Parodontalerkrankungen und zu Diagnosestellung. Eine spezielle mikrobiologische Diagnostik wurde nicht durchgeführt. Laut Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie dient sie vorrangig der Therapiebestimmung. Die Prävalenz parodontalpathogener Bakterien ist bei Patienten mit Parodontitis individuell unterschiedlich. Das Vorhandensein oder Fehlen bestimmter Spezies gestattet keine Klassifikation oder Diagnose der parodontalen Erkrankung (Mombelli et al., 2002). Allerdings könnte man quantitative Analysen bestimmter Spezies wie *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Prevotella intermedia*, deren LPS-Interaktion mit TLR4 anerkannt ist, zur Korrelation mit den Polymorphismusstaten der Patienten nutzen. Insgesamt wurden 349 Kontrollprobanden in Abstimmung auf die Besonderheiten von CP und AP (Altersstruktur der Patienten, Alter bei Erkrankungsbeginn) rekrutiert (siehe **Abschnitt 3.1**). Um den Zufallsfehler der Studienergebnisse möglichst gering zu halten, wurde ein randomisiertes Matching von Patienten- und Kontrollpopulation nach Alter, Geschlecht und Raucherstatus durchgeführt (siehe **3.4**).

Durch die Weiterentwicklung der Nomenklatur für Parodontalerkrankungen sollten einige Schwachpunkte der vorigen Einteilung berücksichtigt werden. Dazu kann folgendes Beispiel

angeführt werden: Die aggressive Form hieß vormals früh beginnende Parodontitis. Der Erkrankungsbeginn ist jedoch gar nicht eindeutig feststellbar und stimmt meist nicht mit dem Zeitpunkt der Diagnosestellung überein. Doch auch nach den neuen Kriterien ist die Zuordnung nicht völlig zweifelsfrei möglich. Ein Patient höheren Alters kann z.B. schon in jungen Jahren von der aggressiven Form betroffen gewesen sein, was zum Studienzeitpunkt nicht mehr eindeutig nachzuvollziehen ist. Hier muss die Verlaufsbeobachtung und die spezielle Symptomatik über die Zuordnung entscheiden. Andererseits lässt sich für einen Probanden der AP-Kontrollgruppe mit entsprechend niedrigem Alterswert nicht vorhersagen, ob er später doch an Parodontitis erkrankt. Um diesen Fehler möglichst klein zu halten, wurde ein konsequentes Altersmatching durchgeführt.

6.10 Folgerungen

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass Polymorphismen des Toll-like-Rezeptor 4 potentielle Risikofaktoren für die Entwicklung generalisierter chronischer Parodontitiden darstellen. Für die aggressive Form der Parodontitis wurde hier, in Übereinstimmung mit nachfolgenden Untersuchungen, keine signifikante Korrelation nachgewiesen. Die Unterschiede der Ergebnisse zwischen CP- und AP-Populationen in der vorliegenden Studie sprechen für die Sicht, dass es sich um relativ eigenständige Erkrankungen handelt (Wiebe und Putnins, 2000). Unsere Ergebnisse stützen die Ansicht, dass genetische Varianten von TLRs, insbesondere des TLR4, die Entstehung von Erkrankungen begünstigen bzw. deren Verlauf beeinflussen können.

Als problematisch sind die widersprüchlichen Ergebnisse anderer Untersucher zu TLR-Polymorphismen als Risikofaktoren der Parodontitis zu nennen. Es ist jedoch in diesem Zusammenhang darauf hinzuweisen, dass die hier vorgelegte Studie unserer Kenntnis zu Folge zu diesem Zeitpunkt das größte Patientenkollektiv umfasst. Darüber hinaus wurden dieser Untersuchung im Gegensatz zu anderen publizierten Studien die Kriterien der AAP zur Diagnostik zugrunde gelegt. Dennoch ist es wichtig, die hier gefundenen Ergebnisse unter Einschließung größerer Patienten-Kollektive zu überprüfen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die durch das Vorhandensein einer die Funktion von TLR4 beeinträchtigenden genetischen Variante die Entstehung einer CP begünstigt wird. Dieser Befund spricht für eine wichtige Rolle dieses Rezeptors in der Pathogenese der CP. Es läßt sich die Hypothese aufstellen, dass die veränderte Immunreaktion auf Gram-negative Parodontalkeime, wie *P. gingivalis* oder *P. intermedia* hierbei eine wichtige Rolle spielt. Es ist denkbar, dass es entweder zu einer insgesamt verminderten Reaktion auf eingedrungene Erreger kommt oder dass eine reduzierte Freisetzung von anti-inflammatorischen Zytokinen stattfindet.

7 Ausblick

Die hier gefundenen Daten weisen darauf hin, dass die TLR4-Genotypen Asp299Gly und Thr399Ile als prädisponierender Faktor für die chronische Parodontitis wirken. Zur Bestätigung dessen sollte eine weiterführende Fall-Kontroll-Studie mit höheren Fallzahlen durchgeführt werden. Dabei könnten für die Planung exaktere Daten bezüglich der individuellen Unterschiede der Rezeptorexpression in den beteiligten entzündlichen Geweben und während verschiedener Erkrankungsphasen hilfreich sein. Weitere Untersuchungen zur Sequenzierung der Toll-like-Rezeptoren und anderer an der TLR-Signalübertragung beteiligter Moleküle wären notwendig. In einer prospektiven Studie könnte der Therapieverlauf von Parodontitispatienten in Abhängigkeit von ihrem TLR4-Genotyp untersucht werden. Quantitative Analysen bestimmter Spezies wie *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Prevotella intermedia*, deren LPS-Interaktion mit TLR4 anerkannt ist, könnten mit den Polymorphismusstaten der Patienten korreliert werden.

8 Zusammenfassung

Parodontale Erkrankungen sind gekennzeichnet durch einen entzündungsbedingten Abbau der zahntragenden Gewebe. Neben der Lockerung und dem Verlust von Zähnen als Folge müssen auch mögliche Konsequenzen für den Gesamtorganismus durch die komplexen chronischen Entzündungsprozesse in Betracht gezogen werden. Der Entstehung und Manifestation der Parodontitis liegen Wechselwirkungen verschiedenster mikrobiologischer und wirtsspezifischer Faktoren zu Grunde. Dabei haben angeborene Immunvorgänge eine zentrale Bedeutung. Die Gruppe der Toll-like-Rezeptoren (TLRs) ist für die Erkennung mikrobiologischer Strukturen essentiell. Das Lipopolysaccharid (LPS) einiger Gram-negativer Parodontalkeime führt via TLR 4 zur Induktion pro-inflammatorischer Zytokine, z.B. des IL-1 und des TNF- α , die mit der Aggravation der Entzündung assoziiert sind. In der hier beschriebenen Fall-Kontroll-Studie sollte die Rolle der TLR4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile als Parodontitisrisikofaktoren untersucht werden.

Um den Genotyp eines Probanden zu bestimmen, wurde die Restriktionsfragment-Längenspolymorphismus-Analyse (RFLP) angewendet. Es erfolgte jeweils ein Zellabstrich der Wangenschleimhaut, anschließend die Extraktion der DNA, deren Amplifizierung durch Polymerase-Kettenreaktion und ein Verdau mit Restriktionsendonukleasen. Die Daten von 197 Parodontitispatienten gingen in die statistische Auswertung ein, von denen 116 der Gruppe mit chronischer Parodontitis und 81 der Gruppe mit aggressiver Parodontitis angehörten. Homozygote Träger der untersuchten Merkmale wurden nicht gefunden. In der CP-Gruppe war die Frequenz des kombinierten Haplotyps Asp299Gly/Thr399Ile gegenüber der gematchten Kontrollgruppe signifikant erhöht (OR 3,124; KI {1,633 bis 5,976}; p-Wert 0,0005). Bei isolierter Betrachtung nur der 74 Nichtraucher mit CP ergibt sich ebenso eine signifikante Assoziation: OR 4,45; KI {1,4 bis 14,14}; p-Wert 0,0123. Diese wurde wiederum festgestellt beim Vergleich mit einer speziellen Kontrollgruppe von über 60-jährigen parodontal Gesunden (OR 4,814; KI {1,526; 15,19}, p-Wert 0,007). Für die AP-Gruppe konnte keine signifikante Beziehung der Daten verzeichnet werden. Die Studienergebnisse deuten auf eine mögliche Rolle dieser TLR4-Polymorphismen als Risikofaktor für chronische Formen der Parodontitis hin. Der Zusammenhang sollte in einer weitergefassten Folgestudie überprüft werden.

Literaturverzeichnis

AAP (1999): 1999 International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999, Ann Periodontol 4 [1], Seite i, 1-112.

Agnese, D. M.; Calvano, J. E.; Hahm, S. J.; Coyle, S. M.; Corbett, S. A.; Calvano, S. E. und Lowry, S. F. (2002): Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections, J Infect Dis 186 [10], Seite 1522-5.

Al-Rasheed, A.; Scheerens, H.; Rennick, D. M.; Fletcher, H. M. und Tatakis, D. N. (2003): Accelerated alveolar bone loss in mice lacking interleukin-10, J Dent Res 82 [8], Seite 632-5.

Alexopoulou, L.; Holt, A. C.; Medzhitov, R. und Flavell, R. A. (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3, Nature 413 [6857], Seite 732-8.

Allison, A. C. (1954): Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection, Br Med J 1 [4857], Seite 290-4.

Anderson, K. V. und Nusslein-Volhard, C. (1984): Information for the dorsal--ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA, Nature 311 [5983], Seite 223-7.

Arbour, N. C.; Lorenz, E.; Schutte, B. C.; Zabner, J.; Kline, J. N.; Jones, M.; Frees, K.; Watt, J. L. und Schwartz, D. A. (2000): TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans, Nat Genet 25 [2], Seite 187-91.

Armitage, G. C. (1999): Development of a classification system for periodontal diseases and conditions, Ann Periodontol 4 [1], Seite 1-6.

Armitage, G. C. (2000): Development of a classification system for periodontal diseases and conditions, Northwest Dent 79 [6], Seite 31-5.

- Assuma, R.; Oates, T.; Cochran, D.; Amar, S. und Graves, D. T. (1998): IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis, *J Immunol* 160 [1], Seite 403-9.
- Bainbridge, B. W. und Darveau, R. P. (2001): Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide: an unusual pattern recognition receptor ligand for the innate host defense system, *Acta Odontol Scand* 59 [3], Seite 131-8.
- Barton, G. M. und Medzhitov, R. (2002): Toll-like receptors and their ligands, *Curr Top Microbiol Immunol* 270, Seite 81-92.
- Barton, G. M. und Medzhitov, R. (2003): Toll-like receptor signaling pathways, *Science* 300 [5625], Seite 1524-5.
- Beutler, B.; Hoebe, K.; Georgel, P.; Tabeta, K. und Du, X. (2005): Genetic analysis of innate immunity: identification and function of the TIR adapter proteins, *Adv Exp Med Biol* 560, Seite 29-39.
- Beutler, B. und Rietschel, E. T. (2003): Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin, *Nat Rev Immunol* 3 [2], Seite 169-76.
- Birkedal-Hansen, H. (1993): Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases, *J Periodontol* 64 [5 Suppl], Seite 474-84.
- Borrell, L. N. und Papananou, P. N. (2005): Analytical epidemiology of periodontitis, *J Clin Periodontol* 32 Suppl 6, Seite 132-58.
- Brett, P. M.; Zygogianni, P.; Griffiths, G. S.; Tomaz, M.; Parkar, M.; D'Aiuto, F. und Tonetti, M. (2005): Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis, *J Dent Res* 84 [12], Seite 1149-53.
- Brown, L. J. und Loe, H. (1993): Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease, *Periodontol* 2000 2, Seite 57-71.
- Chow, J. C.; Young, D. W.; Golenbock, D. T.; Christ, W. J. und Gusovsky, F. (1999): Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction, *J Biol Chem* 274 [16], Seite 10689-92.

Cimasoni, G. (1983): Crevicular fluid updated, Monogr Oral Sci 12, Seite III-VII, 1-152.

Cullinan, M. P.; Westerman, B.; Hamlet, S. M.; Palmer, J. E.; Faddy, M. J.; Lang, N. P. und Seymour, G. J. (2001): A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population, J Clin Periodontol 28 [12], Seite 1137-44.

da Silva Correia, J.; Soldau, K.; Christen, U.; Tobias, P. S. und Ulevitch, R. J. (2001): Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2, J Biol Chem 276 [24], Seite 21129-35.

Darveau, R. P.; Pham, T. T.; Lemley, K.; Reife, R. A.; Bainbridge, B. W.; Coats, S. R.; Howald, W. N.; Way, S. S. und Hajjar, A. M. (2004): Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4, Infect Immun 72 [9], Seite 5041-51.

de Waal Malefyt, R.; Haanen, J.; Spits, H.; Roncarolo, M. G.; te Velde, A.; Figdor, C.; Johnson, K.; Kastelein, R.; Yssel, H. und de Vries, J. E. (1991): Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression, J Exp Med 174 [4], Seite 915-24.

DiDonato, J. A.; Hayakawa, M.; Rothwarf, D. M.; Zandi, E. und Karin, M. (1997): A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B, Nature 388 [6642], Seite 548-54.

Diebold, S. S.; Kaisho, T.; Hemmi, H.; Akira, S. und Reis e Sousa, C. (2004): Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA, Science 303 [5663], Seite 1529-31.

Erridge, C.; Stewart, J. und Poxton, I. R. (2003): Monocytes heterozygous for the Asp299Gly and Thr399Ile mutations in the Toll-like receptor 4 gene show no deficit in lipopolysaccharide signalling, J Exp Med 197 [12], Seite 1787-91.

Fiorentino, D. F.; Zlotnik, A.; Mosmann, T. R.; Howard, M. und O'Garra, A. (1991): IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages, J Immunol 147 [11], Seite 3815-22.

Folwaczny, M.; Glas, J.; Torok, H. P.; Limbersky, O. und Folwaczny, C. (2004): Toll-like receptor (TLR) 2 and 4 mutations in periodontal disease, *Clin Exp Immunol* 135 [2], Seite 330-5.

Frey, E. A.; Miller, D. S.; Jahr, T. G.; Sundan, A.; Bazil, V.; Espevik, T.; Finlay, B. B. und Wright, S. D. (1992): Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide, *J Exp Med* 176 [6], Seite 1665-71.

Galbraith, G. M.; Steed, R. B.; Sanders, J. J. und Pandey, J. P. (1998): Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: influence of tumor necrosis factor genotype, *J Periodontol* 69 [4], Seite 428-33.

Genco, R. J.; Ho, A. W.; Grossi, S. G.; Dunford, R. G. und Tedesco, L. A. (1999): Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease, *J Periodontol* 70 [7], Seite 711-23.

Goldenberg, R. L. und Culhane, J. F. (2006): Preterm birth and periodontal disease, *N Engl J Med* 355 [18], Seite 1925-7.

Goyert, S. M.; Ferrero, E.; Rettig, W. J.; Yenamandra, A. K.; Obata, F. und Le Beau, M. M. (1988): The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors, *Science* 239 [4839], Seite 497-500.

Gutierrez-Venegas, G.; Kawasaki-Cardenas, P.; Cruz-Arroyo, S. R.; Perez-Garzon, M. und Maldonado-Frias, S. (2006): *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide stimulates the phosphorylation of p44 and p42 MAP kinases through CD14 and TLR-4 receptor activation in human gingival fibroblasts, *Life Sci* 78 [22], Seite 2577-83.

Hashimoto, C.; Hudson, K. L. und Anderson, K. V. (1988): The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein, *Cell* 52 [2], Seite 269-79.

Hashimoto, M.; Asai, Y.; Tamai, R.; Jinno, T.; Umatani, K. und Ogawa, T. (2003): Chemical structure and immunobiological activity of lipid A from *Prevotella intermedia* ATCC 25611 lipopolysaccharide, *FEBS Lett* 543 [1-3], Seite 98-102.

Hawn, T. R.; Verbon, A.; Janer, M.; Zhao, L. P.; Beutler, B. und Aderem, A. (2005): Toll-like receptor 4 polymorphisms are associated with resistance to Legionnaires' disease, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 [7], Seite 2487-9.

Hayashi, F.; Smith, K. D.; Ozinsky, A.; Hawn, T. R.; Yi, E. C.; Goodlett, D. R.; Eng, J. K.; Akira, S.; Underhill, D. M. und Aderem, A. (2001): The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5, *Nature* 410 [6832], Seite 1099-103.

Haziot, A.; Chen, S.; Ferrero, E.; Low, M. G.; Silber, R. und Goyert, S. M. (1988): The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage, *J Immunol* 141 [2], Seite 547-52.

Heil, F.; Hemmi, H.; Hochrein, H.; Ampenberger, F.; Kirschning, C.; Akira, S.; Lipford, G.; Wagner, H. und Bauer, S. (2004): Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8, *Science* 303 [5663], Seite 1526-9.

Hemmi, H.; Takeuchi, O.; Kawai, T.; Kaisho, T.; Sato, S.; Sanjo, H.; Matsumoto, M.; Hoshino, K.; Wagner, H.; Takeda, K. und Akira, S. (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA, *Nature* 408 [6813], Seite 740-5.

Hirschfeld, M.; Ma, Y.; Weis, J. H.; Vogel, S. N. und Weis, J. J. (2000): Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2, *J Immunol* 165 [2], Seite 618-22.

Hirschfeld, M.; Weis, J. J.; Toshchakov, V.; Salkowski, C. A.; Cody, M. J.; Ward, D. C.; Qureshi, N.; Michalek, S. M. und Vogel, S. N. (2001): Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages, *Infect Immun* 69 [3], Seite 1477-82.

Hodge, P. J.; Riggio, M. P. und Kinane, D. F. (2001): Failure to detect an association with IL1 genotypes in European Caucasians with generalised early onset periodontitis, *J Clin Periodontol* 28 [5], Seite 430-6.

Hoebe, K.; Du, X.; Georgel, P.; Janssen, E.; Tabeta, K.; Kim, S. O.; Goode, J.; Lin, P.; Mann, N.; Mudd, S.; Crozat, K.; Sovath, S.; Han, J. und Beutler, B. (2003): Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling, *Nature* 424 [6950], Seite 743-8.

Hoebe, K.; Janssen, E. M.; Kim, S. O.; Alexopoulou, L.; Flavell, R. A.; Han, J. und Beutler, B. (2003): Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways, *Nat Immunol* 4 [12], Seite 1223-9.

Hoshino, K.; Takeuchi, O.; Kawai, T.; Sanjo, H.; Ogawa, T.; Takeda, Y.; Takeda, K. und Akira, S. (1999): Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product, *J Immunol* 162 [7], Seite 3749-52.

Hou, L.; Sasaki, H. und Stashenko, P. (2000): Toll-like receptor 4-deficient mice have reduced bone destruction following mixed anaerobic infection, *Infect Immun* 68 [8], Seite 4681-7.

Imler, J. L. und Hoffmann, J. A. (2002): Toll receptors in *Drosophila*: a family of molecules regulating development and immunity, *Curr Top Microbiol Immunol* 270, Seite 63-79.

Imler, J. L. und Hoffmann, J. A. (2003): Toll signaling: the TIREless quest for specificity, *Nat Immunol* 4 [2], Seite 105-6.

Janeway, C. A., Jr. und Medzhitov, R. (2002): Innate immune recognition, *Annu Rev Immunol* 20, Seite 197-216.

Jensen, S. B.; Theilade, E. und Jensen, J. S. (1966): Influence of oral bacterial endotoxin on cell migration and phagocytic activity, *J Periodontal Res* 1 [2], Seite 129-40.

Kawai, T.; Adachi, O.; Ogawa, T.; Takeda, K. und Akira, S. (1999): Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin, *Immunity* 11 [1], Seite 115-22.

Kiechl, S.; Lorenz, E.; Reindl, M.; Wiedermann, C. J.; Oberhollenzer, F.; Bonora, E.; Willeit, J. und Schwartz, D. A. (2002): Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis, *N Engl J Med* 347 [3], Seite 185-92.

Kinane, D. F. (1998): Periodontal diseases' contributions to cardiovascular disease: an overview of potential mechanisms, *Ann Periodontol* 3 [1], Seite 142-50.

Kinane, D. F. und Chestnutt, I. G. (2000): Smoking and periodontal disease, *Crit Rev Oral Biol Med* 11 [3], Seite 356-65.

Kinane, D. F. und Hart, T. C. (2003): Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease, *Crit Rev Oral Biol Med* 14 [6], Seite 430-49.

Kinane, D. F.; Hodge, P.; Eskdale, J.; Ellis, R. und Gallagher, G. (1999): Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 and tumour necrosis factor loci in early-onset periodontitis, *J Periodontal Res* 34 [7], Seite 379-86.

Kinane, D. F.; Shiba, H.; Stathopoulou, P. G.; Zhao, H.; Lappin, D. F.; Singh, A.; Eskan, M. A.; Beckers, S.; Waigel, S.; Alpert, B. und Knudsen, T. B. (2006): Gingival epithelial cells heterozygous for Toll-like receptor 4 polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile are hypo-responsive to *Porphyromonas gingivalis*, *Genes Immun* 7 [3], Seite 190-200.

Kirschning, C. J. und Schumann, R. R. (2002): TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns, *Curr Top Microbiol Immunol* 270, Seite 121-44.

Kirschning, C. J.; Wesche, H.; Merrill Ayres, T. und Rothe, M. (1998): Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide, *J Exp Med* 188 [11], Seite 2091-7.

Kline, J. N.; Cowden, J. D.; Hunninghake, G. W.; Schutte, B. C.; Watt, J. L.; Wohlford-Lenane, C. L.; Powers, L. S.; Jones, M. P. und Schwartz, D. A. (1999): Variable airway responsiveness to inhaled lipopolysaccharide, *Am J Respir Crit Care Med* 160 [1], Seite 297-303.

Kobe, B. und Deisenhofer, J. (1995): A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands, *Nature* 374 [6518], Seite 183-6.

Kornman, K. S.; Crane, A.; Wang, H. Y.; di Giovine, F. S.; Newman, M. G.; Pirk, F. W.; Wilson, T. G., Jr.; Higginbottom, F. L. und Duff, G. W. (1997): The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease, *J Clin Periodontol* 24 [1], Seite 72-7.

Kornman, K. S.; Page, R. C. und Tonetti, M. S. (1997): The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players, *Periodontol* 2000 14, Seite 33-53.

Laine, M. L.; Morre, S. A.; Murillo, L. S.; van Winkelhoff, A. J. und Pena, A. S. (2005): CD14 and TLR4 gene polymorphisms in adult periodontitis, *J Dent Res* 84 [11], Seite 1042-6.

Lange, D. E.; Plagmann, H. C.; Eenboom, A. und Promesberger, A. (1977): [Clinical methods for the objective evaluation of oral hygiene], *Dtsch Zahnarztl Z* 32 [1], Seite 44-7.

Leeson, M. C. und Morrison, D. C. (1994): Induction of proinflammatory responses in human monocytes by particulate and soluble forms of lipopolysaccharide, *Shock* 2 [4], Seite 235-45.

Lemaitre, B.; Nicolas, E.; Michaut, L.; Reichhart, J. M. und Hoffmann, J. A. (1996): The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults, *Cell* 86 [6], Seite 973-83.

Lien, E.; Sellati, T. J.; Yoshimura, A.; Flo, T. H.; Rawadi, G.; Finberg, R. W.; Carroll, J. D.; Espevik, T.; Ingalls, R. R.; Radolf, J. D. und Golenbock, D. T. (1999): Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products, *J Biol Chem* 274 [47], Seite 33419-25.

Lindemann, R. A.; Economou, J. S. und Rothermel, H. (1988): Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides, *J Dent Res* 67 [8], Seite 1131-5.

Listgarten, M. A. (1976): Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study, *J Periodontol* 47 [1], Seite 1-18.

Loe, H. und Brown, L. J. (1991): Early onset periodontitis in the United States of America, *J Periodontol* 62 [10], Seite 608-16.

Loee, H.; Theilade, E. und Jensen, S. B. (1965): Experimental Gingivitis In Man, *J Periodontol* 36, Seite 177-87.

Lorenz, E.; Frees, K. L. und Schwartz, D. A. (2001): Determination of the TLR4 genotype using allele-specific PCR, *Biotechniques* 31 [1], Seite 22-4.

Lorenz, E.; Mira, J. P.; Frees, K. L. und Schwartz, D. A. (2002): Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock, *Arch Intern Med* 162 [9], Seite 1028-32.

Lund, J. M.; Alexopoulou, L.; Sato, A.; Karow, M.; Adams, N. C.; Gale, N. W.; Iwasaki, A. und Flavell, R. A. (2004): Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 [15], Seite 5598-603.

Marsh, P. D. (2004): Dental plaque as a microbial biofilm, *Caries Res* 38 [3], Seite 204-11.

Marth, G.; Yeh, R.; Minton, M.; Donaldson, R.; Li, Q.; Duan, S.; Davenport, R.; Miller, R. D. und Kwok, P. Y. (2001): Single-nucleotide polymorphisms in the public domain: how useful are they?, *Nat Genet* 27 [4], Seite 371-2.

Medzhitov, R. und Janeway, C. A., Jr. (1997): Innate immunity: impact on the adaptive immune response, *Curr Opin Immunol* 9 [1], Seite 4-9.

Medzhitov, R.; Preston-Hurlburt, P. und Janeway, C. A., Jr. (1997): A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity, *Nature* 388 [6640], Seite 394-7.

Meisel, P.; Siegemund, A.; Grimm, R.; Herrmann, F. H.; John, U.; Schwahn, C. und Kocher, T. (2003): The interleukin-1 polymorphism, smoking, and the risk of periodontal disease in the population-based SHIP study, *J Dent Res* 82 [3], Seite 189-93.

Michalowicz, B. S. (1994): Genetic risk factors for the periodontal diseases, *Compendium* 15 [8], Seite 1036, 1038, 1040 passim.

Michalowicz, B. S.; Aeppli, D.; Virag, J. G.; Klump, D. G.; Hinrichs, J. E.; Segal, N. L.; Bouchard, T. J., Jr. und Pihlstrom, B. L. (1991): Periodontal findings in adult twins, *J Periodontol* 62 [5], Seite 293-9.

Michel, O.; Duchateau, J. und Sergysels, R. (1989): Effect of inhaled endotoxin on bronchial reactivity in asthmatic and normal subjects, *J Appl Physiol* 66 [3], Seite 1059-64.

Mockenhaupt, F. P.; Cramer, J. P.; Hamann, L.; Stegemann, M. S.; Eckert, J.; Oh, N. R.; Otchwemah, R. N.; Dietz, E.; Ehrhardt, S.; Schröder, N. W.; Bienzle, U. und Schumann, R. R. (2006): Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 [1], Seite 177-82.

Mombelli, A.; Casagni, F. und Madianos, P. N. (2002): Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review, *J Clin Periodontol* 29 Suppl 3, Seite 10-21; discussion 37-8.

Montes, A. H.; Asensi, V.; Alvarez, V.; Valle, E.; Ocana, M. G.; Meana, A.; Carton, J. A.; Paz, J.; Fierer, J. und Celada, A. (2006): The Toll-like receptor 4 (Asp299Gly) polymorphism is a

risk factor for Gram-negative and haematogenous osteomyelitis, Clin Exp Immunol 143 [3], Seite 404-13.

Mori, Y.; Yoshimura, A.; Ukai, T.; Lien, E.; Espevik, T. und Hara, Y. (2003): Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis, Oral Microbiol Immunol 18 [1], Seite 54-8.

Moter, A.; Hoenig, C.; Choi, B. K.; Riep, B. und Göbel, U. B. (1998): Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease, J Clin Microbiol 36 [5], Seite 1399-403.

Nagai, Y.; Akashi, S.; Nagafuku, M.; Ogata, M.; Iwakura, Y.; Akira, S.; Kitamura, T.; Kosugi, A.; Kimoto, M. und Miyake, K. (2002): Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution, Nat Immunol 3 [7], Seite 667-72.

Naiki, Y.; Michelsen, K. S.; Schröder, N. W.; Alsabeh, R.; Slepkin, A.; Zhang, W.; Chen, S.; Wei, B.; Bulut, Y.; Wong, M. H.; Peterson, E. M. und Arditi, M. (2005): MyD88 is pivotal for the early inflammatory response and subsequent bacterial clearance and survival in a mouse model of *Chlamydia pneumoniae* pneumonia, J Biol Chem 280 [32], Seite 29242-9.

Newcomb, G. M. (1973): Host factors in the aetiology of periodontal disease, Aust Dent J 18 [4], Seite 207-11.

O'Neill, L. A. (2002): Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily, Curr Top Microbiol Immunol 270, Seite 47-61.

O'Neill, L. A. und Dinarello, C. A. (2000): The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense, Immunol Today 21 [5], Seite 206-9.

Ogawa, T.; Asai, Y.; Hashimoto, M.; Takeuchi, O.; Kurita, T.; Yoshikai, Y.; Miyake, K. und Akira, S. (2002): Cell activation by *Porphyromonas gingivalis* lipid A molecule through Toll-like receptor 4- and myeloid differentiation factor 88-dependent signaling pathway, Int Immunol 14 [11], Seite 1325-32.

Ozinsky, A.; Underhill, D. M.; Fontenot, J. D.; Hajjar, A. M.; Smith, K. D.; Wilson, C. B.; Schroeder, L. und Aderem, A. (2000): The repertoire for pattern recognition of pathogens by

the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors, Proc Natl Acad Sci U S A 97 [25], Seite 13766-71.

Page, R. C. (1991): The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease, J Periodontol Res 26 [3 Pt 2], Seite 230-42.

Page, R. C.; Offenbacher, S.; Schroeder, H. E.; Seymour, G. J. und Kornman, K. S. (1997): Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions, Periodontol 2000 14, Seite 216-48.

Papapanou, P. N. (1999): Epidemiology of periodontal diseases: an update, J Int Acad Periodontol 1 [4], Seite 110-6.

Papapanou, P. N.; Neiderud, A. M.; Sandros, J. und Dahlen, G. (2001): Interleukin-1 gene polymorphism and periodontal status. A case-control study, J Clin Periodontol 28 [5], Seite 389-96.

Parkhill, J. M.; Hennig, B. J.; Chapple, I. L.; Heasman, P. A. und Taylor, J. J. (2000): Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis, J Clin Periodontol 27 [9], Seite 682-9.

Paster, B. J.; Boches, S. K.; Galvin, J. L.; Ericson, R. E.; Lau, C. N.; Levanos, V. A.; Sahasrabudhe, A. und Dewhirst, F. E. (2001): Bacterial diversity in human subgingival plaque, J Bacteriol 183 [12], Seite 3770-83.

Poltorak, A.; He, X.; Smirnova, I.; Liu, M. Y.; Van Huffel, C.; Du, X.; Birdwell, D.; Alejos, E.; Silva, M.; Galanos, C.; Freudenberg, M.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Layton, B. und Beutler, B. (1998): Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene, Science 282 [5396], Seite 2085-8.

Qureshi, N.; Jarvis, B.; Takayama, K.; Sattar, N.; Hofman, J. und Stutz, P. (1998): Natural and synthetic LPS and lipid analogs or partial structures that antagonize or induce tolerance to LPS, Prog Clin Biol Res 397, Seite 289-300.

Read, R. C.; Pullin, J.; Gregory, S.; Borrow, R.; Kaczmarek, E. B.; di Giovine, F. S.; Dower, S. K.; Cannings, C. und Wilson, A. G. (2001): A functional polymorphism of toll-like receptor

4 is not associated with likelihood or severity of meningococcal disease, *J Infect Dis* 184 [5], Seite 640-2.

Ren, L.; Leung, W. K.; Darveau, R. P. und Jin, L. (2005): The expression profile of lipopolysaccharide-binding protein, membrane-bound CD14, and toll-like receptors 2 and 4 in chronic periodontitis, *J Periodontol* 76 [11], Seite 1950-9.

Rietschel, E. T.; Brade, H.; Holst, O.; Brade, L.; Muller-Loennies, S.; Mamat, U.; Zahringer, U.; Beckmann, F.; Seydel, U.; Brandenburg, K.; Ulmer, A. J.; Mattern, T.; Heine, H.; Schletter, J.; Loppnow, H.; Schonbeck, U.; Flad, H. D.; Hauschildt, S.; Schade, U. F.; Di Padova, F.; Kusumoto, S. und Schumann, R. R. (1996): Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification, *Curr Top Microbiol Immunol* 216, Seite 39-81.

Sachidanandam, R.; Weissman, D.; Schmidt, S. C.; Kakol, J. M.; Stein, L. D.; Marth, G.; Sherry, S.; Mullikin, J. C.; Mortimore, B. J.; Willey, D. L.; Hunt, S. E.; Cole, C. G.; Coggill, P. C.; Rice, C. M.; Ning, Z.; Rogers, J.; Bentley, D. R.; Kwok, P. Y.; Mardis, E. R.; Yeh, R. T.; Schultz, B.; Cook, L.; Davenport, R.; Dante, M.; Fulton, L.; Hillier, L.; Waterston, R. H.; McPherson, J. D.; Gilman, B.; Schaffner, S.; Van Etten, W. J.; Reich, D.; Higgins, J.; Daly, M. J.; Blumenstiel, B.; Baldwin, J.; Stange-Thomann, N.; Zody, M. C.; Linton, L.; Lander, E. S. und Altshuler, D. (2001): A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms, *Nature* 409 [6822], Seite 928-33.

Sato, S.; Sugiyama, M.; Yamamoto, M.; Watanabe, Y.; Kawai, T.; Takeda, K. und Akira, S. (2003): Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling, *J Immunol* 171 [8], Seite 4304-10.

Saxer, U. P. und Muhlemann, H. R. (1975): [Motivation and education], *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* 85 [9], Seite 905-19.

Schröder, N. W. und Schumann, R. R. (2005): Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease, *Lancet Infect Dis* 5 [3], Seite 156-64.

Schröder, N.W.J. und Schumann, R.R. (2005): Pattern Recognition, Kaufmann, S.H.E. und Steward, M.W., Tolpey Wilson's Microbiology and Microbial Infections Immunology Seite 109-131, Edward Arnold, London.

Schromm, A. B.; Lien, E.; Henneke, P.; Chow, J. C.; Yoshimura, A.; Heine, H.; Latz, E.; Monks, B. G.; Schwartz, D. A.; Miyake, K. und Golenbock, D. T. (2001): Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling, *J Exp Med* 194 [1], Seite 79-88.

Schumann, R. R. (1992): Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review, *Res Immunol* 143 [1], Seite 11-5.

Schumann, R. R.; Lamping, N.; Kirschning, C.; Knopf, H. P.; Hoess, A. und Herrmann, F. (1994): Lipopolysaccharide binding protein: its role and therapeutical potential in inflammation and sepsis, *Biochem Soc Trans* 22 [1], Seite 80-2.

Schwandner, R.; Dziarski, R.; Wesche, H.; Rothe, M. und Kirschning, C. J. (1999): Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2, *J Biol Chem* 274 [25], Seite 17406-9.

Schwartz, D. A. (1996): Grain dust, endotoxin, and airflow obstruction, *Chest* 109 [3 Suppl], Seite 57S-63S.

Schwartz, D. A.; Thorne, P. S.; Jagielo, P. J.; White, G. E.; Bleuer, S. A. und Frees, K. L. (1994): Endotoxin responsiveness and grain dust-induced inflammation in the lower respiratory tract, *Am J Physiol* 267 [5 Pt 1], Seite L609-17.

Shimazu, R.; Akashi, S.; Ogata, H.; Nagai, Y.; Fukudome, K.; Miyake, K. und Kimoto, M. (1999): MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4, *J Exp Med* 189 [11], Seite 1777-82.

Smirnova, I.; Mann, N.; Dols, A.; Derkx, H. H.; Hibberd, M. L.; Levin, M. und Beutler, B. (2003): Assay of locus-specific genetic load implicates rare Toll-like receptor 4 mutations in meningococcal susceptibility, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 [10], Seite 6075-80.

Socransky, S. S. und Haffajee, A. D. (2005): Periodontal microbial ecology, *Periodontol* 2000 38, Seite 135-87.

Socransky, S. S.; Haffajee, A. D.; Cugini, M. A.; Smith, C. und Kent, R. L., Jr. (1998): Microbial complexes in subgingival plaque, *J Clin Periodontol* 25 [2], Seite 134-44.

Socransky, S. S.; Haffajee, A. D.; Smith, C. und Duff, G. W. (2000): Microbiological parameters associated with IL-1 gene polymorphisms in periodontitis patients, *J Clin Periodontol* 27 [11], Seite 810-8.

Socransky, S. S. und Manganiello, S. D. (1971): The oral microbiota of man from birth to senility, *J Periodontol* 42 [8], Seite 485-96.

Sorensen, T. I.; Nielsen, G. G.; Andersen, P. K. und Teasdale, T. W. (1988): Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees, *N Engl J Med* 318 [12], Seite 727-32.

Stashenko, P.; Dewhirst, F. E.; Peros, W. J.; Kent, R. L. und Ago, J. M. (1987): Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption, *J Immunol* 138 [5], Seite 1464-8.

Stashenko, P.; Jandinski, J. J.; Fujiyoshi, P.; Rynar, J. und Socransky, S. S. (1991): Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease, *J Periodontol* 62 [8], Seite 504-9.

Stenzel, W.; Soltek, S.; Sanchez-Ruiz, M.; Akira, S.; Miletic, H.; Schluter, D. und Deckert, M. (2008): Both TLR2 and TLR4 are required for the effective immune response in *Staphylococcus aureus*-induced experimental murine brain abscess, *Am J Pathol* 172 [1], Seite 132-45.

Stuber, F.; Petersen, M.; Bokelmann, F. und Schade, U. (1996): A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis, *Crit Care Med* 24 [3], Seite 381-4.

Sugawara, S.; Uehara, A.; Tamai, R. und Takada, H. (2002): Innate immune responses in oral mucosa, *J Endotoxin Res* 8 [6], Seite 465-8.

Suzuki, T.; Kobayashi, M.; Isatsu, K.; Nishihara, T.; Aiuchi, T.; Nakaya, K. und Hasegawa, K. (2004): Mechanisms involved in apoptosis of human macrophages induced by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the presence of cycloheximide, *Infect Immun* 72 [4], Seite 1856-65.

Takii, R.; Kadowaki, T.; Baba, A.; Tsukuba, T. und Yamamoto, K. (2005): A functional virulence complex composed of gingipains, adhesins, and lipopolysaccharide shows high affinity to host cells and matrix proteins and escapes recognition by host immune systems, *Infect Immun* 73 [2], Seite 883-93.

Tal, G.; Mandelberg, A.; Dalal, I.; Cesar, K.; Somekh, E.; Tal, A.; Oron, A.; Itskovich, S.; Ballin, A.; Houry, S.; Beigelman, A.; Lider, O.; Rechavi, G. und Amariglio, N. (2004): Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease, *J Infect Dis* 189 [11], Seite 2057-63.

Taylor, G. W.; Burt, B. A.; Becker, M. P.; Genco, R. J.; Shlossman, M.; Knowler, W. C. und Pettitt, D. J. (1996): Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus, *J Periodontol* 67 [10 Suppl], Seite 1085-93.

Viriyakosol, S.; Tobias, P. S.; Kitchens, R. L. und Kirkland, T. N. (2001): MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide, *J Biol Chem* 276 [41], Seite 38044-51.

von Aulock, S.; Schroder, N. W.; Gueinzus, K.; Traub, S.; Hoffmann, S.; Graf, K.; Dimmeler, S.; Hartung, T.; Schumann, R. R. und Hermann, C. (2003): Heterozygous toll-like receptor 4 polymorphism does not influence lipopolysaccharide-induced cytokine release in human whole blood, *J Infect Dis* 188 [6], Seite 938-43.

Waddington, R. J.; Moseley, R. und Embery, G. (2000): Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases, *Oral Dis* 6 [3], Seite 138-51.

Werts, C.; Tapping, R. I.; Mathison, J. C.; Chuang, T. H.; Kravchenko, V.; Saint Girons, I.; Haake, D. A.; Godowski, P. J.; Hayashi, F.; Ozinsky, A.; Underhill, D. M.; Kirschning, C. J.; Wagner, H.; Aderem, A.; Tobias, P. S. und Ulevitch, R. J. (2001): Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism, *Nat Immunol* 2 [4], Seite 346-52.

Wiebe, C. B. und Putnins, E. E. (2000): The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology--an update, *J Can Dent Assoc* 66 [11], Seite 594-7.

Williams, R. C. (1990): Periodontal disease, *N Engl J Med* 322 [6], Seite 373-82.

Winkler, J. R. und Murray, P. A. (1987): Periodontal disease. A potential intraoral expression of AIDS may be rapidly progressive periodontitis, *Cda J* 15 [1], Seite 20-4.

Wright, S. D.; Ramos, R. A.; Tobias, P. S.; Ulevitch, R. J. und Mathison, J. C. (1990): CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein, *Science* 249 [4975], Seite 1431-3.

Xu, Y.; Tao, X.; Shen, B.; Horng, T.; Medzhitov, R.; Manley, J. L. und Tong, L. (2000): Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains, *Nature* 408 [6808], Seite 111-5.

Yamamoto, M.; Sato, S.; Hemmi, H.; Uematsu, S.; Hoshino, K.; Kaisho, T.; Takeuchi, O.; Takeda, K. und Akira, S. (2003): TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway, *Nat Immunol* 4 [11], Seite 1144-50.

Yang, R. B.; Mark, M. R.; Gray, A.; Huang, A.; Xie, M. H.; Zhang, M.; Goddard, A.; Wood, W. I.; Gurney, A. L. und Godowski, P. J. (1998): Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling, *Nature* 395 [6699], Seite 284-8.

Zarewych, D. M.; Kindzelskii, A. L.; Todd, R. F., 3rd und Petty, H. R. (1996): LPS induces CD14 association with complement receptor type 3, which is reversed by neutrophil adhesion, *J Immunol* 156 [2], Seite 430-3.

Zhang, D. X. und Hewitt, G. M. (2003): Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects, *Mol Ecol* 12 [3], Seite 563-84.

Danksagung

An dieser Stelle danke ich meinem Betreuer Herrn Prof. Ralf Schumann für die Überlassung des interessanten Themas dieser Arbeit und die Möglichkeit zur Durchführung der Laboruntersuchungen innerhalb seiner Arbeitsgruppe.

Frau Dr. Annette Moter und Vesna Haban der Arbeitsgruppe von Prof. Göbel danke ich für die sehr bereitwillige Überlassung zahlreicher Patientenproben und einige spezielle Ideen zur Überwindung labortechnischer Problematiken.

Weiterhin gilt mein Dank der Abteilung Parodontologie des zahnmedizinische Zentrum der Charité-Universitätsmedizin Berlin, insbesondere Herrn Dr. Dogan Kaner und Herrn Dr. Peter Purucker für die Unterstützung in der Planungsphase der Studie mit ihren konstruktiven Kritikpunkten aus parodontologischer Sicht und die Ermöglichung bzw. Durchführung der Patientenuntersuchungen in ihrer Abteilung. Ich danke außerdem Frau Dr. Christan, die weitere Untersuchungsdaten aus eigener parodontologischer Praxis zur Verfügung stellte.

Herrn Dr. Schirmer gilt mein besonderer Dank für die spontane Mithilfe beim Sammeln von Studiendaten in der Anfangsphase und seine regelmäßige Remotivation in der Durchführung der Arbeit. Ich möchte mich selbstverständlich bei allen Patienten bedanken, die bereit waren, an der Studie teilzunehmen, insbesondere den Patienten meiner eigenen Praxis für ihr Verständnis und so manches ermutigende Gespräch. Nicht zuletzt danke ich Frau Heike Rothenburg für ihren tatkräftigen Beistand.

Im Labor der AG Schumann danke ich stellvertretend für alle, die sich Zeit für meine neugierigen Fragen genommen haben, den beiden TA's Fränzi und Sabine für ihre freundliche hilfsbereite Art. Außerdem sage ich Valeska herzlichen Dank für die angenehme Zusammenarbeit. Nicolas danke ich vor allem für seine geduldige Hilfestellung bei den praktischen Arbeiten und seine ausdauernde Ermutigung in der Schreibphase der Arbeit.

Schließlich möchte ich meiner Mutter lieben Dank aussprechen für ihr Verständnis und die finanzielle Unterstützung meines Studiums durch meine Eltern, wie auch meiner Familie und meinen Freunden.

Lebenslauf

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

Eidstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertationsschrift von mir selbst ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die verwendete Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

N.W.J. Schröder, **D. Meister**, V. Wolff, C. Christan, D. Kaner, V. Haban, P. Purucker, C. Hermann, A. Moter, U.B. Göbel, und R.R. Schumann.

Chronic Periodontal Disease is Associated with Single-Nucleotide Polymorphisms of the Human TLR-4 Gene.

Genes Immun. 6: 448-451. 2005.