

# Variabilita v genech pro toll-like receptory a jejich vztah k výskytu parodontálních patogenů u chronické parodontitidy

(Původní práce – klinicko-analytická studie)

## Variability in Toll-like Receptor Genes and Their Relation to Occurrence of Periodontal Pathogens in Chronic Periodontitis

(Original Article – Clinical Analytical Study)

Izakovičová Hollá L.<sup>1,2</sup>, Hrdličková B.<sup>1</sup>, Vokurka J.<sup>2</sup>, Augustin P.<sup>2</sup>, Fassmann A.<sup>2</sup>, Vaněk J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ústav patologické fyziologie LF MU, Brno

<sup>2</sup>Stomatologická klinika LF MU a FN u sv. Anny, Brno

### SOUHRN

**Úvod:** Toll-like receptory (TLRs) patří k rodině signálních molekul, které se podílejí na rozpoznávání cizorodých antigenů. Cílem naší práce bylo analyzovat polymorfismy v genech pro TLRs a asociovat je s přítomností vybraných parodontálních patogenů a s klinickým obrazem chronické parodontitidy (CP).

**Metody:** Dva polymorfismy v TLR-2 genu, dva SNPs v TLR-4 genu a tři varianty v TLR-9 genu byly studovány u 216 pacientů s CP a 184 nepříbuzných kontrolních osob. Všechny polymorfismy byly detekovány pomocí PCR-RFLP metod. Subgingivální přítomnost sedmi parodontálních patogenů byla vyšetřena pomocí VariOr®Dento testu.

**Výsledky:** U žádného z polymorfismů v TLR-2, TLR-4 a TLR-9 genu jsme neprokázali významné rozdíly ve frekvencích alel a genotypů mezi pacienty s CP a kontrolními osobami. Při komplexní analýze jsme však našli signifikantní rozdíly ve frekvencích TLR-9 haplotypů mezi oběma skupinami. Haplotyp TLR-9 TTA byl významně častější (9,8 % vs. 2,8 %,  $p < 0,00005$ ) a haplotyp TTG méně častý (33,7 % vs. 41,3 %,  $p = 0,03$ ) u pacientů s CP než u kontrol. Ve frekvencích TLR-2 a TLR-4 haplotypů nebyly pozorovány signifikantní rozdíly mezi oběma skupinami. Při porovnání výskytu vybraných parodontálních patogenů jsme potvrdili významné rozdíly ve frekvencích *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *P. micros*, *P. intermedia* ( $p < 0,01$ ) a marginální rozdíly ve výskytu *T. denticola* a *F. nucleatum* ( $p < 0,05$ ) mezi nemocnými a zdravými osobami. Naproti tomu, signifikantní rozdíl ve výskytu *A. actinomycetemcomitans* nebyl mezi oběma skupinami detekován. Významné asociace mezi CP, parodontálními patogeny a TLR-2 nebo TLR-9 polymorfismy nebyly nalezeny; prokázali jsme však marginální korelaci obou TLR-4 variant s výskytem *P. gingivalis* ( $p = 0,05$ ).

**Závěr:** Naše výsledky poukazují na asociaci TLR-9 haplotypů s rozvojem chronické parodontitidy a naznačují možnou interakci mezi přítomností určitých bakterií v subgingiválním plaku a polymorfismy v TLR-4 genu, což je v souladu s multifaktoriální etiologií tohoto onemocnění.

**Klíčová slova:** parodontitida – gen – polymorfismus – bakterie – asociace – haplotyp

### SUMMARY

**Introduction:** Toll-like receptors (TLRs) belong to the pattern recognition receptor family of sig-

nal molecules that recognize heterogeneous antigens. The aim of this study was to analyze polymorphisms in the TLR genes and their association with the presence of selected periodontal pathogens and clinical manifestation of chronic periodontitis (CP).

**Methods:** Two polymorphisms in TLR-2, two SNPs in TLR-4 and three variants in TLR-9 genes were studied in 216 patients with CP and 184 unrelated controls. All polymorphisms were detected using the PCR-RFLP methods. The subgingival presence of 7 selected periodontal pathogens was investigated by the VariOr®Dento test.

**Results:** No significant differences were found in frequencies of alleles or genotypes of all polymorphisms in the TLR-2, TLR-4 and TLR-9 genes between patients with CP and controls. However, in a complex analysis, significant differences in frequencies of TLR-9 haplotypes were determined between both groups. Haplotype TLR-9 “TTA” was significantly more frequent (9.8% vs. 2.8%,  $p < 0.00005$ ) and haplotype “TTG” less frequent (33.7% vs. 41.3%,  $p = 0.03$ ) in patients with CP in comparison with controls.

We did not find significant differences in frequencies of TLR-2 and TLR-4 haplotypes between both groups. Comparison of the occurrence of the selected periodontal pathogens confirmed significant differences in frequencies of *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *P. micros*, *P. intermedia* ( $p < 0.01$ ) and marginal differences in the occurrence of *T. denticola* and *F. nucleatum* ( $p < 0.05$ ) between the group of patients and controls. In contrast, no significant difference between both groups was found for *A. actinomycetemcomitans*. No significant associations between CP, periodontal pathogens and TLR-2 or TLR-9 polymorphisms was observed in any group; however, we found marginal correlation of both TLR-4 variants with the occurrence of *P. gingivalis* ( $p = 0.05$ ).

**Conclusions:** In conclusion, these findings suggest that TLR-9 haplotypes may be associated with susceptibility to chronic periodontitis and indicate a possible interaction between the occurrence of some bacteria in the subgingival plaque and polymorphisms in the TLR-4 gene; this finding is in agreement with multifactorial etiology of this disease.

**Key words:** periodontitis – gene – polymorphism – bacteria – association – haplotype

Čes. Stomat., roč. 111, 2011, č. 5, s. 107–116.

## ÚVOD

Nemoci parodontu jsou velmi časté a spolu se zubním kazem patří k hlavním příčinám ztráty zubů [15]. Podstatným článkem v řetězci příčin zánětů parodontálních tkání je mikrobiální povlak hromadící se na povrchu zubů. Ačkoliv přítomnost bakterií plaku se zdá být nezbytným faktorem pro spuštění zánětlivé a imunitní odpovědi organismu, nejsou faktorem dostačujícím a množství plaku nemusí korelovat se závažností onemocnění, což je vysvětlováno individuální náchylností jedince k onemocnění [26, 33]. Bakterie aktivují imunitní systém pomocí rodiny receptorů pro patogenní vzory (Pathogen Pattern Receptors – PPRs), mezi které patří i tzv. Toll-Like Receptory (TLRs) a indukují tvorbu zánětlivých mediátorů, které spolu s bakteriálními produkty vedou k destrukci parodontálních tkání [47].

V současnosti je u člověka popsáno 11 TLR receptorů [1], které jsou různě exprimovány a distribuovány ve tkáních, což vede ke tkáňově specifickým interakcím imunitního systému s mikroorganismy a jejich součástmi [30]. Za jeden z nejvýznamnějších je považován TLR-4, jehož hlavním ligandem je lipopolysacharid (LPS), ale váže i lipoteichoovou kyselinu a stresové bílkoviny (hsp60) a TLR-2, na který se váží peptidoglykan a kyselina lipoteichoová G<sup>+</sup> bakterií spolu s lipoproteiny a lipopeptidy G<sup>-</sup> bakterií. Na rozdíl od většiny LPS gram-negativních bakterií, které jsou rozpoznávány TLR-4 receptorem, lipopolysacharid z *P. gingivalis* stimuluje TLR-2 receptor [31]. TLR-9, který slouží jako receptor pro sekvence CpG (cytosine-phosphate-guanine) bakteriální DNA [4], není lokalizován na buněčné membráně, ale uvnitř buňky. Je přítomen zejména ve tkáních imunitního systému (jako jsou lymfatické uzliny, kostní dřeň, leukocyty v periferní krvi) [11] a hraje významnou roli při stimulaci makrofágů a dendritických buněk [10].

Dosud byla popsána řada polymorfismů v genech pro TLR-2, TLR-4 i TLR-9 [27, 40] a u některých z nich také jejich funkční dopad. Záměna A za G v pozici +896 v genu pro TLR-4 vede k nahrazení kyseliny asparagové glycinem v pozici 299 (Asp229Gly) a zámě-

na C za T v pozici +1196 k záměně aminokyseliny threoninu za izoleucin v pozici 399 (Thr399Ile), což ovlivňuje efektivitu imunitní odpovědi [2]. Substituce A za G v pozici 2408 (2408A/G, rs5743708) genu pro TLR-2 vede také ke změně aminokyseliny (Arg753Gln) a snižuje schopnost aktivace TLR-2 [28, 40]. Polymorfismus (-16934T/A, rs4696480) v genu pro TLR-2, který může ovlivňovat jeho transkripci, byl asociován se zvýšeným rizikem rozvoje folikulárního lymfomu [34]. V promotoru genu pro TLR-9 byla nalezena řada polymorfismů, z nichž dva, v pozicích -1486T/C (rs187084) a -1237T/C (rs5743836), mohou vytvářet nová vazebná místa pro nukleární faktory Sp-1 a NF-κB a ovlivňovat tak regulaci transkripce TLR-9 genu [17]. Další varianta 2848A/G (rs352140) ve druhém exonu tohoto genu byla asociována s alterací genové exprese [24] a s rozvojem systémového lupus erythematosus (SLE) v čínské populaci [50]. Dosud bylo publikováno pouze několik prací zabývajících se úlohou TLRs polymorfismů u pacientů s chronickou parodontitidou [6, 12–14].

**Cílem naší studie** bylo zjistit, zda mohou varianty v TLRs genech ovlivňovat riziko rozvoje chronické parodontitidy v české populaci. Analyzovali jsme dva jednonukleotidové polymorfismy (SNPs, single nucleotide polymorphisms) v genu pro TLR-2, dvě varianty v genu pro TLR-4 a tři polymorfismy v genu pro TLR-9 ve skupině zdravých osob a nemocných s parodontitidou s cílem: a) popsat frekvence SNPs v genech pro TLRs v české populaci, b) analyzovat možné asociace vybraných variant a jejich kombinací (tzv. haplotypů) s náchylností ke vzniku chronické parodontitidy (CP) a c) identifikovat případné interakce TLRs variant s přítomností vybraných mikroorganismů v gingiválním sulku.

## METODY

Do studie zkoumající vztah polymorfismů v genech pro TLR-2, TLR-4 a TLR-9 bylo zařazeno celkem 400 osob, z toho 216 pacientů [105 mužů a 111 žen, věku  $43,3 \pm 7,7$  let (průměr  $\pm$  SD)] s diagnózou chronické parodontitidy, kteří byli sledováni a léčeni na Stomatologické klinice LF MU a FN u sv. Anny v Brně v období 5 let, a 184 nepříbuzných zdravých kontrolních osob srovnatelného věku a pohlaví (92 mužů a 92 žen, věku  $40,7 \pm 9,6$  let) získaných ve spolupráci s praktickými lékaři.

Všichni pacienti splnili diagnostická kritéria pro chronickou parodontitidu definovaná Americkou asociací pro parodontologii (AAP) [3]. Diagnóza byla stanovena na základě podrobného klinického parodontologického vyšetření, vybraných parodontálních indexů, měřením ztráty úponu (clinical attachment loss, CAL) a pohyblivosti zubů, spolu s RTG vyšetřením. Ztráta kosti byla zjišťována radiograficky z ortopantomogramu diagnostické kvality za použití indexu podle Mühlemanna [32]. Kritériem pro vyloučení ze souboru nemocných i zdravých osob byla přítomnost celkového onemocnění v anamnéze (kardiovaskulární choroby – ICHS, srdečního selhání, dále diabetu mellitu a/nebo nádorového onemocnění).

Pro studium asociací genetických polymorfismů v genech pro TLRs s chronickou parodontitidou byl zvolen přístup „kontroly-případy“ (case-control). Studie byla schválena Komisí pro etiku lékařského experimentu na lidských subjektech Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a FN u sv. Anny v Brně. Podepsaný informovaný souhlas vyšetřovaných osob je k dispozici.

### Molekulárně-biologická analýza obsahu gingiválního sulku

U 100 pacientů s chronickou parodontitidou (CP) a u 52 zdravých kontrolních osob jsme odebrali pomocí papírového čepu (ISO standard 40) obsah parodontálního chobotu (gingiválního sulku) na mikrobiologické vyšetření. Odebraný materiál byl zpracován pomocí soupravy VariOr®Dento test (Protean, s.r.o., České Budějovice, ČR, www.gentred.cz). Tento test stanovuje množství mikroorganismů semikvantitativně následujícím způsobem: (-) mikroorganismy nedetekovány, což představuje množství bakterií menší než  $10^3$ , (+) slabě pozitivní korespondující s počtem bakterií  $10^3 - 10^4$ , (++) středně pozitivní, což vyjadřuje nález počtu bakterií mezi  $10^4 - 10^5$ , a (+++) silně pozitivní, s množstvím bakterií vyšším než  $10^5$ .

**Genetická analýza**

**Izolace DNA:** Genomická DNA byla izolována z leukocytů periferní venózní krve tzv. proteinázovou metodou.

**Stanovení polymorfismů v genu pro TLR-2:**

Polymorfismus v pozici G2408A (Arg753Gln) v genu pro TLR-2 jsme analyzovali metodou PCR podle Schröder a kol. [40] s následnou restrikční analýzou enzymem Acil.

Polymorfismus v pozici -16933T/A v genu pro TLR-2 jsme analyzovali modifikovanou metodou PCR podle Sutherland a kol. [46] s restrikční analýzou enzymem Hpy188III.

**Stanovení polymorfismů v genu pro TLR-4:**

Polymorfismy v genu pro TLR4 [v pozici 896A/G (Asp299Gly) a 1196C/T (Thr399Ile)] byly analyzovány modifikací metody původně popsané Lorenz a kol. [29].

**Stanovení polymorfismů v genu pro TLR-9:**

Polymorfismy v pozici -1486T/C a -1237T/C v genu pro TLR-9 jsme analyzovali podle Hamann a spol. [16] metodou PCR s restrikční analýzou enzymem AflIII a BstNI.

Polymorfismus v pozici 2848A/G v genu pro TLR-9 jsme analyzovali podle Lazarus a kol. [27] metodou PCR s následnou restrikční analýzou enzymem Acil.

---

**STATISTICKÉ HODNOCENÍ**

---

Alelické frekvence v souborech pacientů a kontrol jsme počítali z pozorovaných počtů genotypů. Významnost rozdílů v alelických frekvencích mezi jednotlivými skupinami byla hodnocena Fisher-exact testem. Signifikance odchylek od Hardyho-Weinbergova ekvilibria pro každý polymorfismus a rozdíly ve frekvencích genotypů jsme testovali pomocí  $\chi^2$ -testu. Rozdíly v kvantitě subgingiválně přítomných bakterií ve vztahu k určitému genotypu byla testována Kruskalovou-Wallisovou ANOVOU. Hladiny významnosti (P) byly v případě potřeby korigovány Bonferoniho metodou podle vzorce  $P_{\text{corr}} = P \times n$ , kde P je nekorigovaná hodnota a n je počet lokusů.

Haplotypová analýza byla provedena s použitím programu PHASE v.2.1, vyvinutým Stephensem a kol. [44, 45]. Tento program je dostupný pro nekomerční účely na adrese <http://www.stat.washington.edu/stephens/>. Rozdíly ve frekvencích haplotypů byly počítány permutačním testem a hodnota  $p < 0,05$  byla považována za statisticky významnou.

K výpočtům relativního rizika, konfidenčních intervalů a hladin významnosti byl použit programový balík Statistica v. 9.0 (Statsoft Inc., Tulsa, USA).

---

**VÝSLEDKY**

---

Celkem 184 zdravých nepříbuzných kontrolních osob a 216 pacientů s chronickou parodontitidou (CP) bylo zařazeno do studie. Mezi oběma skupinami nebyly významné rozdíly ve věku, pohlaví a statusu kouření (poměr kuřáků 27,7 % u kontrol vs. 30,9 % u pacientů s CP;  $p > 0,05$ ).

Distribuce genotypů a alel jednotlivých SNPs jsou ukázány v tabulce 1. Soubory byly v Hardyho-Weinbergovu ekvilibriu u všech testovaných SNPs. Žádný polymorfismus nebyl významně asociován s chronickou parodontitidou po korekci na mnohonásobné srovnání.

Možný vztah mezi genetickými variantami v TLR-2, TLR-4 a TLR-9 genech a mikrobiologickým obrazem (výskytem určitých typů bakterií – *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, *T. denticola*, *P. micros*, *F. nucleatum* – v gingiválním sulku) byl analyzován u podskupiny pacientů s CP (N = 100) a kontrolních osob (N = 52). Prokázali jsme významné rozdíly ve výskytu *P. gingivalis* (69,0 % u CP vs. 17,3 % u kontrol,  $p < 0,000001$ ), *T. forsythensis* (89,0 % u CP vs. 51,9 % u kontrol,  $p < 0,000001$ ), *P. micros* (80,0 % u CP vs. 48,1 % u kontrol,  $p < 0,0001$ ), *P. intermedia* (71,0 % u CP vs. 50,0 % u kontrol,  $p < 0,01$ ), a marginálně významné rozdíly ve výsky-

**Tab. 1** Frekvence alel a genotypů TLR-2, TLR-4 a TLR-9 polymorfismů u kontrolních osob a pacientů s chronickou parodontitidou (CP)

|                        | Kontroly   | Pacienti s CP | P<br>p-level<br>( $p_{corr}$ ) |
|------------------------|------------|---------------|--------------------------------|
|                        | N (%)      | N (%)         |                                |
| <b>TLR-2 2408G/A</b>   |            |               |                                |
| GG                     | 172 (93,5) | 198 (91,7)    | 0,49                           |
| GA                     | 12 (6,5)   | 18 (8,3)      |                                |
| AA                     | 0 (0,0)    | 0 (0,0)       |                                |
| G alela                | 96,7       | 95,8          | 0,32                           |
| A alela                | 3,3        | 4,2           |                                |
| <b>TLR-2 -16934A/T</b> |            |               |                                |
| AA                     | 48 (26,1)  | 43 (10,8)     | 0,32                           |
| AT                     | 96 (52,2)  | 125 (31,3)    |                                |
| TT                     | 40 (21,7)  | 48 (12,0)     |                                |
| A alela                | 52,2       | 48,8          | 0,19                           |
| T alela                | 47,8       | 51,2          |                                |
| <b>TLR-9 -1486C/T</b>  |            |               |                                |
| TT                     | 54 (29,3)  | 64 (29,6)     | 0,90                           |
| CT                     | 90 (48,9)  | 109 (50,5)    |                                |
| CC                     | 40 (21,7)  | 43 (19,9)     |                                |
| T alela                | 53,8       | 54,9          | 0,41                           |
| C alela                | 46,2       | 45,1          |                                |
| <b>TLR-9 -1237C/T</b>  |            |               |                                |
| TT                     | 149 (81,0) | 164 (75,9)    | 0,47                           |
| CT                     | 33 (17,9)  | 49 (22,7)     |                                |
| CC                     | 2 (1,1)    | 3 (1,4)       |                                |
| T alela                | 89,9       | 87,3          | 0,14                           |
| C alela                | 10,1       | 12,7          |                                |
| <b>TLR-9 2848A/G</b>   |            |               |                                |
| AA                     | 59 (32,1)  | 86 (39,8)     | 0,13                           |
| AG                     | 93 (50,5)  | 105 (48,6)    |                                |
| GG                     | 32 (17,4)  | 25 (11,6)     |                                |
| A alela                | 57,3       | 64,1          | 0,03<br>(0,21)                 |
| G alela                | 42,7       | 35,9          |                                |
| <b>TLR-4 896A/G</b>    |            |               |                                |
| AA                     | 163 (88,6) | 191 (88,4)    | 0,96                           |
| AG                     | 21 (11,4)  | 25 (11,6)     |                                |
| GG                     | 0 (0,0)    | 0 (0,0)       |                                |
| A alela                | 94,3       | 94,2          | 0,54                           |
| G alela                | 5,7        | 5,8           |                                |
| <b>TLR-4 1196C/T</b>   |            |               |                                |
| CC                     | 0 (0,0)    | 0 (0,0)       | 0,96                           |
| CT                     | 21 (11,4)  | 25 (11,6)     |                                |
| TT                     | 163 (88,6) | 191 (88,4)    |                                |
| C alela                | 5,7        | 5,8           | 0,54                           |
| T alela                | 94,3       | 94,2          |                                |

tu *T. denticola* (66,0 % u CP vs. 46,2 % u kontrol,  $p < 0,05$ ) a *F. nucleatum* (97,0 % u CP vs. 86,5 % u kontrol,  $p < 0,05$ ) mezi nemocnými a zdravými osobami. Naproti tomu nebyl patrný signifikantní rozdíl ve výskytu *A. actinomycetemcomitans* (22,0 % u CP vs. 32,7 % u kontrol,  $p = 0,11$ ) mezi oběma skupinami (tab. 2, graf 1). Významné asociace mezi CP, parodontálními patogeny a TLR-2 či TLR-9 polymorfismy nebyly nalezeny; našli jsme však marginální korelaci obou TLR-4 variant s výskytem *P. gingivalis* ( $p = 0,05$ ).

Při analýze výskytu několika polymorfismů společně (tzv. haplotypů) jsme našli v populaci pouze čtyři TLR-9 haplotypy s frekvencí výskytu více než 5 %, vzhledem k silné vazebné nerovnováze mezi jednotlivými variantami. Distribuce TLR-9 haplotypů byla signifikantně rozdílná mezi oběma skupinami (tab. 3). Haplotyp T(-1486)/T(-1237)/A(2848) TLR9 genu se významně častěji vyskytoval u pacientů s CP než u kontrol (9,8 % versus



**Tab. 2** Přítomnost 7 analyzovaných parodontálních patogenů ve vybraných podskupinách

| Patogen  | Množství*     | Kontroly (N = 52) | Pacienti s CP (N = 100) |
|--|---------------|-------------------|-------------------------|
|  |               | N (%)             | N (%)                   |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> (F.n.)              | - nedetekován | 7 (13,5)          | 3 (3,0)                 |
|  | +             | 24 (46,2)         | 20 (20,0)               |
|  | ++            | 15 (28,8)         | 42 (42,0)               |
|  | +++           | <b>6 (11,5)</b>   | <b>35 (35,0)</b>        |
| <i>Agregatibacter actinomycetemcomitans</i> (A.a.) | -nedetekován  | 35 (67,3)         | 78 (78,0)               |
|  | +             | 17 (32,7)         | 22 (22,0)               |
|  | ++            | 0 (0,0)           | 0 (0,0)                 |
|  | +++           | 0 (0,0)           | 0 (0,0)                 |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> (P.g.)             | -nedetekován  | 43 (82,7)         | 31 (31,0)               |
|  | +             | 3 (5,8)           | 12 (12,0)               |
|  | ++            | 3 (5,8)           | 9 (9,0)                 |
|  | +++           | <b>3 (5,8)</b>    | <b>48 (48,0)</b>        |
| <i>Tannerella forsythensis</i> (T.f.)              | -nedetekován  | 25 (48,1)         | 11 (11,0)               |
|  | +             | 16 (30,8)         | 38 (38,0)               |
|  | ++            | 7 (13,5)          | 26 (26,0)               |
|  | +++           | <b>4 (7,7)</b>    | <b>25 (25,0)</b>        |
| <i>Treponema denticola</i> (T.d.)                  | -nedetekován  | 28 (53,8)         | 34 (34,0)               |
|  | +             | 24 (46,2)         | 64 (64,0)               |
|  | ++            | 0 (0,0)           | 2 (2,0)                 |
|  | +++           | 0 (0,0)           | 0 (0,0)                 |
| <i>Peptostreptococcus micros</i> (P.m.)            | -nedetekován  | 27 (51,9)         | 20 (20,0)               |
|  | +             | 18 (34,6)         | 44 (44,0)               |
|  | ++            | 4 (7,7)           | 24 (24,0)               |
|  | +++           | <b>3 (5,8)</b>    | <b>12 (12,0)</b>        |
| <i>Prevotella intermedia</i> (P.i.)                | - nedetekován | 26 (50,0)         | 29 (29,0)               |
|  | +             | 21 (40,4)         | 28 (28,0)               |
|  | ++            | 3 (5,8)           | 20 (20,0)               |
|  | +++           | <b>2 (3,8)</b>    | <b>23 (23,0)</b>        |

\* - nedetekován (odpovídá počtu bakterií < 10<sup>3</sup>), + slabě pozitivní (odpovídá počtu bakterií 10<sup>3</sup>–10<sup>4</sup>), ++ středně pozitivní (odpovídá počtu bakterií 10<sup>4</sup>–10<sup>5</sup>), +++ silně pozitivní (odpovídá počtu bakterií > 10<sup>5</sup>)

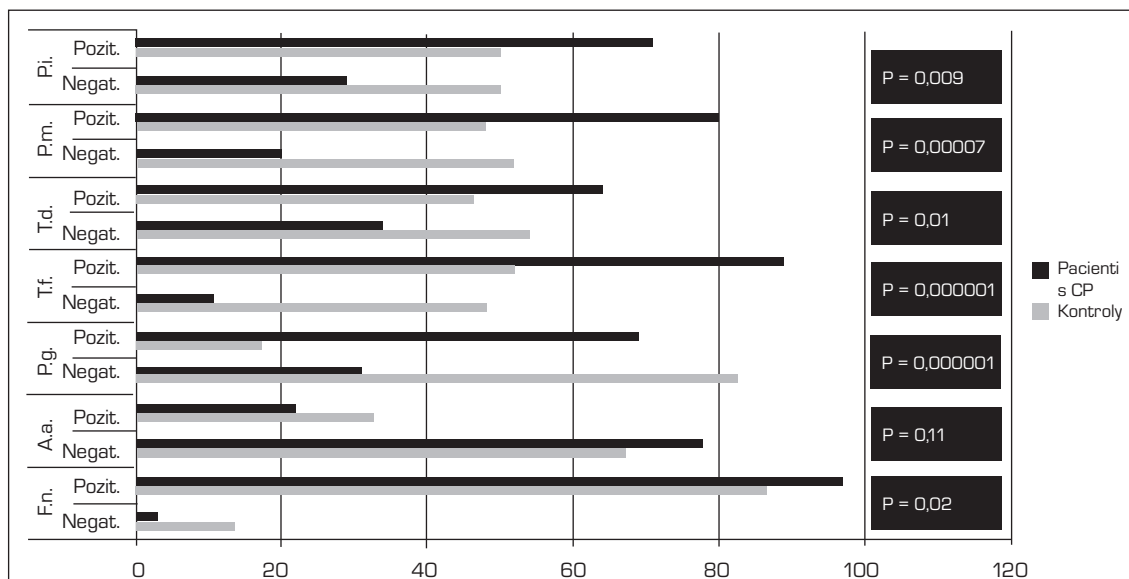
**Tab. 3** Frekvence TLR-9, TLR-2 a TLR-4 haplotypů

| Haplotypy TLR-9 |           |          | Kontroly | Pacienti s CP | P                   | OR (95 % CI)            |
|-----------------|-----------|----------|----------|---------------|---------------------|-------------------------|
| -1486C/T        | -1237C/T  | +2848A/G |          |               |                     |                         |
| C               | T         | A        | 45,9     | 41,5          | NS                  | 0,87 (0,66–1,15)        |
| T               | T         | G        | 41,3     | 33,7          | <b>0,03</b>         | <b>0,72 (0,54–0,96)</b> |
| T               | C         | A        | 8,7      | 11,3          | NS                  | 1,31 (0,82–2,10)        |
| T               | T         | A        | 2,8      | 9,8           | <b>&lt; 0,00005</b> | <b>3,75 (1,85–7,61)</b> |
| C               | T         | G        | 0,0      | 2,1           | NS                  | *                       |
| C               | C         | A        | 0,0      | 1,4           | NS                  | *                       |
| T               | C         | G        | 1,1      | 0,0           | NS                  | *                       |
| C               | C         | G        | 0,3      | 0,0           | NS                  | *                       |
| Haplotypy TLR-2 |           |          | Kontroly | Pacienti s CP | P                   | OR (95 % CI)            |
| 2408G/A         | -16933T/A |          |          |               |                     |                         |
| G               | A         |          | 52,2     | 48,8          | NS                  | 0,88 (0,66–1,16)        |
| G               | T         |          | 44,6     | 47,0          | NS                  | 1,10 (0,83–1,46)        |
| A               | T         |          | 3,2      | 4,1           | NS                  | 1,29 (0,61–2,71)        |
| Haplotypy TLR-4 |           |          | Kontroly | Pacienti s CP | P                   | OR (95 % CI)            |
| 896A/G          | 1196C/T   |          |          |               |                     |                         |
| A               | T         |          | 94,3     | 94,2          | NS                  | 0,99 (0,54–1,79)        |
| G               | C         |          | 5,7      | 5,8           | NS                  | 1,02 (0,56–1,84)        |

NS = nevýznamný (nesignifikantní) rozdíl

\*nehodnoceno pro nízkou frekvenci

2,8 %,  $p < 0,00005$ ; OR = 3,75, 95 % CI: 1,85–7,61) a naopak haplotyp T(-1486)/T(-1237)/G(2848) se u pacientů s CP vyskytoval méně než v kontrolní skupině (33,7 % versus 41,3 %,  $p = 0,03$ ; OR = 0,72, 95 % CI: 0,54–0,96, tab. 3). Naproti tomu se nám nepodařilo prokázat významné rozdíly ve frekvencích haplotypů TLR-2 a TLR-4 mezi pacienty s CP a kontrolními osobami (tab. 3).



**Graf. 1** Procento (%) výskytu parodontálních patogenů u kontrol a pacientů s chronickou parodontitidou (CP)

Negat. = odpovídá počtu bakterií  $< 10^3$

Pozit. = odpovídá detekci počtu bakterií  $> 10^3$  [tj. slabě pozitivní ( $10^3$ – $10^4$ ), středně pozitivní ( $10^4$ – $10^5$ ) a silně pozitivní ( $> 10^5$ )]

## DISKUSE

Chronická parodontitida je multifaktoriálním onemocněním, u něhož hrají roli složité interakce mezi řadou genů a faktorů zevního prostředí [8, 51]. Podle v současnosti používaného patogenetického modelu je parodontitida iniciována a spouštěna bakteriemi zubního plaku [43]. Na rozpoznávání těchto patogenů, jakými jsou např. *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* a *F. nucleatum*, se podílejí TLRs receptory, které jsou přítomny ve tkáních parodontu [39]. Dosud nejčastěji se u parodontitidy studovala úloha polymorfismů v genu pro TLR-4, a to zejména jeho dvou variant (Asp299Gly a Thr399Ile), u nichž byl prokázán vztah k funkci [2]. I když se na první pohled může zdát, že TLR-4 gen je vhodným „kandidátním“ genem pro rozvoj parodontitidy, studium asociací jeho polymorfismů nedošlo ke konzistentním závěrům [6, 9, 12, 13, 19, 20, 22, 25, 35, 38, 41, 42, 49, 52].

Nenašli jsme ani významné asociace mezi parodontitidou a variantou Arg753Gln v genu pro TLR-2. Naše výsledky jsou v souladu s řadou dříve publikovaných negativních studií [6, 12–14, 52]. Funkční polymorfismus v pozici -16934A/T také neovlivňoval dispozici jedinců k rozvoji CP v této práci, což naznačuje, že TLR-2 gen pravděpodobně nebude hrát významnou roli v patogenezi onemocnění parodontu v naší populaci. Polymorfismy v TLR-2 genu byly naproti tomu asociovány se vznikem řady jiných zánětlivých a autoimunitních onemocnění [5, 28, 37, 46].

TLR-9 je, stejně jako TLR-2 a TLR-4, exprimován v gingiválních lézích jak u pacientů s gingivitidou, tak také, a to mnohem výrazněji, u nemocných s parodontitidou [23]. Ačkoliv izolované SNPs v genu pro TLR-9 nebyly významně asociovány s CP, v rámci haplotypové analýzy jsme našli významný vztah TLR-9 [-1486T/-1237T/+2848A] haplo-

typu s CP [21]. Dva polymorfismy ležící v promotorové oblasti tohoto genu mohou vytvářet nová vazebná místa pro NF- $\kappa$ B (-1237C/T) a Sp1 (-1486C/T) [16]. Novak se spolupracovníky [36] prokázal, že TT genotyp v pozici -1237C/T TLR-9 genu má vyšší promotorovou aktivitu než CC genotyp. Kombinace alely C v pozici -1486 s alelou G v pozici +1174 (varianta nevyšetřená v naší studii) snižuje expresi TLR-9 genu [48]. Kikuchi a kol. ukázali, že genotyp AA v pozici 2848A/G v exonu 2 může zvyšovat expresi tohoto genu a podporovat tvorbu IgM(+) B lymfocytů po stimulaci CpG [24]. „Rizikový“ haplotyp pro vznik CP v naší práci obsahuje alelu A +2848A/G varianty spolu s alelami T -1237C/T a -1486C/T polymorfismů, které vykazují vyšší promotorovou aktivitu než opačné alely. Můžeme předpokládat, že bakteriální DNA přítomných parodontálních patogenů může vyvolávat zánětlivé změny parodontu a rozdíly v regulaci transkripce TLR-9 genu (determinované přítomností aktivnějších alel) mohou hrát v tomto procesu důležitou úlohu. Tento předpoklad je podporován nálezy získanými na modelu TLR-9 deficientních myší, které nereagují na CpG DNA produkcí cytokinů dendritickými buňkami a makrofágy [18]. Naproti tomu nebyly pozorovány rozdíly v expresi TLR-9 nebo produkci IFN $\alpha$ /IFN $\beta$  po stimulaci TLR-9 ve vztahu k různým alelám tohoto genu [7]. Interakce mezi TLR-9 polymorfismy a přítomnými mikroorganismy nebyly pozorovány ani v naší práci, na rozdíl od marginální korelace obou polymorfismů v TLR-4 genu s výskytem *P. gingivalis*.

## ZÁVĚR

Závěrem lze říci, že naše výsledky poukazují na asociaci TLR-9 haplotypů s rozvojem chronické parodontitidy a naznačují možnou interakci mezi přítomností určitých bakterií v subgingiválním plaku a polymorfismy v TLR-4 genech, což je v souladu s multifaktoriální etiologií tohoto onemocnění. Předložená data představují další střípky do mozaiky složitého předitiva genetického pozadí chronické parodontitidy, ale ke klinickému využití uvedených poznatků povede cesta ještě přes řadu dalších molekulárně genetických studií.

## LITERATURA

1. Arancibia, S. A., Beltran, C. J., Aguirre, I. M., Silva, P., Peralta, A. L., Malinarich, F., Hermoso, M. A.: Toll-like receptors are key participants in innate immune response. *Biol. Res.*, roč. 40, 2007, č. 2, s. 97–112.
2. Arbour, N. C., Lorenz, E., Schutte, B. C., Zahner, J., Kline, J. N., Jones, M., Frees, K., Watt, J. L., Schwartz, D. A.: TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat. Genet.*, roč. 25, 2000, č. 2, s. 187–191.
3. Armitage, G. C.: Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann. Periodontol.*, roč. 4, 1999, č. 1, s. 1–6.
4. Bauer, S., Kirschning, C. J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., Lipford, G. B.: Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, roč. 98, 2001, č. 16, s. 9237–9242.
5. Berdeli, A., Celik, H.A., Ozyurek, R., Dogrusoz, B., Aydin, H.H.: TLR-2 gene Arg753Gln polymorphism is strongly associated with acute rheumatic fever in children. *J. Mol. Med.*, roč. 83, 2005, č. 7, s. 535–541.
6. Berdeli, A., Emingil, G., Han Saygan, B., Gurkan, A., Atilla, G., Köse, T., Baylas, H.: TLR2 Arg753Gly, TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile gene polymorphisms are not associated with chronic periodontitis in a Turkish population. *J. Clin. Periodontol.*, roč. 34, 2007, č. 7, s. 551–557.
7. Berghöfer, B., Frommer, T., König, I. R., Ziegler, A., Chakraborty, T., Bein, G., Hackstein, H.: Common human Toll-like receptor 9 polymorphisms and haplotypes: association with atopy and functional relevance. *Clin. Exp. Allergy*, roč. 35, 2005, č. 9, s. 1147–1154.
8. Borrell, L. N., Papapanou, P. N.: Analytical epidemiology of periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, roč. 32, 2005, Suppl. č. 1, s. 132–158.
9. Brett, P. M., Zygianni, P., Griffiths, G. S., Tomaz, M., Parker, M., D'Aiuto, F., Tonetti, M.: Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *J. Dent. Res.*, roč. 84, 2005, č. 12, s. 1149–1153.
10. Coban, C., Ishii, K. J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., Horii, T., Akira, S.: Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J. Exp. Med.*, roč. 201, 2005, č. 1, s. 19–25.
11. Du, X., Poltorak, A., Wei, Y., Beutler, B.: Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur. Cytokine Netw.*, roč. 11, 2000, č. 3, s. 362–371.
12. Emingil, G., Berdeli, A., Baylas, H., Saygan, B. H., Gurkan, A., Köse, T., Atilla, G.: Toll-like receptor 2 and 4 gene polymorphisms in generalized aggressive periodontitis. *J. Periodontol.*, roč. 78, 2007, č. 10, s. 1968–1977.
13. Folwaczny, M., Glas, J., Török, H.P., Limber-



- sky, O., Folwaczny, C.: Toll-like receptor (TLR) 2 and 4 mutations in periodontal disease. *Clin. Exp. Immunol.*, roč. 135, 2004, č. 2, s. 330–335.
14. Fukusaki, T., Ohara, N., Hara, Y., Yoshimura, A., Yoshiura, K.: Evidence for association between a Toll-like receptor 4 gene polymorphism and moderate/severe periodontitis in the Japanese population. *J. Periodontal Res.*, roč. 42, 2007, č. 6, s. 541–545.
  15. Haffajee, A. D., Socransky, S. S.: Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. *Periodontol.* 2000, roč. 5, 1994, č. 1, s. 78–111.
  16. Hamann, L., Haprecht, A., Tomka, A., Schumann, R. R.: Rapid and inexpensive real-time PCR for genotyping functional polymorphisms within the Toll-like receptor -2, -4, and -9 genes. *J. Immunol. Methods*, roč. 285, 2004, č. 2, s. 281–291.
  17. Hamann, L., Glaeser, Ch., Haprecht, A., Gross, M., Gomma, A., Schumann, R. R.: Toll-like receptor (TLR)-9 promotor polymorphisms and atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta*, roč. 364, 2006, č. 1–2, s. 303–307.
  18. Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kohno, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S.: A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, roč. 408, 2000, č. 6813, s. 740–745.
  19. Imamura, Y., Fujigaki, Y., Oomori, Y., Kuno, T., Ota, N., Wang, P. L.: Polymorphism of genes encoding toll-like receptors and inflammatory cytokines in periodontal disease in the Japanese population. *J. Int. Acad. Periodontol.*, roč. 10, 2008, č. 3, s. 95–102.
  20. Izakovicova Holla, L., Buckova, D., Fassmann, A., Roubalikova, L., Vanek, J.: Lack of association between chronic periodontitis and the Toll-like receptor 4 gene polymorphisms in a Czech population. *J. Periodontal. Res.*, roč. 42, 2007, č. 4, s. 340–344.
  21. Izakovicova Holla, L., Vokurka, J., Hrdlickova, B., Augustin, P., Fassmann, A.: Association of TLR9 haplotypes with chronic periodontitis in Czech population. *J. Clin. Periodontol.*, roč. 37, 2010, č. 2, s. 152–159.
  22. James, J. A., Poulton, K. V., Haworth, S. E., Payne, D., McKay, I. J., Clarke, F. M., Hughes, F. J., Linden, G. J.: Polymorphisms of TLR4 but not CD14 are associated with a decreased risk of aggressive periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, roč. 34, 2007, č. 2, s. 111–117.
  23. Kajita, K., Honda, T., Amanuma, R., Domon, H., Okui, T., Ito, H., Yoshie, H., Tabeta, K., Nakajima, T., Yamazaki, K.: Quantitative messenger RNA expression of Toll-like receptors and interferon- $\alpha$ 1 in gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.*, roč. 22, 2007, č. 6, s. 398–402.
  24. Kikuchi, K., Lian, Z. X., Kimura, Y., Selmi, C., Yang, G. X., Gordon, S. C., Invernizzi, P., Podda, M., Coppel, R. L., Ansari, A. A., Ikehara, S., Miyakawa, H., Gershwin, M. E.: Genetic polymorphisms of toll-like receptor 9 influence the immune response to CpG and contribute to hyper-IgM in primary biliary cirrhosis. *J. Autoimmun.*, roč. 24, 2005, č. 4, s. 347–352.
  25. Laine, M. L., Morré, S. A., Murillo, L. S., van Winkelhoff, A. J., Pena, A. S.: CD14 and TLR4 gene polymorphisms in adult periodontitis. *J. Dent. Res.*, roč. 84, 2005, č. 11, s. 1042–1046.
  26. Laine, M. L., Loos, B. G., Crielaard, W.: Gene Polymorphisms in Chronic Periodontitis. *Int. J. Dent.*, 2010, 2010:324719. Epub 2010 Feb 9.
  27. Lazarus, R., Klimecki, W. T., Raby, B. A., Vercelli, D., Palmer, L. J., Kwiatkowski, D. J., Silverman, E. K., Martinez, F., Weiss, S. T.: Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics*, roč. 81, 2003, č. 1, s. 85–91.
  28. Lorenz, E., Mira, J. P., Cornish, K. L., Arbour, N. C., Schwartz, D. A.: A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect. Immun.*, roč. 68, 2000, č. 11, s. 6398–6401.
  29. Lorenz, E., Hallman, M., Marttila, R., Haataja, R., Schwartz, D. A.: Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population. *Pediatr. Res.*, roč. 52, 2002, č. 3, s. 373–376.
  30. Mahanonda, R., Pichyangkul, S.: Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontol.*, 2000, roč. 43, 2007, č. 1, s. 41–55.
  31. Martin, M., Katz, J., Vogel, S. N., Michalek, S. M.: Differential induction of endotoxin tolerance by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *J. Immunol.*, roč. 167, 2001, č. 9, s. 5278–5285.
  32. Mühlemann, H. R., Mazon, Z. S.: Röntgendiagnostik. *Schweizerische Monatsschrift für Zahnheilkunde*, roč. 65, 1955, s. 1005–1013.
  33. Nibali, L., Ready, D. R., Parkar, M., Brett, P. M., Wilson, L., Tonetti, M. S., Griffiths, G. S.: Gene polymorphisms and the prevalence of key periodontal pathogens. *J. Dent. Res.*, roč. 86, 2007, č. 5, s. 416–420.
  34. Nieters, A., Beckmann, L., Deeg, E., Becker, N.: Gene polymorphisms in Toll-like receptors, interleukin-10, and interleukin-10 receptor alpha and lymphoma risk. *Genes Immun.*, roč. 7, 2006, č. 8, s. 615–624.
  35. Noack, B., Görgens, H., Lorenz, K., Ziegler, A., Hoffmann, T., Schackert, H. K.: TLR4 and IL-18 gene variants in aggressive periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, roč. 35, 2008, č. 12, s. 1020–1026.
  36. Novak, N., Yu, C. F., Bussmann, C., Maintz, L., Peng, W. M., Hart, J., Hagemann, T., Diaz-Lacava, A., Baurecht, H. J., Klopp, N., Wagenpfeil, S., Behrendt, H., Bieber, T., Ring, J., Illig, T., Weidinger, S.: Putative association of a TLR9 promoter polymorphism with atopic eczema. *Allergy*, roč. 62, 2007, č. 7, s. 766–772.
  37. Ogus, A. C., Yoldas, B., Ozdemir, T., Uguz, A., Olcen, S., Keser, I., Coskun, M., Cilli, A., Yegin, O.: The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur. Respir. J.*, roč. 23, 2004, č. 2, s. 219–223.
  38. Ozturk, A., Vieira, A. R.: TLR4 as a risk factor for periodontal disease: a reappraisal. *J. Clin. Periodontol.*, roč. 36, 2009, č. 4, s. 279–286.
  39. Sarah, S. M., Tamilselvan, S., Kamatchiammal, S., Suresh, R.: Expression of Toll-like receptors 2 and 4 in gingivitis and chronic perio-

- dontitis. Indian J. Dent. Res., roč. 17, 2006, č. 3, s. 114–116.
40. **Schröder, N. W. J., Hermann, C., Hamann, L., Göbel, U. B., Schumann, T. H. R.:** High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR. J. Mol. Med., roč. 81, 2003, č. 6, s. 368–372.
  41. **Schröder, N. W., Meister, D., Wolff, V., Christan, C., Kaner, D., Haban, V., Purucker, P., Hermann, C., Moter, A., Göbel, U. B., Schumann, R. R.:** Chronic periodontal disease is associated with single-nucleotide polymorphisms of the human TLR-4 gene. Genes Immun., roč. 6, 2005, č. 5, s. 448–451.
  42. **Schulz, S., Zissler, N., Altermann, W., Klapproth, J., Zimmermann, U., Gläser, C., Schaller, H. G., Reichert, S.:** Impact of genetic variants of CD14 and TLR4 on subgingival periodontopathogens. Int. J. Immunogenet., roč. 35, 2008, č. 6, s. 457–464.
  43. **Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., Kent, R. L. Jr.:** Microbial complexes in subgingival plaque. J. Clin. Periodontol., roč. 25, 1998, č. 2, s. 134–144.
  44. **Stephens, M., Smith, N. J., Donnelly, P.:** A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. Am. J. Hum. Genet., roč. 68, 2001, č. 4, s. 978–989.
  45. **Stephens, M., Donnelly, P.:** A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction. Am. J. Hum. Genet., roč. 73, 2003, č. 5, s. 1162–1169.
  46. **Sutherland, A. M., Walley, K. R., Russell, J. A.:** Polymorphisms in CD14, mannose-binding lectin, and Toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults. Crit. Care Med., roč. 33, 2005, č. 3, s. 638–644.
  47. **Takeda, K., Akira, S.:** Toll-like receptors in innate immunity. Int. Immunol., roč. 17, 2005, č. 1, s. 1–14.
  48. **Tao, K., Fujii, M., Tsukumo, S., Maekawa, Y., Kishihara, K., Kimoto, Y., Horiuchi, T., Hisaeda, H., Akira, S., Kagami, S., Yasutomo, K.:** Genetic variations of toll-like receptor 9 predispose to systemic lupus erythematosus in Japanese population. Ann. Rheum. Dis., roč. 66, 2007, č. 7, s. 905–909.
  49. **Tervonen, T., Raunio, T., Knuuttila, M., Karttunen, R.:** Polymorphisms in the CD14 and IL-6 genes associated with periodontal disease. J. Clin. Periodontol., roč. 34, 2007, č. 5, s. 377–383.
  50. **Xu, C. H. J., Zhang, W. H., Pan, H. F., Li, X. P., Xu, J. H., Ye, D. Q.:** Association study of a single nucleotide polymorphism in the exon 2 region of toll-like receptor 9 (TLR9) gene with susceptibility to systemic lupus erythematosus among Chinese. Mol. Biol. Rep., roč. 36, 2009, č. 8, s. 2245–2248.
  51. **Yoshie, H., Kobayashi, T., Tai, H., Galicia, J. C.:** The role of genetic polymorphisms in periodontitis. Periodontol., 2000, roč. 43, 2007, č. 1, s. 102–132.
  52. **Zhu, G., Li, C., Cao, Z., Corbet, E. F., Jin, L.:** Toll-like receptors 2 and 4 gene polymorphisms in a Chinese population with periodontitis. Quintessence Int., roč. 39, 2008, č. 3, s. 217–226.

*Poděkování*

*Práce byla podporována projektem 1M0528 a částečně také granty IGA NS9775-4 a NT114020-6.*

*Prof. MUDr. Lydie Izakovičová Hollá, Ph.D.  
Stomatologická klinika a Ústav patologické fyziologie LF MU a FNUSA  
Kamenice 5  
625 00 Brno  
e-mail: holla@med.muni.cz*