

Int Poster J Dent Oral Med 2010, Vol 12 No 2, Poster 489

# Der Einfluss von SNPs im CD14- und TLR4-Gen auf die subgingivale Besiedlung mit Parodontopathogenen

**Sprache:** Deutsch

**Autoren:**

Dr. Susanne Schulz, Dr. Jana Klapproth, Dr. Uta Zimmermann, Prof. Dr. Hans-Günter Schaller, PD Dr. Stefan Reichert, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie  
 Yvonne Reichert,  
 Private Zahnarztpraxis, Halle (Saale)  
 Dr. med. dent. Jamal M. Stein,  
 RWTH Aachen, Klinik für Zahnerhaltung und Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde  
 Dr. Christiane Gläser,  
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie

**Datum/Veranstaltung/Ort:**

05.-07.11.2009  
 Deutscher Zahnärztetag 2009  
 München, Deutschland

Poster Award

2. Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie

**Einleitung**

Als ein entscheidender Auslöser entzündlicher Parodontitiden wird die subgingivale Besiedlung mit parodontopathogenen Bakterien angesehen. Bei der nachfolgenden Immunantwort spielen CD14 und Toll like receptor 4 (TLR4) als Rezeptoren für bakterielle LPS-LBP-Komplexe eine wichtige Rolle. Funktionell wichtige Polymorphismen wurden für beide Gene beschrieben:

CD14: c.-159C>T, TT-Genotyp erhöht die CD14-Transkriptionsrate, Hubacek et al., 1999  
 TLR4: Asp299Gly, Gly-Allel mit verminderter LPS-Sensibilität assoziiert, Rhallabandi et al., 2006  
 Thr399Ile, Ile-Allel mit verminderter LPS-Sensibilität assoziiert, Rhallabandi et al., 2006

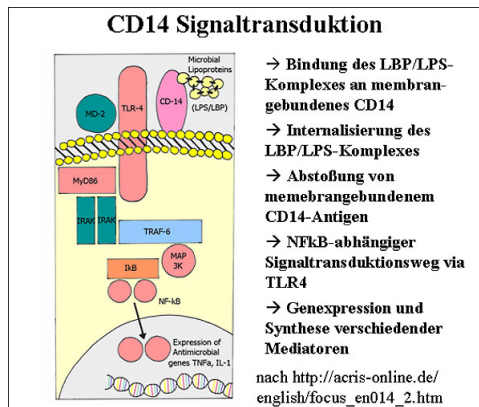
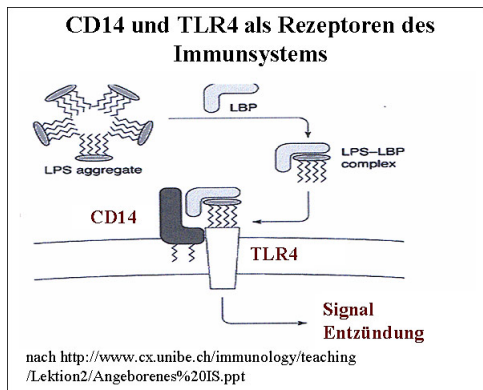


Abb. 1 und 2: CD14 und TLR4 als Rezeptoren des Immunsystems

**Problemstellung**

Ziel der Studie: In der vorliegenden Studie sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen den Polymorphismen im CD14- sowie TLR4-Genen und dem Auftreten von chronischer (CP) und/oder aggressiver (AP) Parodontitis untersucht werden. Darüber hinaus sollten mögliche Assoziationen zur subgingivalen Keimbildung (Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A.a.), Porphyromonas gingivalis (P.g.), Prevotella intermedia (P.i.), Tannerella forsythensis (T.f.), Treponema denticola (T.d)). Die Assoziationsuntersuchungen wurden unter Berücksichtigung weiterer Kofaktoren für Parodontitis durchgeführt.

**Material und Methoden**

## Einschlusskriterien der Patienten

### Generalisierte aggressive Parodontitis (AP, n=73):

Erkrankungsbeginn vor dem 35. Lebensjahr  
Attachmentverlust > 4mm an mindestens 30% der Zähne  
> 3 betroffenen Zähne, keine Inzisivi oder erste Molaren  
Missverhältnis zwischen Menge mineralisierter Plaque und Attachmentverlust

### Generalisierte chronische Parodontitis (CP, n=60):

Attachmentverlust > 4mm an mindestens 30% der Zähne  
Attachmentverlust konsistent zur Akkumulation mineralisierter Plaque

### Kontrollprobanden ohne Parodontitis (n=80):

Sondiertiefe < 3.5mm  
Kein Attachmentverlust durch Parodontitis (Ausnahmen: Attachmentverlust infolge überkonturierter Restaurationen, Putztraumata)

## Genomische Untersuchungen

### DNA-Isolation

Die DNA-Präparation der genomischen DNA aus humanem venösen EDTA-Blut erfolgte mittels "blood extraction kit" (Quiagen, Hilden).  
200µl EDTA-Blut wurden zur Zellyse mit 20 µl Protease versetzt.  
Nach der Zugabe von 200 µl Lysispuffer AL wurde die Probe 15 sec gevortext und für 10 min bei 56°C inkubiert.  
200 µl Ethanol wurde zugegeben, der Ansatz gevortext und auf eine Säule (QIAamp Spin Column) gegeben.  
Nach 2maligem Waschen (Puffer AW1 und AW2) der an die Säule gebundenen DNA wurde die DNA durch Zentrifugation getrocknet.  
Die DNA wurde mit 200µl aqua dest. 5min inkubiert und von der Säule gelöst.  
Subgingivale Bestimmung von 5 parodontopathogenen Leitkeimen

### Probengewinnung und DNA-Isolation

Die Plaqueproben wurden mit sterilen Papierspitzen aus der tiefsten Tasche jedes Quadranten entnommen und gepoolt.  
Die bakterielle DNA wurde mittels QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen, Hilden) isoliert.  
Die Papierspitzen wurden mit 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Pproteinase K für 10min bei 70°C inkubiert.  
200 µl Lysispuffer Al wurde hinzugegeben und 5min bei 95°C inkubiert.  
Der Ansatz (ohne Filterspitzen) wurde auf eine Säule (QIAamp Spin Column) pipettiert und 2 mal mit Puffer AW1 und AW2 gewaschen.  
Die DNA wurde in 400µl AE-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

### PCR

Für die spezifische Amplifikation von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi), *Tannerella forsythensis* (Tf) und *Treponema denticola* (Td) wurde der micro-Ident® test von HAIN-Diagnostik (Lifesience, Nehren) benutzt. Mastermix (Puffer, biotinylierte Primer, DNA als Positivkontrolle), 2U Taq-Polymerase (Eppendorf, Hamburg), und 5 µl der isolierten bakteriellen DNA wurden gemixt.  
PCR: 5 min 95°C; 10 Zyklen: 30 sec 95°C, 2 min 58°C; 20 Zyklen: 25 sec 95°C, 40 sec 53°C, 40 sec 70°C; 8 min 70°C  
Die PCR-Produkte wurden im ethidiumbromidhaltigen 1%igen Agarosegel aufgetrennt.

### Hybridisierung

20 µl des PCR-Produkts und 20 µl der Denaturierungslösung wurden für 5 min inkubiert.  
1 ml Hybridisierungspuffer (vorgewärmt auf 45°C) wurde dazugegeben.  
Gabe dieser Lösung zur Membran, vorhybridisiert mit bakterieller DNA und Positivkontrollen.  
Inkubation bei 45°C für 30 min im Schüttelwasserbad.  
Membran wurde mit 1 ml "stringent wash solution" bei 45°C für 15 min gewaschen.  
1 ml der Konjugatlösung wurde hinzugegeben (Raumtemp., 30 min).  
Waschen der Membran und Inkubation mit 1 ml der Substratlösung.  
Nachweis der Bakterien erfolgte visuell (Farbreaktion mittels Alkalischer Phosphatase).  
2 Positivkontrollen für PCR (AC) und Hybridisierung (CC) sind im Test enthalten.

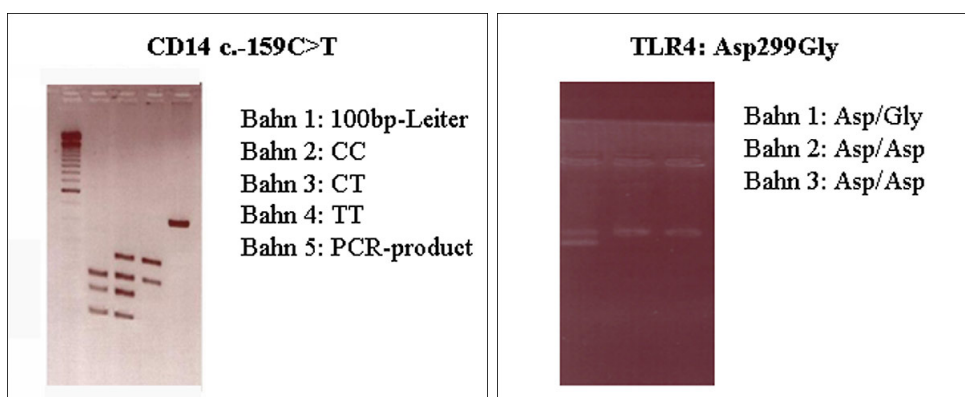


Abb. 3 und 4: Genotypisierung mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Analysen

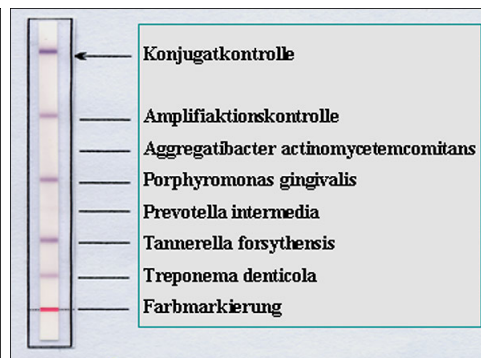
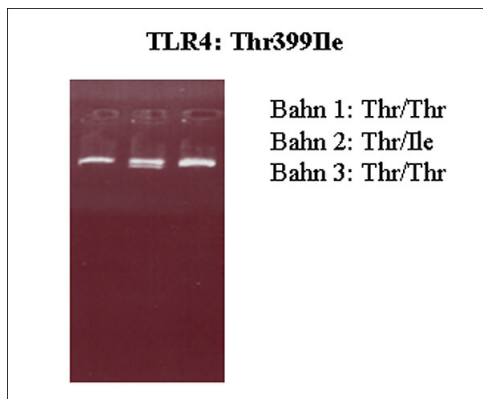


Abb. 5: Genotypisierung mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Analysen

Abb. 6: Subgingivale Bestimmung von 5 parodontpathogenen Leitkeimen (HAIN-Lifescience, Nehren)

## Ergebnisse

### Charakterisierung der Probanden

Keine signifikanten Unterschiede bezüglich Alter, Geschlecht und Raucherstatus (Patienten vs. Gesunde). Wie erwartet zeigen beide Patientengruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant schwerere klinische Symptome. Wie erwartet besitzen Patienten mit Parodontitis eine höhere subgingivale Belastung mit parodontpathogenen Keimen, aber: Nachweis von Tf und Td in über 50% der Kontrollprobanden + fehlende Signifikanz im Nachweis von Aa bei CP ⇒ Hinweis auf weitere regulierende, z. B. genetische Faktoren.

### Klinische und demographische Charakterisierung

	Chronische Parodontitis n = 60	Aggressive Parodontitis n = 73	Gesunde Probanden n = 80	p-Werte vs. Gesunde	
				CP	AP
Alter (Jahre ± SD)	48.3 ± 10	41.4 ± 9.9	43.8 ± 11	n. s.	n. s.
Geschlecht (% Männer)	31.4	38.3	41.5	n. s.	n. s.
Nichtraucher (%)	67.9	58	70	n. s.	n. s.
Approximaler Plaque index (%)	59.8 ± 26.2	53.8 ± 29.4	42.8 ± 18.9	< 0.001	0.023
Blutung nach Sondierung (%)	68.1 ± 25	78.1 ± 23.7	44.8 ± 24.4	< 0.001	< 0.001
Mittelwert Sondiertiefe (mm ± SD)	5.1 ± 1.1	6.5 ± 5.7	2.7 ± 0.9	< 0.001	< 0.001
Mittelwert der Sondiertiefe an den mikrobiologischen Teststellen (mm ± SD)	6.7 ± 1.4	7.5 ± 1.6	3.1 ± 0.3	< 0.001	< 0.001
Mittelwert Attachmentverlust (mm ± SD)	5.8 ± 1.4	6.6 ± 1.6	3 ± 1	< 0.001	< 0.001
Mittelwert Attachmentverlust an den mikrobiologischen Teststellen (mm ± SD)	7.4 ± 1.7	8.5 ± 1.8	3.3 ± 0.5	< 0.001	< 0.001

Tab. 1: Klinische und demographische Charakterisierung der Probanden

### Mikrobiologische Untersuchung

	Chronische Parodontitis (%)	Aggressive Parodontitis (%)	Gesunde Probanden (%)	CP	AP
Aggregatibacter actinomycetemcomitans (%)	26.9	42	16	n. s.	0.002
Porphyromonas gingivalis (%)	86.5	79.7	16	< 0.001	< 0.001
Prevotella intermedia (%)	61.5	65.2	26	< 0.001	< 0.001
Tannerella forsythensis (%)	96.2	87	58	< 0.001	< 0.001
Treponema denticola (%)	98.1	87	64	< 0.001	0.003
Pg, Td, Tf (%)	80.8	72.5	16	< 0.001	< 0.001

Tab. 2: Mikrobiologische Charakterisierung der Probanden

**Genomische Untersuchungen**

Mittels binärer logistischer Regression wurde überprüft, ob der CD14 Genotyp auch bei Berücksichtigung weiterer Kofaktoren als unabhängiger Risikofaktor für die subgingivale Besiedlung mit *P. intermedia* bestätigt werden kann.

Nach Adjustierung für die Kofaktoren Alter, Geschlecht, Nikotinkonsum und klinischen Attachmentverlust an den mikrobiologischen Entnahmestellen konnte gezeigt werden, dass bei Trägern des CD14 Genotyp TT signifikant seltener *P. intermedia* nachzuweisen ist ( $p=0.017$ ,  $OR=0.31$ ,  $95\% CI=0.12-0.81$ ).

**Risikoanalyse (Besiedlung mit *P. intermedia*): Binäre logistische Regression\***

Signifikante Variablen	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert	Odds Ratio	95% CI
männl. Geschlecht	1.1	0.42	0.010	2.99	1.3-6.9
Genotyp TT	1.18	0.49	0.017	0.31	0.12-0.81

Tab. 3: Risikoanalyse

\*Adjustierung für Alter, Geschlecht, Nikotinkonsum und CAL an mikrobiologischer Entnahmestelle

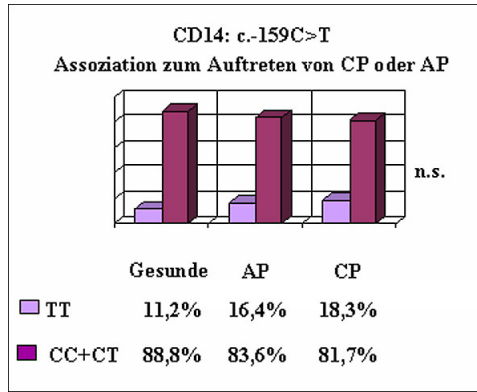
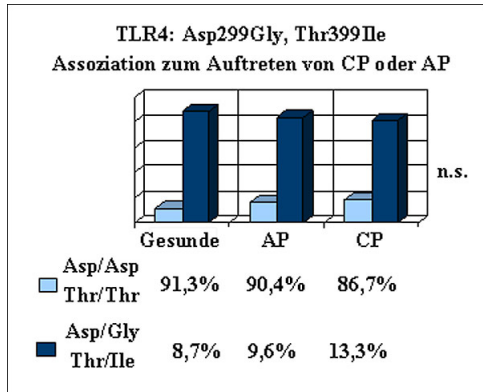


Abb. 7 und 8: Genomische Untersuchungen

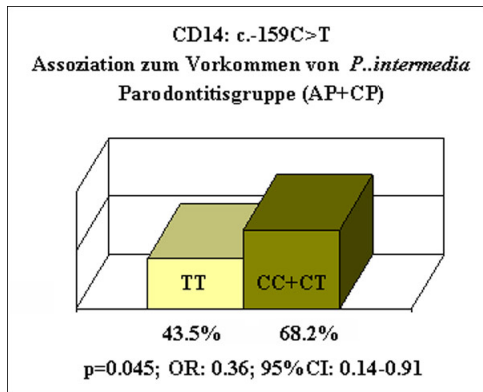


Abb. 9: Genomische Untersuchungen

**Schlußfolgerungen**

Träger des homozygoten Genotyps TT des c.-159C>T-Polymorphismus im CD14-Gen zeigten im bivariaten Vergleich eine geringere Keimbelastung mit *P. intermedia*. Nach Adjustierung für Alter, Geschlecht, Nikotinkonsum und CAL an den mikrobiologischen Entnahmestellen konnte dieser Polymorphismus im multivariaten Modell als unabhängiger protektiver Faktor für die Keimbesiedlung mit *P. intermedia* bestätigt werden. Die Ergebnisse zeigten außerdem, dass die untersuchten genomischen Varianten in den Genen CD14 (c.-159C>T) und TLR4 (Asp299Gly, Thr399Ile) nicht zur Ausprägung einer schweren generalisierten aggressiven oder chronischen Parodontitis bei Patienten Mitteldeutschlands assoziiert werden können.

Dieses Poster wurde übermittelt von *Dr. Susanne Schulz*.

**Korrespondenz-Adresse:**

*Dr. Susanne Schulz*  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie  
Harz 42a  
06108 Halle, Germany



# Der Einfluss von SNPs im CD14- und TLR4-Gen auf die subgingivale Besiedlung mit Parodontopathogenen



S Schulz<sup>1</sup>, J Klapproth<sup>1</sup>, U Zimmermann<sup>1</sup>, Y Reichert<sup>2</sup>, J Stein<sup>3</sup>, C Gläser<sup>4</sup>, HG Schaller<sup>1</sup>, S Reichert<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Poliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- <sup>2</sup> private Zahnarztpraxis Halle (Saale)
- <sup>3</sup> Klinik für Zahnerhaltung und Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde, RWTH Aachen
- <sup>4</sup> Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg

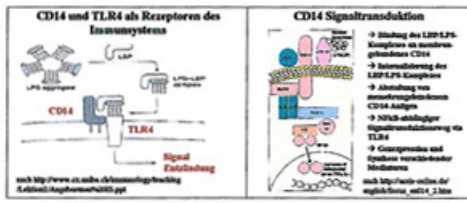
## Einleitung

Als ein entscheidender Antigen-erblicher Faktor wird die subgingivale Besiedlung mit parodontopathogenen Bakterien angesehen.

Bei der nachfolgenden Immunantwort spielen CD14 und Toll like receptor 4 (TLR4) als Rezeptoren für bakterielle LPS-Lipid-Komplexe eine wichtige Rolle.

Funktionell wichtige Polymorphismen wurden für beide Gene beschrieben:  
 CD14: *c.-159C>T* TT Genotyp erhöht die CD14-Transkriptmenge (Hakabi et al., 1999)  
 TLR4: *Ap299G>C* C>A Allel mit veränderter LPS-Sensibilität assoziiert (Khalid et al., 2006)  
*Tt299G>C* C>A Allel mit veränderter LPS-Sensibilität assoziiert (Khalid et al., 2006)

Ziel der Studie:  
 In der vorliegenden Studie sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen den Polymorphismen im CD14- sowie TLR4-Gen und dem Ausmaß von chronischer (CP) Parodontitis untersucht werden. Darüber hinaus sollten mögliche Assoziationen zur subgingivalen Kolonialisierung (Aggregatbildung) von *T. forsythensis* (Tf), *T. denticola* (Td), *P. gingivalis* (Pg) und *P. intermedia* (Pi) untersucht werden. Die Assoziationsuntersuchungen wurden unter Berücksichtigung weiterer Faktoren für Parodontitis durchgeführt.



## Patienten und Methoden

### Einschlusskriterien der Patienten

**Generalisierte aggressive Parodontitis (AP):**  
 n=75  
 Alter: 30-50 Jahre, 2-3 Seiten Zahnlücken, keine Initial- oder erste Molar, Mikrobiell: Interd. Menge mindestens 10<sup>7</sup> CFU/ml und Alkalinitätswert > 2 mm an mindestens 30% der Zähne

**Generalisierte chronische Parodontitis (CP):**  
 n=60  
 Alter: 30-50 Jahre, 2-3 Seiten Zahnlücken, keine Initial- oder erste Molar, Mikrobiell: Interd. Menge mindestens 10<sup>7</sup> CFU/ml und Alkalinitätswert > 2 mm an mindestens 30% der Zähne

**Kontrollpersonen ohne Parodontitis:**  
 n=60  
 Alter: 30-50 Jahre, 2-3 Seiten Zahnlücken, keine Initial- oder erste Molar, Mikrobiell: Interd. Menge < 10<sup>7</sup> CFU/ml und Alkalinitätswert < 2 mm an mindestens 30% der Zähne

### Genomische Untersuchungen

**DNA-Isolierung:**  
 Die DNA-Preparation der parodontalen DNA aus bakterien-reichen EDTA-Blut erforderte "cold extraction" (Qiagen, Hilden). Die DNA wurde durch Zugabe von 20 µl Proteinase K (Qiagen, Hilden) bei 56°C für 16h in 100 µl Lysis-Puffer (Qiagen, Hilden) gelöst. Nach Zugabe von 100 µl Lysis-Puffer (Qiagen, Hilden) wurde bei 95°C inkubiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 100 µl Lysis-Puffer (Qiagen, Hilden) gelöst. Nach Zugabe von 100 µl Lysis-Puffer (Qiagen, Hilden) wurde bei 95°C inkubiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 100 µl Lysis-Puffer (Qiagen, Hilden) gelöst. Nach Zugabe von 100 µl Lysis-Puffer (Qiagen, Hilden) wurde bei 95°C inkubiert.

**Genotypisierung mittels RestriktionsfrAGMENTPOLYMERASEKettenreaktion (RFLP)-Analyse:**



### Subgingivale Bestimmung von 5 parodontopathogenen Leitkeimen

**Präparation und DNA-Isolierung:**  
 Die Präparation wurde mit einem Papageimon aus der linken Tarsus jeder Quadranten abstrichen und gewaschen. Die bakterielle DNA wurde mittels (Magna DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden)) isoliert. Die Präparation wurde in 100 µl Lysis-Puffer und 20 µl Proteinase K bei 56°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Lysis-Puffer (Qiagen, Hilden) wurde bei 95°C inkubiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 100 µl Lysis-Puffer (Qiagen, Hilden) gelöst. Nach Zugabe von 100 µl Lysis-Puffer (Qiagen, Hilden) wurde bei 95°C inkubiert.

**PCR:**  
 Für die spezifische Amplifikation von *Aggregatbakterium actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi), *Tannerella forsythensis* (Tf) und *Tropica denticola* (Td) wurde die oben beschriebene mit GAPDH-Quadranten (Caloneis, Hilden) isoliert. Maximale Primär-, Sekundär- und Tertiär-PCR-Konditionen (Temperatur, Zeit) wurden durch Testen von 1 µl der isolierten bakteriellen DNA ermittelt.

**Ergebnisse:**  
 20 µl der PCR-Produkte und 20 µl der DNA-Extraktion wurden für 1 min inkubiert. 1 µl des PCR-Produktes (konzentriert auf 40°C) wurde ausgegossen. Die DNA-Extraktion wurde mit 1 µl des PCR-Produktes und 1 µl des PCR-Produktes (konzentriert auf 40°C) wurde ausgegossen. Die DNA-Extraktion wurde mit 1 µl des PCR-Produktes und 1 µl des PCR-Produktes (konzentriert auf 40°C) wurde ausgegossen.

## Ergebnisse und Diskussion

### Charakterisierung der Patientengruppen

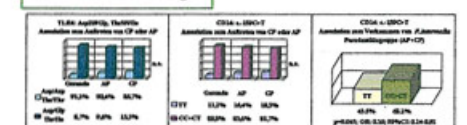
Klinische und demographische Charakterisierung	Chronische Parodontitis		Aggressive Parodontitis		Gesunde Kontrollpersonen		p-Werte vs. Kontrolle
	n=60	n=75	n=75	n=60	CP	AP	
Alter (Mittelwert)	48 (21.0)	41 (27.9)	43 (21.1)	41.1	0.1	0.1	
Geschlecht (M/F)	31/29	33/42	31/44	31/29	0.1	0.1	
Nicht-raucher (%)	61.7	58	70	61.7	0.1	0.1	
Aggregatbakterium actinomycetemcomitans (%)	51 (26.7)	31 (20.7)	41 (21.1)	41.1	<0.001	<0.001	
Mittlerer Interdentalwert (mm)	1.1 (1.1)	1.2 (1.2)	1.2 (1.2)	1.2 (1.2)	<0.001	<0.001	
Mittlerer Alkalinitätswert an den interdentalen Taschen (mm)	4.2 (1.4)	7.2 (1.4)	3.2 (1.2)	3.2 (1.2)	<0.001	<0.001	
Mittlerer Alkalinitätswert (mm)	3 (1.4)	4 (1.4)	3.1	3.1	<0.001	<0.001	
Mittlerer Alkalinitätswert an den interdentalen Taschen (mm)	7 (1.1)	8 (1.1)	3.2 (1.2)	3.2 (1.2)	<0.001	<0.001	

Keine signifikanten Unterschiede bezüglich Alter, Geschlecht und Raucherstatus (Zigaretten vs. Kontrolle).  
 Wie erwartet zeigen beide Patientengruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte klinische Symptome.

Mikrobiologische Untersuchung	n=60	n=75	n=60	p-Werte vs. Kontrolle
Aggregatbakterium actinomycetemcomitans (%)	33.3	42	16	0.002
Porphyromonas gingivalis (%)	66.7	71.7	16	<0.001
Prevotella intermedia (%)	66.7	61.7	16	<0.001
Tannerella forsythensis (%)	66.7	61.7	16	<0.001
Tropica denticola (%)	66.7	61.7	16	<0.001
Tf, Td, Pi (%)	66.7	71.7	16	<0.001

Wie erwartet hatten Patienten mit Parodontitis eine höhere subgingivale Belastung mit parodontopathogenen Keimen.  
 Alter, Geschlecht und Td in der CP-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle. + Mittlere Ergebnisse im Vergleich von Aa bei CP  
 + Mittlere Ergebnisse im Vergleich von Aa bei CP

### Genetische Untersuchungen



Polymorphism	Genotyp	CP (%)	AP (%)	p-Werte
CD14 c.-159C>T	TT	11.7	14.7	0.1
	CT	88.3	85.3	
	CC	0	0	
TLR4 Ap299G>C	TT	11.7	14.7	0.1
	CT	88.3	85.3	
	CC	0	0	

Ergebnisse der Assoziation von CD14 c.-159C>T und TLR4 Ap299G>C mit Parodontitis. Die Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten genetischen Varianten in den Genen CD14 (*c.-159C>T*) und TLR4 (*Ap299G>C*) nicht zur Assoziation einer chronischen parodontalen Aggression oder chronischen Parodontitis bei Patienten mit chronischer Parodontitis assoziiert werden können.