

# Der Promotorpolymorphismus c.-159C>T im CD14-Gen beeinflusst das Risiko für chronische Parodontitis

## CD14 und chronische Parodontitis

**Sprache:** Deutsch

**Autoren:**

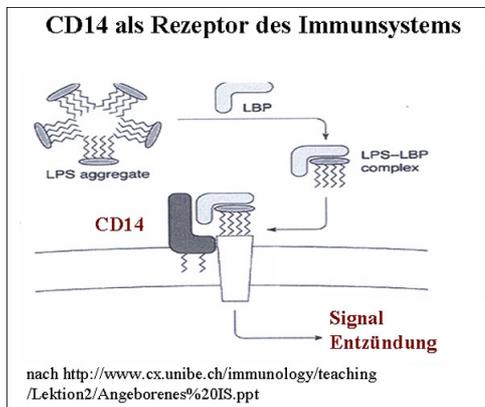
Dr. Susanne Schulz, Nico Zissler, Dr. Jana Klapproth, Dr. Uta Zimmermann, Prof. Hans-Günter Schaller, Dr. Stefan Reichert, Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
 Christiane Gläser,  
 Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
 Dr. Helmut Machulla, Wolfgang Altermann,  
 Interdisziplinäres HLA-Labor Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Datum/Veranstaltung/Ort:**

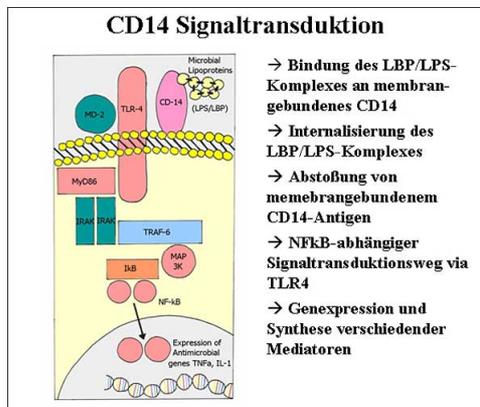
28.09.2007-29.09.2007  
 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie 2007  
 Bonn

**Einleitung**

Als ein entscheidender Auslöser entzündlicher Parodontitiden wird die subgingivale Besiedlung mit parodontopathogenen Bakterien angesehen. Bei der nachfolgenden Immunantwort spielt CD14 als Rezeptor für bakterielle LPS-LBP-Komplexe eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass die CD14-Produktion unter anderem von der individuellen genetischen Konstellation abhängt. Genomische Varianten von CD14, insbesondere im Promotorbereich des Gens, wurden mit einer veränderten Expression korreliert. Man kann vermuten, dass der genetische Background von CD14 durch seine Beeinflussung der CD14-Expression die Immunantwort auf subgingivale, bakterielle Keime steuert und damit bei der Ätiologie der Parodontitis eine wichtige Rolle spielen könnte.



Die Bedeutung des CD14-Rezeptors



CD14-Genotypisierung: Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente nach Restriktionsspaltung

**Problemstellung**

Ziel der Studie: In der vorliegenden Studie sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen dem c.-159C>T-Promotorpolymorphismus und dem Auftreten von chronischer (CP) und/oder aggressiver (AP) Parodontitis untersucht werden.

**Material und Methoden**

**Einschlusskriterien für Probanden**

Generalisierte aggressive Parodontitis (AP):  
 Erkrankungsbeginn vor dem 35. Lebensjahr > 3 betroffenen Zähne, keine Inzisivi oder erste Molaren Missverhältnis zwischen Menge mineralisierter Plaque und Attachmentverlust

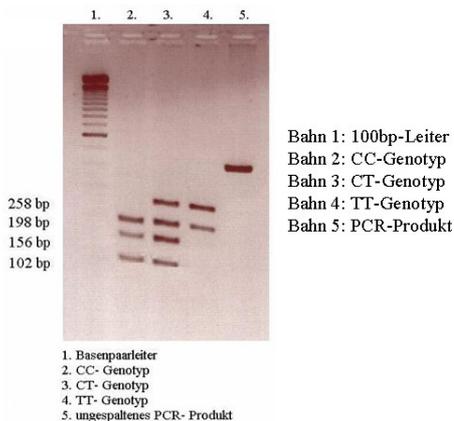
Generalisierte chronische Parodontitis (CP):  
 Attachmentverlust > 4mm an mindestens 30% der Zähne Attachmentverlust konsistent zur Akkumulation mineralisierter Plaque

Kontrollprobanden ohne Parodontitis:  
 Sondiertiefe < 3.5mm Kein Attachmentverlust durch Parodontitis (Ausnahmen: Pseudotaschen, überkonturierte Restaurationen)

**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.



Nachweis von 5 parodontalen Markerkeimen  
mittels HAIN-Hybridisierung

## PCR

### PCR-Ansatz

1 µl Primer CD14-1 (10pmol/ µl) 5' GTG CCA ACA GAT GAG GTT CAC 3'  
1 µl Primer CD14-2 (10pmol/ µl) 5' CAC TAG TCC CAA GTG TCT CCT CC 3'  
12,5µl Master Mix (Promega, Madison, WI, USA)  
0,25µl Formamid  
1µl genomische DNA (50 ng/µl)  
ad. 25 µl destilliertem Wasser

### PCR-Programm

95°C	5 Minuten	1. Denaturierung	
92°C	30 Sekunden	Denaturierung	
53°C	30 Sekunden	Annealing	30 Zyklen
72°C	30 Sekunden	Extension	
delay 1 Sekunde			
72°C	5 Minuten	letzte Extension	
4°C	hold		

PCR-Produkte wurden im ethidiumbromidhaltigen, 2%igen Agarosegel aufgetrennt und ausgewertet.

## Subgingivale Bestimmung von 5 parodontpathogenen 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.

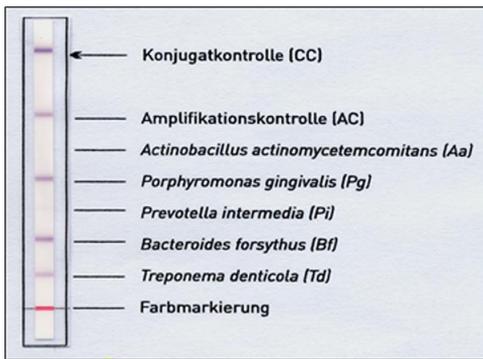
## PCR

- Für die spezifische Amplifikation von *Actinobacillus 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 (PCR (AC) und Hybridisierung (CC)) sind im Test enthalten.



## Ergebnisse

### Charakterisierung der Patientengruppen

#### Klinische und demographische Charakterisierung

	Chronische Parodontitis n = 51	Aggressive Parodontitis n = 60	Gesunde Probanden n = 41	p-Werte CP vs. Gesunde	p-Werte AP vs. Gesunde
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 Sondertiefe (mm±SD)	5.1±1.1	6.5±5.7	2.7±0.9	<0.001	<0.001
Mittelwert der Sondertiefe 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

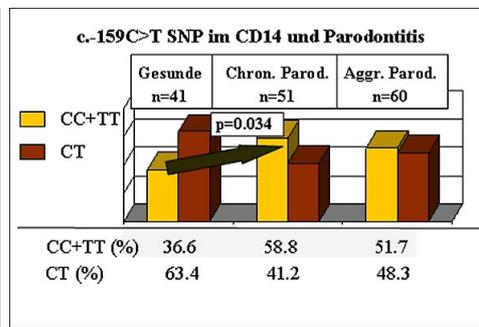
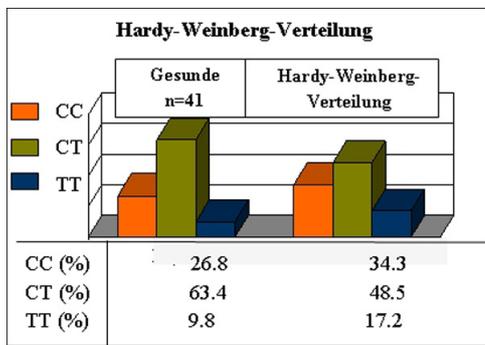
#### Mikrobiologische Untersuchung

	Chronische Parodontitis (%)	Aggressive Parodontitis (%)	Gesunde Probanden (%)	p-Werte CP vs. Gesunde	p-Werte AP vs. Gesunde
Actinobacillus 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
Tanerella 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

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 parodontopathogenen 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

#### Genetische Untersuchungen

Die Genotypverteilung der parodontal Gesunden entsprach dem Hardy-Weinberg-Gesetz. Im bivariaten Vergleich der Genotypfrequenzen wurde für homozygote Genotyp-träger (CC und TT) eine 1.6fach erhöhte Odds ratio für chronische Parodontitis bestimmt (p=0.034, 95% CI=1.01-2.56) Mittels binärer logistischer Regression wurde überprüft, ob der CD14 Genotyp auch bei Berücksichtigung weiterer Kofaktoren für Parodontitis als unabhängiger Risikofaktor bestätigt werden kann. Nach Adjustierung für die Kofaktoren Alter, Geschlecht, Nikotinkonsum und API konnte für Patienten mit chronischer Parodontitis gezeigt werden, dass der CD14 Genotyp CC+TT das Erkrankungsrisiko signifikant erhöht (p=0.015, OR=3.6, 95% CI=1.28-9.88).



Genotypverteilung des CD14-Polymorphismus c.-159C>T

**Risikoanalyse (CP vs. Gesunde): Binäre logistische Regression\***

Signifikante Variablen	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert	Odds ratio	95% CI
API	0.04	0.01	0.011	1.04	1.02-1.06
Genotyp CC+TT	1.27	0.52	0.015	3.6	1.28-9.88

\*Adjustierung für Alter, Geschlecht, Nikotinkonsum und API

Multivariate Risikoanalyse für die Genotypen CC und TT des CD14 SNPs c.-159C>T

**Schlußfolgerungen**

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Träger der homozygoten Genotypen CC und TT ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für chronischer Parodontitis tragen. Träger des heterozygoten Genotyps CT, die entsprechend der Literaturdaten durch eine balancierte CD14-Expression charakterisiert werden können, sind möglicherweise durch ihre damit verbundene moderate Immunantwort besser in der Lage, auf parodontopathogene Keime zu reagieren.

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

**Korrespondenz-Adresse:**

*Dr. Susanne Schulz*  
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
 Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie  
 Harz 42  
 D-06097 Halle

Poster 13, Jahrestagung der DGP, 27.-29. SEPTEMBER 2007, BONN



# Der Promotorpolymorphismus c.-159C>T im CD14-Gen beeinflusst das Risiko für chronische Parodontitis



S Schulz <sup>1</sup>, N Zissler <sup>1</sup>, C Gläser <sup>2</sup>, HKG Muchulla <sup>3</sup>, W Altermann <sup>3</sup>, J Klapproth <sup>1</sup>, U Zimmermann <sup>1</sup>, HG Schaller <sup>1</sup>, S Reichert <sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Universitätsklinik für Zahnärztliche Parodontologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
<sup>2</sup> Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
<sup>3</sup> Interdisziplinäres HLA-Labor der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

## Einleitung

Als ein entscheidender Auslöser entzündlicher Parodontitiden wird die subgingivale Besiedlung mit parodontopathogenen Keimarten angesehen.

Bei der nachfolgenden Immunantwort spielt CD14 als Rezeptor für bakterielle LPS-LBP-Komplexe eine wichtige Rolle.

Es konnte gezeigt werden, dass die CD14-Produktion unter anderem von der individuellen genetischen Konstitution abhängt. Genetische Variationen von CD14, insbesondere im Promotorbereich des Gens, wurden mit einer veränderten Expression korreliert. Man kann vermuten, dass der genetische Background von CD14 durch seine Beeinflussung der CD14-Expression die Immunantwort auf subgingivale, bakterielle Keime steuert und damit bei der Ätiologie der Parodontitis eine wichtige Rolle spielen könnte.

Ziel der Studie: In der vorliegenden Studie sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen dem c.-159C>T-Promotorpolymorphismus und dem Auftreten von chronischer (CP) oder aggressiver (AP) Parodontitis untersucht werden.

## Material und Methoden

### Einschlusskriterien für Probanden

**Generalisierte aggressive Parodontitis (AP):** Infektionsbeginn vor dem 35. Lebensjahr, Albinismenanteil  $\geq 10\%$  oder ein mindestens 30% der Zahn- $\geq 3$  Interdental-Blut, keine lokale oder erste lokale Interdental-Blutungen innerhalb von 7 Tagen und Albinismenanteil

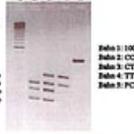
**Generalisierte chronische Parodontitis (CP):** Albinismenanteil  $\geq 10\%$  oder ein mindestens 30% der Zahn- $\geq 3$  Interdental-Blutungen innerhalb von 7 Tagen und Albinismenanteil

**Kontrollprobanden ohne Parodontitis:** Standard  $\geq 3$  mm, kein Albinismenanteil durch Parodontitis (Quadranten-Parodontitis, definierte Zahnfleischentzündung)

### Genomische Untersuchungen

**DNA-Isolierung:** Die DNA-Präparation der genomischen DNA aus humanen mononucleären Leukozyten (MNC) erfolgte mittels "Blood extraction kit" (Qiagen, Hilden). 100 µl EDTA-Bild wurde mit 200 µl RNeasy Lysis Puffer und 20 µl RNeasy Lysis Buffer für 10 min bei 50°C inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl RNeasy Lysis Puffer wurde das Material für 10 min bei 50°C inkubiert. 200 µl Ethanol wurde gegeben, der Rest für 10 min bei 50°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl RNeasy Lysis Puffer wurde das Material für 10 min bei 50°C inkubiert. Die DNA wurde mit 200 µl RNeasy Lysis Puffer für 10 min bei 50°C inkubiert.

**PCR-Prinzip:** 1 µl DNA, Primer CD14-1 (5'-GGG CCA ACA GAT GAG GTC CAC T-3'), Primer CD14-2 (5'-GAG CCA TCC CAA CCA TCC TCC C-3'), Primer CD14-3 (5'-GAG CCA TCC CAA CCA TCC TCC C-3'), Primer CD14-4 (5'-GAG CCA TCC CAA CCA TCC TCC C-3').



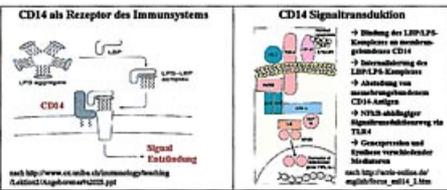
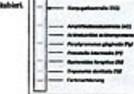
**PCR-Prinzip:** 1 µl DNA, Primer CD14-1 (5'-GGG CCA ACA GAT GAG GTC CAC T-3'), Primer CD14-2 (5'-GAG CCA TCC CAA CCA TCC TCC C-3'), Primer CD14-3 (5'-GAG CCA TCC CAA CCA TCC TCC C-3'), Primer CD14-4 (5'-GAG CCA TCC CAA CCA TCC TCC C-3').

### Subgingivale Bestimmung von 5 parodontopathogenen Leitkeimen

**Probenentnahme und DNA-Isolierung:** Die Probenentnahme wurde mittels Paperpoints aus der tiefsten Tasche jedes Quadranten entnommen und gepulvert. Die bakterielle DNA wurde mittels QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Probenentnahme wurde mit 100 µl QIA lysis Puffer und 20 µl QIA lysis Buffer für 10 min bei 50°C inkubiert. 200 µl QIA lysis Puffer wurde gegeben, der Rest für 10 min bei 50°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl QIA lysis Puffer wurde das Material für 10 min bei 50°C inkubiert. Die DNA wurde mit 200 µl QIA lysis Puffer für 10 min bei 50°C inkubiert.

**PCR:** 1 µl DNA, Primer CD14-1 (5'-GGG CCA ACA GAT GAG GTC CAC T-3'), Primer CD14-2 (5'-GAG CCA TCC CAA CCA TCC TCC C-3'), Primer CD14-3 (5'-GAG CCA TCC CAA CCA TCC TCC C-3'), Primer CD14-4 (5'-GAG CCA TCC CAA CCA TCC TCC C-3').

**Statistik:** Die Ergebnisse wurden mittels SPSS 17.0 (SPSS, München) ausgewertet. Die Ergebnisse wurden mittels SPSS 17.0 (SPSS, München) ausgewertet. Die Ergebnisse wurden mittels SPSS 17.0 (SPSS, München) ausgewertet.



## Ergebnisse und Diskussion

### Charakterisierung der Patientengruppen

**Klinische und demographische Charakterisierung**

	Chronische Parodontitis	Aggressive Parodontitis	Gesunde Probanden	p-Werte	
	n (%)	n (%)	n (%)	CP	AP
Alter (Jahre)	49.3 (21)	41.6 (29)	49.8 (21)	0.4	0.1
Geschlecht (n, %)	31 (4)	30 (3)	43 (3)	0.1	0.1
Aggressiver Plaque index (Q)	20.8 (2)	37.8 (2)	43.8 (2)	<0.001	<0.001
Blutung nach Sonderung (Q)	48 (2)	76 (2)	44.8 (2)	<0.001	<0.001
Mittlerer Zahnfleischindex (Q)	1.1 (1)	1.1 (1)	1.1 (1)	<0.001	<0.001
Mittlerer Albinismenanteil des Immunsystems (Q)	3.8 (1)	4.1 (1)	3.1 (1)	<0.001	<0.001
Mittlerer Albinismenanteil des Immunsystems (Q)	7.1 (1)	8.1 (1)	7.1 (1)	<0.001	<0.001

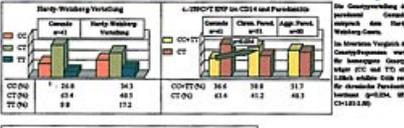
Keine signifikante Unterschiede bezüglich Alter, Geschlecht und Albinismenanteil (P-Werte vs. Genotyp). Wir erwarten keine Unterschiede im Vergleich der Kontrollgruppe gegenüber unseren klinischen Parametern.

**Mikrobiologische Untersuchungen**

	Aggressive Parodontitis	Chronische Parodontitis	Gesunde Probanden	p-Werte
Aufwuchsrate von Porphyromonas gingivalis (%)	28.9	42	18	0.002
Porphyromonas gingivalis (Q)	66.5	79.3	16	<0.001
Porphyromonas gingivalis (Q)	61.5	62.3	28	<0.001
Tannerella forsythensis (Q)	61.2	67	28	<0.001
Tannerella forsythensis (Q)	61.2	67	28	<0.001
Tannerella forsythensis (Q)	61.2	67	28	<0.001
Tannerella forsythensis (Q)	61.2	67	28	<0.001

Wir erwarten keine Unterschiede im Vergleich der Kontrollgruppe gegenüber unseren klinischen Parametern. Wir erwarten keine Unterschiede im Vergleich der Kontrollgruppe gegenüber unseren klinischen Parametern.

### Genetische Untersuchungen



**Assoziationsstudie (CP vs. Genotyp):** Shows the association between genotype and clinical parameters.

Signifikanter Parameter	Genotyp	p-Wert	Odds Ratio	95% CI
AP	CT	0.01	0.81	0.54 - 1.24
CP	CT	1.21	0.33	0.20 - 0.54

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Träger des heterozygoten Genotyps CT, die entsprechend der Literaturdaten durch eine heterozygote CD14-Expression charakterisiert werden können, sind möglicherweise durch ihre damit verbundene moderate Immunantwort besser in der Lage, auf parodontopathogene Keime zu reagieren.