

**Aus der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. dent. Hans-Günter Schaller)**

**Polymorphismen im Gen der nicht-codierenden RNA ANRIL als parodontale und
kardiovaskuläre Risikomarker (Longitudinale Kohortenstudie)**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent)
für das Fachgebiet Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg

von Linda Seitter

geboren am 24.04.1991 in Backnang

Betreuer: Dr. rer. nat., rer. medic. habil. Susanne Schulz

apl. Prof. Dr. med. dent. Stefan Reichert

Gutachter: 1. apl. Prof. Dr. med. habil. Axel Schlitt (Paracelsus-Harz-Klinik Bad Suderode)

2. Prof. Dr. med. dent. Thomas Kocher (Universität Greifswald)

26.06.2018

10.01.2019

Meinen Eltern und meinem Bruder Jens gewidmet

Referat

Sowohl Parodontitis, als auch die koronare Herzerkrankung (KHK) sind entzündlich bedingte Erkrankungen, welche eine ausgeprägte Prävalenz und Inzidenz in der Bevölkerung der Industrienationen aufweisen. Ein Zusammenhang zwischen beiden Erkrankungen wird seit längerer Zeit diskutiert, wobei als Schnittstelle gemeinsame genetische Risikofaktoren vermutet werden. In der vorliegenden Studie sollten Polymorphismen im Kandidatengen ANRIL auf mögliche Assoziationen zur schweren Parodontitis, sowie als prognostische Marker für kardiovaskuläre Ereignisse untersucht und identifiziert werden. Das Studienkollektiv umfasste 1002 Patienten mit angiographisch gesicherter Stenose (>50%). Zusätzlich zur kardiovaskulären Routinediagnostik wurden alle Probanden serologisch und dental-parodontal untersucht. Die Patienten wurden nach drei Jahren bezüglich eines kardiovaskulären Sekundäreignisses mündlich oder schriftlich kontaktiert. Dazu zählten kardiovaskulärer Tod, Tod durch Schlaganfall, Myokardinfarkt und Schlaganfall/TIA. Beide Polymorphismen des ANRIL-Gens rs1333049 und rs3217992 wurden durch SSP-PCR und RFLP genotypisiert. Als Hauptziel der Studie konnte festgestellt werden, dass Patienten mit schwerer Parodontitis im Vergleich zum Patientenkollektiv keine/leichte Parodontitis signifikant häufiger AG-Genotypträger des rs3217992 ($p=0,022$) waren, was auch multivariat bestätigt wurde (Odds Ratio=1,37; 95%KI: 1,02-1,82; $p=0,034$). Als Nebenziele der Studie wurden Assoziationen beider Polymorphismen zu klinischen-parodontologischen Parametern, zum Auftreten von Parodontopathogenen, zu serologischen Parametern, sowie zu bekannten Vorerkrankungen untersucht und teilweise auch bestätigt. Als weiteres Hauptziel konnte im 3-Jahres Follow-Up der AA-Genotyp des rs3217992 als Prognosefaktor für das Auftreten eines kombinierten Endpunktes sowohl univariat (Log-Rank Test: $p=0,035$), als auch multivariat identifiziert werden (Hazard Ratio=1,63; 95% KI: 1,1-2,4; $p=0,014$). Bei separater Betrachtung der Endpunkte hatten A-Allel-Träger des rs3217992 ein signifikant erhöhtes Risiko einen Endpunkt zu erleiden (Log-Rank Test: $p=0,026$), was in der Cox-Regression (Kofaktoren: Alter, Geschlecht, BMI, Rauchen, Diabetes) bestätigt wurde (Hazard Ratio=1,74; 95%KI: 1,05-2,87; $p=0,030$). Für den Polymorphismus rs1333049 wurde keine Assoziation zur Schwere der Parodontitis (Chi²-Test, binäre logistische Regression) bzw. zum Auftreten eines kombinierten kardiovaskulären Endpunktes (Kaplan-Meier-Statistik, Log-Rank Test, Cox-Regression) gezeigt. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der rs3217992 als unabhängiger parodontaler Risikomarker bei Patienten mit Koronarstenose und als Prognosemarker für kardiovaskuläre Sekundäreignisse identifiziert wurde.

Seitter, Linda: Polymorphismen im Gen der nicht-codierende RNA ANRIL als parodontale und kardiovaskuläre Risikomarker (Longitudinale Kohortenstudie). Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2018

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Einführung.....	1
1.2	Parodontitis.....	2
1.2.1	Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis.....	2
1.2.2	Mikrobiologie der Parodontitis.....	3
1.2.3	Körpereigene Abwehrreaktion der Parodontitis.....	6
1.2.4	Parodontale Risikofaktoren.....	8
1.2.5	Einfluss der Genetik.....	9
1.3	Koronare Herzkrankheit.....	9
1.3.1	Definition und Epidemiologie.....	9
1.3.2	Pathogenese.....	10
1.3.3	Risikofaktoren und genetischer Einfluss auf KHK.....	11
1.4	Wechselwirkung zwischen Parodontitis und KHK.....	12
1.4.1	Assoziationsstudien zwischen Parodontitis und KHK.....	12
1.4.2	Biologische Mechanismen für die Beziehung zwischen Parodontitis und KHK.....	12
1.4.3	Gemeinsame genetische Risikofaktoren.....	14
1.5	Die lange nicht-kodierende RNA ANRIL.....	15
1.5.1	Chromosom 9p21.3.....	15
1.5.2	ANRIL.....	16
1.5.3	ANRIL als gemeinsames Risikogen der Parodontitis und Atherosklerose.....	17
2.	Zielstellung.....	18
2.1	Ziele Basisuntersuchung.....	18
2.2	Ziele des 3-Jahres Follow-Up.....	19
2.3	Hypothesen.....	19
3.	Material und Methodik.....	20
3.1	Patienten.....	20
3.1.1	Auswahl der Patienten.....	20
3.1.2	Ein- und Ausschlusskriterien.....	20
3.1.3	Erhebung der klinischen Daten.....	20
3.1.4	Erhebung der biochemischen Daten.....	22
3.1.5	Erhebung der Follow-up-Daten.....	22
3.2	Genomische Untersuchungen.....	22
3.2.1	Blutentnahme.....	22
3.2.2	DNA-Isolation.....	22
3.2.3	DNA-Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR).....	23
3.2.4	PCR zur Genotypisierung des rs1333049 im ANRIL-Gen.....	23

3.2.5	Darstellung im Agarosegel.....	24
3.2.6	PCR zur Genotypisierung des rs321799 im ANRIL-Gen.....	26
3.2.7	Restriktionsspaltung mit DraI (20µl Gesamtansatz).....	27
3.2.8	Gelauftrag im Agarosegel zur Genotypisierung.....	27
3.3	Statistische Auswertung.....	28
3.4	Chemikalien.....	28
3.5	Geräte.....	29
4.	Ergebnisse.....	30
4.1	Studienteilnehmer.....	30
4.2	Basisuntersuchungen: Charakterisierung der Patientenkohorte in Assoziation zur parodontalen Diagnose.....	31
4.3	Basisuntersuchungen: ANRIL Polymorphismen rs1333049 und rs3217992.....	32
4.3.1	Genotyp- und Allelverteilung beider ANRIL Polymorphismen in Assoziation zum Schweregrad der Parodontitis.....	32
4.3.2	Parodontologische Parameter in Assoziation zu beiden ANRIL Polymorphismen.....	34
4.3.3	Assoziation beider ANRIL Polymorphismen zum Nachweis subgingivaler parodontaler Markerkeime.....	35
4.3.4	Assoziation des Genotyps und der Allelverteilung beider ANRIL Polymorphismen zu serologischen Parametern.....	39
4.3.5	Assoziation beider ANRIL Polymorphismen zur Prävalenz bekannter Vorerkrankungen.....	41
4.4	Das 3-Jahres Follow-Up.....	42
4.4.1	Charakterisierung der Patientenkohorte.....	42
4.4.2	Bedeutung der beiden ANRIL Polymorphismen als prognostische Faktoren in Bezug auf den kardiovaskulären Endpunkt.....	43
4.4.3	Das 3-Jahres Follow-Up: Überlebenszeitanalyse zur Inzidenz des kombinierten Endpunktes abhängig von der jeweiligen Genotypkonstellation.....	44
4.4.4	Überlebenszeitanalyse des ANRIL rs3217992 bei separater Betrachtung der einzelnen Endpunkte, abhängig von der jeweiligen Genotypkonstellation innerhalb des 3-Jahres Follow-Up.....	45
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	46
4.5.1	Übersichtstabelle.....	46
4.5.2	Basisuntersuchungen.....	46
4.5.3	Das 3-Jahres Follow-Up.....	47
5.	Diskussion.....	48
5.1	Diskussion der Methode.....	48
5.1.1	Studiendesign.....	48

5.1.2	Kardiologische Untersuchungen.....	49
5.1.3	Dentale, parodontologische Untersuchungen.....	49
5.1.4	Bestimmung parodontaler Markerkeime.....	50
5.1.5	Genetische Untersuchungen.....	50
5.2	Ergebnisdiskussion der Basisuntersuchungen.....	51
5.2.1	Basisuntersuchungen bezüglich der Charakterisierung der Patientenkohorte in Assoziation zur parodontalen Diagnose.....	51
5.2.2	Ergebnisdiskussion der ANRIL-Polymorphismen rs1333049 und rs3217992.....	55
5.3	Ergebnisdiskussion des 3-Jahres Follow-Up.....	60
6.	Zusammenfassung und Ausblick.....	62
7.	Literaturverzeichnis.....	64
8.	Thesen.....	78
9.	Anhang: Follow-Up Fragebogen.....	80

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

A	Adenin
<i>A.a.</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Abb	Abbildung
AGE	Advanced Glycation Endproducts
AgP	aggressive Parodontitis
ANRIL	antisense noncoding RNA in the INK4 locus
Aqua dest	destilliertes Wasser
BMI	Body Mass Index (Körpergewichtsindex)
BOP	bleeding on probing (Sondierblutung)
BP	Basenpaare
C	Cytosin
<i>C. g.</i>	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>
<i>C. o.</i>	<i>Capnocytophaga ochracea</i>
<i>C. r.</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
<i>C. sp.</i>	<i>Capnocytophaga sputigena</i>
ChP	chronische Parodontitis
CAL	clinical attachment loss (klinischer Attachmentverlust)
CAL bakt	Attachmentverlust an bakterieller Entnahmestelle
CDKN-	Cyclin-dependent kinase
CRP	C-reaktives Protein
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMFT	decayed/missing/filled teeth
DMS	Deutsche Mundgesundheitsstudie

DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. c.</i>	<i>Eikenella corrodens</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. n.</i>	<i>Eubacterium nodatum</i>
EPS	extrazellulären polymeren Substanzen
<i>F. n.</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
G	Guanin
HCL	Salzsäure
HDL	High Density Lipoproteine (Lipoproteine mit hoher Dichte)
HR	Hazard Ratio
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IL	Interleukin
kEP	kombinierter Endpunkt
KHK	Koronare Herzkrankheit
KI	Konfidenzintervall
L	Liter
LDL	Low Density Lipoproteine (Lipoproteine mit geringer Dichte)
lncRNAs	lange nichtkodierende RNA
LPS	Lipopolysaccharide
mg	Milligramm
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
μ	mikro-
ml	Milliliter

MMP	Matrixmetalloprotease
MTAP	Methylthioadenosin-Phosphorylase
nm	Nanometer
OPG	Osteoprotegerin
OR	Odds Ratio
p	Signifikanz
PA	Parodontitis
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PD	probing depth (Taschentiefe)
<i>P. g.</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PI	Plaqueindex
<i>P. i.</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>P. m.</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
RANK	Rezeptor-Aktivator des nukleären Faktors
RANKL	Ligand des Rezeptor-Aktivators des nukleären Faktors
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SNP	small nuclear polymorphism (Polymorphismus)
SSP	sequenzspezifische Primer
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
T	Thymin
T2D	Typ-2-Diabetes
<i>T. d.</i>	<i>Treponema denticola</i>

<i>T. f.</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
Tab	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TIA	transitorisch ischämische Attacke
TNF- α	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Umdrehungen
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
vs	versus

1 Einleitung

1.1 Einführung

Parodontitis (PA) und die Koronare Herzkrankheit (KHK) gelten als inflammatorische, multifaktoriell bedingte Erkrankungen, die beide eine hohe Prävalenz in der Bevölkerung aufweisen (Micheelis et al., 2008, Dahlöf, 2010). PA geht mit einer Erkrankung des Zahnhalteapparates und des alveolären Knochens einher und wird primär durch bakterielle Plaque verursacht. Modulierende, wirtsspezifische Faktoren sind entscheidend für den Krankheitsverlauf und dessen Intensität. Man unterscheidet primäre Risikofaktoren (spezifische Pathogene der Plaque) und sekundäre Risikofaktoren. Sekundäre Risikofaktoren können weiter in beeinflussbare Risikofaktoren (Rauchen, Stress, fehlender Recall, Diabetes mellitus, HIV/AIDS) und nicht beeinflussbare Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, ethnische Zugehörigkeit, Genetik) unterteilt werden (Rateitschak et al., 2012a). Die Mundflora enthält eine Vielzahl von Bakterien, die sich im Biofilm auf der Oberfläche von Zähnen und der Mundschleimhaut vermehren können (Moore & Moore, 1994). Daher bieten die Mundschleimhaut und der Zahnhalteapparat eine Eintrittspforte für Parodontopathogene und deren Toxine in den Körperkreislauf, die wiederum entzündliche Krankheiten wie die KHK, Arthritis oder Diabetes beeinflussen können (Wu et al., 2000; Mercado et al., 2003; Mealey, 2006; Bahekar et al., 2007; Paraskevas et al., 2008). Im Mittelpunkt der vorliegenden Studie steht die Assoziation zwischen der PA und der KHK. Die Manifestation der Atherosklerose in den Herzkranzgefäßen wird als KHK bezeichnet und entsteht durch eine endotheliale Dysfunktion, bei der Low-density Lipoproteine (LDL), T-Lymphozyten und Makrophagen in subendotheliale Kompartimente eindringen. Die darauffolgenden inflammatorischen Prozesse bewirken die Entstehung, Progression und Instabilität von atherosklerotischen Plaques. Im weiteren Verlauf führen diese Veränderungen zu einer zunehmenden Gefäßverengung und somit zu einer Koronarstenose. Ein wichtiger Durchbruch in der Erforschung der Zusammenhänge zwischen PA und KHK gelang Schaefer und seinen Kollegen im Jahr 2009 (Schaefer et al., 2009). Sie identifizierten das Gen ANRIL als gemeinsamen genetischen Risikofaktor für Atherosklerose und PA. ANRIL gehört zu der Klasse langer nicht-kodierender RNAs (lncRNAs) und besitzt folglich keine kodierenden Eigenschaften für Proteine. Es wird beschrieben, dass das ANRIL-Gen einen Einfluss auf den Glukosemetabolismus, die Inflammation und den Lipidstoffwechsel hat. Diese Metabolismen haben ihrerseits Einfluss auf PA und kardiovaskuläre Erkrankungen (Ahmed et al., 2013; Bochenek et al., 2013; Hannou et al., 2015). Eine Vielzahl von genomischen Varianten im ANRIL-Gen wurde bereits veröffentlicht (Schaefer et al., 2009, 2011, 2013). Ahmed und Hannou et al. belegten einen Einfluss des SNP rs1333049 zur KHK sowie zum Myokardinfarkt (Ahmed et al., 2013; Hannou et al., 2015). Schaefer und Kollegen haben im Jahr 2011 die Assoziation des SNP rs3217992 zum Auftreten von PA nachgewiesen (Schaefer et al., 2011). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse war es Ziel der vorliegenden Studie, die Bedeutung der ANRIL

Polymorphismen (SNP) rs1333049 und rs3217992 als Risikoindikatoren für PA und als Prädiktoren für kardiovaskuläre Sekundärereignisse innerhalb eines 3-Jahres Follow-Up zu untersuchen.

1.2 Parodontitis

1.2.1 Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis

Die Gingivitis ist eine reversible Entzündung der marginalen Gingiva (Loe et al., 1965), ausgelöst von einer Ansammlung mikrobieller Plaque, die sich am oder nahe des gingivalen Sulkus befindet (Page, 1986). Wird die mikrobielle Plaque nicht entfernt, vergrößert und verändert sie sich, und kann zu einer chronischen destruktiven Infektion, der PA, führen. Bei der PA kommt es zum entzündlichen Abbau der Gingiva, des Wurzelzements, des Desmodonts und des Alveolarknochens. Es bilden sich Zahnfleischtaschen, in denen sich anaerobe oder fakultativ anaerobe gram-negative parodontale Pathogene wie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. a.*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*), *Treponema denticola* (*T. d.*), *Tannerella forsythia* (*T. f.*) und *Prevotella intermedia* (*P. i.*) ansammeln können (Socransky et al., 1998). Die Klinik äußert sich in Blutung (evtl. mit Pusaustritt) während der Sondierung der Taschen. Kennzeichnend ist der röntgenologisch nachweisbare Knochenabbau. Langfristige Folgen sind Zahnlockerungen und Zahnverluste, die eine hohe psychische und physische Belastung für die Patienten darstellen (Haffajee & Socransky, 1994; Kislely, 2016). Prinzipiell unterscheidet man zwei unterschiedliche Formen der PA, die beide als verschiedene Erkrankungen angesehen werden (Armitage, 1999). Die chronische Parodontitis (ChP) beginnt etwa ab der 4. Lebensdekade, kann aber auch schon bei Kindern und Jugendlichen auftreten. Spricht man von einer lokalisierten Form, so sind weniger als 30% der Zahnflächen betroffen. Bei der generalisierten Form sind mehr als 30% der Zahnflächen betroffen. Der Knochenabbau findet hauptsächlich horizontal statt. Die aggressive Parodontitis (AgP), die weitaus seltener auftritt und ein anderes Krankheitsmuster als die ChP aufweist, tritt bereits zwischen der Pubertät und dem 30. Lebensjahr auf. Sie verläuft oft sehr rasch und weist bei sonst gesunden Patienten eine familiäre Häufung auf. Häufig ist ein Missverhältnis zwischen der Quantität mikrobieller Auflagerungen und dem Ausmaß der Destruktion parodontaler Gewebe zu erkennen. Zusätzlich findet sich ein vermehrtes Auftreten von *A.a.* und *P.g.*, sowie eine abnormale Phagozyten- und Makrophagenfunktion. Bei der AgP erfolgt wiederum eine Einteilung in ‚lokal‘ und ‚generalisiert‘ (Pihlstrom et al., 2005). Loe und Kollegen zeigten 1965 den Zusammenhang zwischen der Plaquemenge und der Prävalenz von Gingivitis und PA (Loe et al., 1965). Neben diesen primären Risikofaktoren (spezifische Pathogene der Plaque), spielen auch sekundär-beeinflussbare Risikofaktoren (z.B. Rauchen, Stress, soziales Umfeld) und sekundär-nicht-beeinflussbare Risikofaktoren (z.B. genetische Risikofaktoren) (Van Dyke & Sheilesh, 2005; Rateitschak et al., 2012a) eine Rolle. Sie können die individuelle Immunantwort beeinflussen, die jedoch ab einem bestimmten Zeitpunkt nicht

mehr in der Lage ist pathogene Mikroorganismen abzuwehren. Zytokine, Prostaglandine und Matrixmetalloproteinasen vermitteln bzw. regeln die destruiende Abwehrreaktion und können bei akuter oder chronischer parodontaler Entzündung vermehrt in der parodontalen Sulkusflüssigkeit nachgewiesen werden (Page & Kornman, 1997).

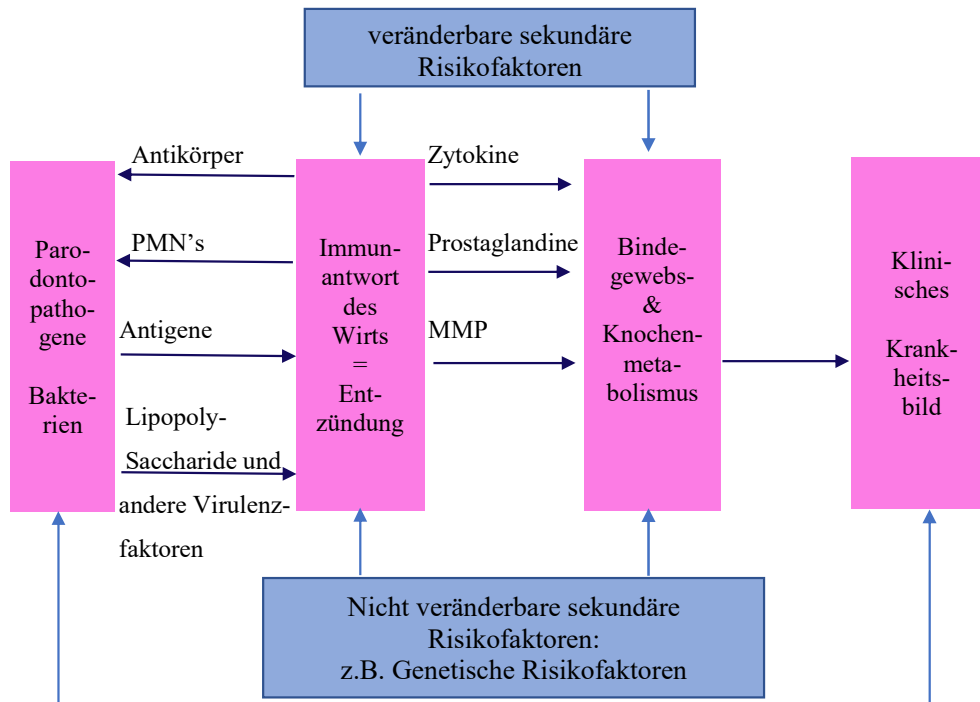


Abb. 1: Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis modifiziert nach Page & Kornman, 1997 (PMN: Polymorphkernige Granulozyten, MMP: Matrixmetalloproteasen, LPS: Lipopolysaccharide).

1.2.2 Mikrobiologie der Parodontitis

Die PA wird oft als opportunistische Erkrankung angesehen, da die meisten pathogenen Bakterien auch beim Gesunden nachgewiesen werden können, wenn auch häufig in geringerer Zahl. Die Bakterien organisieren sich in einem Biofilm. Die Biofilmentwicklung lässt sich in fünf Stadien mit 3 Hauptphasen gliedern (Costerton, 1999; Aparna & Yadav, 2008):

1. Initiale Adhäsion Stadium 1	2. Proliferation und Reifung Stadium 2-4	3. Dispersion Stadium 5
-----------------------------------	---	----------------------------

Abb. 2: Hauptphasen der Biofilmentwicklung.

- *Stadium I*: Die initiale Adhäsion ist durch eine flächige Anheftung von Bakterien an ein Substrat gekennzeichnet. Diese Bindung beruht auf der Anwesenheit von organischen, biopolymeren Substanzen (Polysacchariden, Proteinen, Glykoproteinen, Lipiden, Nukleinsäuren), welche aus

der bakteriellen Schleimschicht in Form von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) kommen (Costerton et al., 1987). Diese EPS umhüllen die Bakterien und lösen sich teilweise ab. Jene Bindungen sind reversibel und können bspw. durch Zähneputzen wieder aufgelöst werden (Marsh & Bradshaw, 1999; Marsh, 2006).

- *Stadium II*: Proliferation und Reifung: hierbei kommt es bereits zu einer irreversiblen Reifung des Biofilms. Die Bakterien bilden feste, adhärenente Verbindungen anhand der EPS. Die Bakterien lassen sich in Frühbesiedler, Spätbesiedler und Brückenkeime (ermöglichen die Bindung zwischen Früh- und Spätbesiedlern) unterteilen. Früh- und Spätbesiedler gehen keine Co-Aggregationen ein (Kolenbrander et al., 2010). Bakterien verbinden sich nur mit bestimmten Spezies (Saito et al., 2008). Erreicht der Biofilm eine Dicke von mehr als 10 µm, so spricht man von *Stadium III*. Werden mehr als 100 µm erreicht, so spricht man von *Stadium IV*.

- *Stadium V*: In der Dispersionsphase existiert ein Gleichgewicht zwischen Abbau und Massenzunahme im Biofilm (Kostakioti et al., 2013). Für die Dispersion gibt es viele mechanische, genetische und chemische Ursachen. Durch aktive Dispersion von bakteriellen Kolonien kann der Biofilm überleben, reagiert auf sich ändernde Umgebungsbedingungen (Nährstoffangebot, Sauerstoffgehalt) oder umgeht toxische Substanzen (bspw. Antibiotika) (Sauer et al., 2004). Durch diese Eigenschaften besteht ein großes Risiko, dass es zu einer bakteriell verursachten Krankheitsausbreitung im Menschen kommt. Ebenso wird durch diese Charakteristik die Therapie dieser Krankheit stark negativ beeinflusst (Kaplan, 2010). Der Biofilm bietet den Keimen also Schutz, erleichtert die Ernährung und begünstigt den Informationsaustausch der Bakterien untereinander. Er lässt sich nur mechanisch entfernen und die Penetration von Antibiotika ist erschwert. Das alleinige Vorhandensein dieser Bakterien löst keine Erkrankung aus. Erst wenn es zu einem Missverhältnis zwischen stabilisierenden und pathogenen Keimen kommt (durch die individuelle Immunabwehr des Wirtes, durch Risikofaktoren wie Nikotinabusus, mangelnde Mundhygiene, negativer Stress, Allgemeinerkrankungen), können die Keime destruktiv wirken und eine PA auslösen. Bis zur heutigen Zeit geht man von etwa 19.000 Phylotypen aus (Keijsers et al., 2008), wobei jedoch nur ein Teil pathogen ist (Haffajee & Socransky, 1994). Haffajee und Socransky deklarierten 1994 für die Pathogenität von Keimen drei charakteristische Eigenschaften: 1. Kolonien bilden zu können; 2. der Wirtsabwehr ausweichen zu können; 3. Substanzen zu produzieren, die direkt eine Gewebedestruktion im Parodont auslösen können.

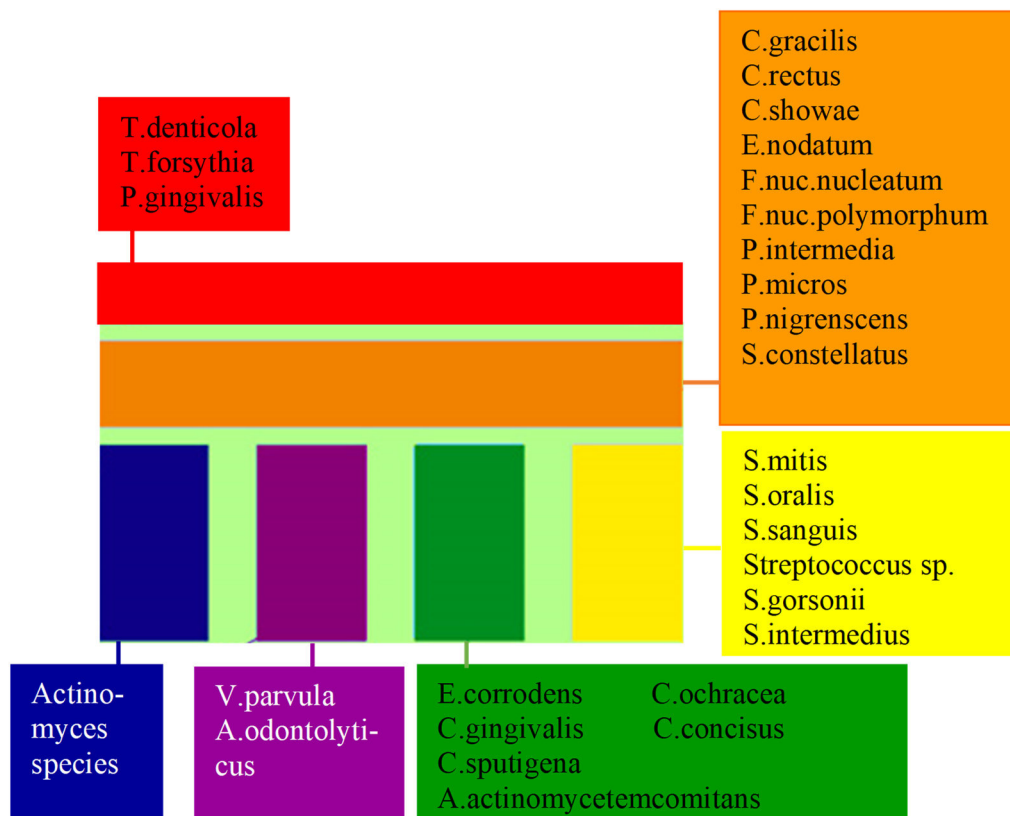


Abb. 3: Bildung von Bakterienkomplexen in der Mundhöhle (adaptiert nach Socransky et al., 1998).

Zuerst lagern sich an der Zahnoberfläche und künstlichen Oberflächen meist gram-positive Bakterien an. Dazu gehören Streptokokken und Actinomyceten. Deren Stoffwechselprodukte führen zur Exsudation und Migration von Abwehrzellen, was eine Auflockerung des Saumeithels zur Folge hat. Daraufhin können fakultative und obligate gram-negative Anaerobier in das subgingivale Parodont eindringen, wo sie ein passendes Milieu finden. Die Keime *A.a.*, *P.g.*, *P.i.*, *T.f.* und *T.d.* werden als parodontale Leitkeime klassifiziert (Genco, 1996). Socransky und Kollegen wiesen 1998 in aktiven Taschen mit ChP mehr Bakterien des roten Komplexes nach als an gesunden Stellen (Abb. 3) (Socransky et al., 1998). Sie sind besonders virulent, da sie mit Pathogenitätsfaktoren wie Phagozytoseresistenz, Immunglobulin- und Komplementabbauenden Proteasen oder Toxinen ausgestattet sind (Genco, 1996; Greenstein & Lamster, 1997). Der rote Komplex ist vom orangenen Komplex abhängig, der die weniger pathogenen und parodontal früh kolonisierenden Keime umfasst (Socransky et al., 1998). Gram-negative Anaerobier verdrängen mit zunehmender Taschentiefe und sauerstoffärmeren Milieu die gram-positiven Actinomyceten (blauer Komplex) und Streptokokken (gelber Komplex). Der grüne Komplex umfasst Bakterien, die relativ unempfindlich auf Sauerstoff reagieren und damit auch unabhängig von den anderen Komplexen existieren.

1.2.3 Körpereigene Abwehrreaktion der Parodontitis

Der Bindegewebs- und Knochenabbau geht vorwiegend auf die Entzündungsantwort des Immunsystems zurück (Page & Kornman, 1997). Die Immunabwehr kann in eine unspezifische und eine spezifische Abwehr eingeteilt werden, mit jeweils den beiden Unterformen „zellulär“ und „humoral“. Die Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen durch Rezeptoren, wie z.B. Toll-like-Rezeptoren, unspezifische pathogene Strukturen. Werden diese Rezeptoren aktiviert, kommt es zur Phagozytose der pathogenen Peptide und zur Ausschüttung proinflammatorischer, regulatorischer Zytokine (Teng, 2006; Liu et al., 2010). Ebenso verursachen bakterielle Peptide wie Lipopolysaccharide die Freisetzung von inflammatorischen Substanzen wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), Prostaglandinen (gehäuft PGE₂), Bradykinin, Interleukin-1 (IL-1) aus Entzündungszellen, sowie die Einwanderung von PMNs an den Entzündungsort (Graves & Cochran, 2003). Prostaglandine (PGE) werden u.a. von Makrophagen, PMNs und Fibroblasten synthetisiert. PGEs bewirken eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität und eine Vasodilatation. Darüber hinaus stimulieren sie Osteoklasten, lösen Schmerzen sowie Fieber aus und regulieren die Thrombozytenaggregation. Leukotriene werden u.a. von Mastzellen und basophilen Granulozyten synthetisiert. Bradykinin erhöht die Gefäßpermeabilität und ist an der Schmerzauslösung beteiligt. Interleukine (IL-1 bis IL-13) stellen eine wichtige Schaltzentrale des Immunsystems dar. IL-1 fördert die Aktivität von Osteoklasten, löst Fieber aus und bindet an T-Lymphozyten. So wird die Ausbildung von IL-2 Rezeptoren ermöglicht. Lymphozyten mit Antigenkontakt produzieren IL-2 und nach Bindung von IL-2 an dessen Rezeptor kommt es zur mitotischen Aktivität von T-Lymphozyten. Die Reifung von B-Lymphozyten erfolgt durch IL-1 und IL-2. Das IL-8 wird von Gewebezellen, Monozyten und Makrophagen sezerniert und induziert die zellspezifische Chemotaxis und Aktivierung von PMNs. PMNs setzen Prostaglandine und Leukotriene frei, die ihrerseits wiederum Fibroblasten und Makrophagen anregen MMPs und weitere Prostaglandine zu bilden. Aktivierte Fibroblasten, T-Zellen, PMNs und Makrophagen sezernieren zusätzlich TNF- α . TNF- α induziert die Bildung von endothelialen Adhäsionsmolekülen, die eine Aktivierung des Gefäßendothels bewirken, sodass weitere Immunzellen einwandern können. TNF- α stimuliert seinerseits wiederum eine Vielzahl von Zellen (über IL-1 β , IL-6, C-reaktives Protein), die bei entzündlichen Prozessen die wirtsspezifische Reaktion durch Opsonierung, T-Zell-Inhibition oder Komplementaktivierung unterstützen. Matrixmetalloproteasen (MMPs), sezerniert von TNF- α , PMNs und Fibroblasten der Gingiva, greifen die extrazelluläre Matrix an und bauen das Kollagen des parodontalen Gewebes ab (Hannas et al., 2007). TNF- α fördert zusätzlich den Knochenabbau, indem er das RANK/RANKL-System beeinflusst (Zhang et al., 2001, Zhao et al., 2012). Der RANK/RANKL/OPG-Signalweg ist am Zusammenspiel von knochenabbauenden (osteoklasteninduziert) und knochenaufbauenden (osteoblasteninduziert) Prozessen von Bedeutung (Leibbrandt & Penninger, 2008). RANK ist auf der Oberfläche von

Osteoklastenvorläuferzellen lokalisiert, woran sein Ligand RANKL binden kann. Diese Bindung fördert die Osteoklastenreifung und folglich den Knochenabbau. Osteoprotegerin (OPG) wird von Osteoblasten exprimiert und hat die Aufgabe RANKL entgegenzuwirken (Boyce & Xing, 2007) (Abb.4).

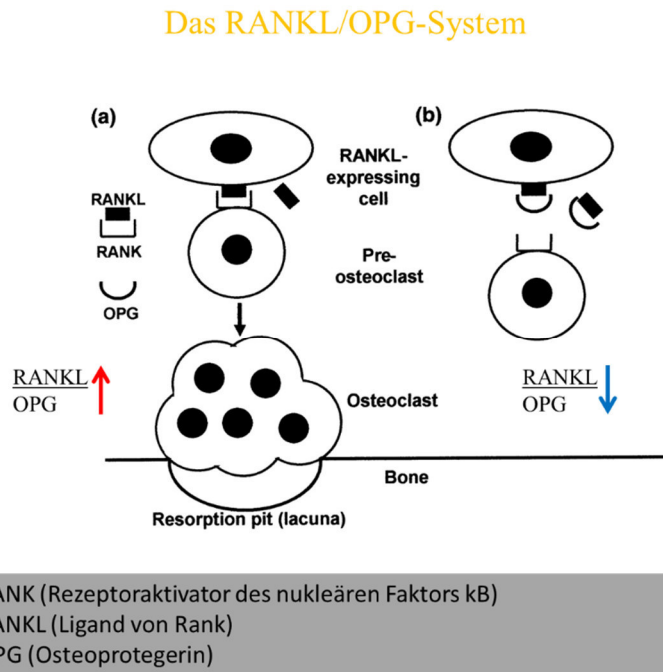


Abb. 4: Die Rolle des RANK/RANKL- Osteoprotegerin-Molekülkomplexes im Knochenumbau und seine immunopathologischen Implikationen (modifiziert nach Kajiya et al., 2010).

Socransky und Haffajee stellten fest, dass parallel das Komplementsystem aktiviert wird (Socransky & Haffajee, 1991). Das Komplementsystem ist Teil der unspezifischen, humoralen Abwehr und liegt im Serum vor. Nach seiner Aktivierung durch Immunkomplexe kommt es zur Auslösung einer Reihe von Proteininteraktionen, deren Zwischen- und Endprodukte die Gefäßpermeabilität erhöhen, die Chemotaxis von PMNs einleiten, B-Lymphozyten aktivieren, die Opsonierung und Phagozytose von Bakterien erleichtern, sowie Erythrozyten und gram-negative Bakterien auflösen. Chemotaxis bedeutet die zielgerichtete Wanderung von PMNs zu einem Antigen, wo die PMNs die Phagozytose der Bakterien und die Freisetzung lysosomaler Enzyme und Entzündungsmediatoren wie Zytokine, Prostaglandine und Leukotriene bewirken (Zigmond, 1974). Die Chemotaxis kann durch Faktoren gehindert werden, die von einigen gram-negativen Bakterien wie *A.a.* oder *Prevotella melaninogenica* ausgeschüttet werden (Johansson, 2011). Außerdem wurden bei verschiedenen Allgemeinerkrankungen (z.B. Diabetes mellitus) und bei verschiedenen Formen der AgP Dysfunktionen in der Chemotaxis und Phagozytoseaktivität festgestellt (Harsunen et al., 2013; Valle et al., 2013; Battaglia, 2014). Ein weiterer Bestandteil der angeborenen, unspezifischen Abwehr sind die Natürlichen-Killer-Zellen (NKs), die aktiviert

zytotoxisch wirken und proinflammatorische Zytokine sezernieren. Yamazaki und Kollegen konnten eine vermehrte Anwesenheit von NKs im parodontalen Gewebe von Parodontitispatienten im Vergleich zu parodontitisfreien Kontrollprobanden nachweisen (Yamazaki et al., 2001). Genügt die Reaktion des angeborenen Immunsystems nicht für eine suffiziente Abwehr, so kommt es vermittelt durch den Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex, MHC) zur Aktivierung der adaptiven Immunantwort. Die phylogenetisch jüngere, spezifisch erworbene Immunität besitzt eine Gedächtnisfunktion und umfasst T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Immunglobuline.

1.2.4 Parodontale Risikofaktoren

Rauchen und Diabetes mellitus gelten als Hauptrisikofaktoren für eine PA (Grossi et al. 1994; Albandar, 2002). Studien zeigen einen dosisabhängigen Zusammenhang zwischen Nikotinabusus und der Schwere der PA: starke und langjährige Raucher weisen einen größeren Gewebeverlust auf (Bergström, 2004). Ein chronisch zu hoher Blutzuckerspiegel bei Diabetikern (Typ I und Typ II) moduliert die Funktion der PMNs, Monozyten und Makrophagen, mit nachfolgender Destruktion des Parodonts (Mealey, 2006). Durch zu hohe Blutzuckerspiegel werden Fibroblasten verändert, die für den Kollagenstoffwechsel zuständig sind. Die schlechtere Wundheilung bei Diabetikern kann durch erhöhte Mengen an MMPs erklärt werden, da sie das Kollagen angreifen (Mealey, 2006). Es wird angenommen, dass dies durch eine größere Menge an gebildeten „advanced glycation endproducts“ (AGEs) verursacht wird (Katz et al., 2005). AGEs stimulieren Entzündungszellen und führen zu einer stärkeren Vernetzung des Kollagens, sodass das Gewebe schlechter regeneriert (Deschner et al., 2011). Des Weiteren führen AGEs zu einer erhöhten Apoptoserate von Osteoblasten und Fibroblasten (Graves et al., 2006). Neben den AGEs könnten auch Adiponektine eine Rolle spielen. Adiponektine regeln Wundheilungs- und Entzündungsprozesse, Energieumsatz und die Ansprechbarkeit der Zellen auf Insulin.

Studien zeigen den Zusammenhang zwischen der Prävalenz von PA und ansteigendem Alter (Albandar, 2002). Physischer und psychischer Stress, sowie Depressionen wirken sich ebenfalls nachteilig auf die Pathogenese der PA aus und es kommt zu einem Verlust von parodontalem Gewebe und Alveolarknochen (Pistorius et al., 2002; Rosania et al., 2009). Ethnische Unterschiede scheinen ebenso ein Risikofaktor zu sein. Elamin und Kollegen veröffentlichten, dass afrikanisch-stämmige Jugendliche ein signifikant höheres Risiko hatten, an einer AgP zu erkranken als andere Jugendliche. Sie identifizierten in ihrer Studie zusätzlich das männliche Geschlecht als Risikofaktor für das Erkranken an einer AgP (Elamin et al., 2010). In vielen Untersuchungen weist das männliche Geschlecht ein höheres Risiko für Parodontopathien auf, als das weibliche Geschlecht (Grossi et al., 1994; Albandar, 2002). Zudem gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass diese Unterschiede zu sozio-ökonomischen Faktoren assoziiert sind. Zu diesen Faktoren zählen Unterernährung, spezielle Lebensgewohnheiten oder der soziale

Status (Poulton et al., 2002). Immunsystemerkrankungen (bspw. AIDS, Leukämie, Agranulozytose) oder Stoffwechselstörungen (Osteoporose, Hyperparathyreodismus) sind weitere Risikofaktoren für die Entwicklung und Progression einer Parodontopathie (Krall, 2001; Pakfetrat et al., 2015).

1.2.5 Einfluss der Genetik

Das Zusammenspiel zwischen mikrobieller Flora des Mundes, Lebensgewohnheiten und Immunsystem prägt die Entstehung und die Progression einer Parodontopathie. Daneben ist jedoch auch eine genetische Disposition möglich, welche die Entwicklung einer PA begünstigt (Kornman et al., 1997; Kinane & Hart, 2003). Michalowicz führte eine Studie an US-amerikanischen Zwillingen durch, um genetische Einflüsse zu identifizieren. In seiner Studie verglich er monozygote Zwillingspaare mit dizygoten und stellte fest, dass monozygote Zwillingspaare ähnliche Werte bezüglich des Attachmentverlust, Plaqueindex und der Sondiertiefe aufwiesen als dizygoten (Michalowicz et al., 1991). In einer im Jahr 2000 durchgeführten Studie bestätigten Michalowicz et al. vorherige Studien und kamen zu dem Ergebnis, dass der genetische Anteil an der Pathogenese der PA bei ca. 50% liegt (Michalowicz et al., 2000). Genetische Alterationen können die Nukleotidsequenz eines Gens verändern. Dies kann sowohl zu Funktionsveränderungen des Proteins, als auch zu einer veränderten Proteinverfügbarkeit führen, wie zum Beispiel bei Zytokinen des Immunsystems (Kinane et al., 2005). Mögliche genetische Alterationen können zufällig über das menschliche Genom verteilte „Single Nucleotid Polymorphisms“ (SNPs) sein. SNPs, die eine Immunantwort auf die vorhandene intraorale Flora beeinflussen, sind bereits Inhalt zahlreicher Studien. Yoshi und Kollegen veröffentlichten eine Übersicht über Genpolymorphismen, bei welchen eine Assoziation zur PA vermutet wird und deren Auswirkungen auf die immunologische Wirtsreaktion untersucht wurden (Yoshie et al., 2007; da Silva et al., 2017).

Im Gegensatz zur ChP, bei welcher sich umwelt- und sozio-ökonomische Einflüsse über Jahrzehnte summieren, wird bei der AgP ein stärkerer Anteil genetischer Einflussfaktoren vermutet (Vieira & Albandar, 2014; Schaefer et al., 2015).

1.3 Koronare Herzkrankheit

1.3.1 Definition und Epidemiologie

Die KHK gehört zu den häufigsten Todesursachen der westlichen Industrienationen und hat somit einen großen Stellenwert in der Medizin (Lopez et al., 2006). Die Manifestation der Atherosklerose (Arterien-Verkalkung) in den Herzkranzgefäßen wird als KHK definiert. Es kommt zu einer Reduktion des Blutflusses, dessen Folge eine insuffiziente Sauerstoffversorgung des Herzens ist. Bis zu einem gewissen Ausmaß ist dies tolerierbar und wird von den Betroffenen nicht bemerkt. Im fortgeschrittenen Stadium treten Beschwerden auf, wie die Angina pectoris

(Brustenge). Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt (MI) und Herzrhythmusstörungen sind Manifestationen der KHK, welche mit einer hohen Sterblichkeitsrate in Verbindung stehen. Die Inzidenz eines MI kann heutzutage reduziert werden, indem er rechtzeitig erkannt, gemäß der Leitlinie therapiert wird, sowie Maßnahmen zur Reduktion von Risikofaktoren angewendet werden (Robert Koch Institut, 2006). Die Inzidenz einer KHK divergiert zwischen Männern und Frauen. So beträgt die Lebenszeitprävalenz für Frauen 15% und für Männer 30%, wobei die Inzidenz mit dem Alter steigt. Die Letalität liegt bei ca. 40-50% (Helmholtz Zentrum, 2013). Risikofaktoren der KHK sind u.a. Diabetes mellitus, Nikotinabusus, ein hoher Cholesterinspiegel, arterielle Hypertonie, Adipositas und genetische Disposition (Ross, 1995).

1.3.2 Pathogenese

Im Mittelpunkt der KHK stehen, analog zur PA, die Inflammation und komplexe Immunprozesse. Ursache für die Entstehung einer KHK ist die Manifestation der Atherosklerose an den Herzkranzgefäßen. Lipideinlagerungen verursachen bei dieser systemischen, inflammatorischen Erkrankung eine zunehmende Enge der Gefäße (Ross, 1999). Dabei spielen Zelladhäsionsmoleküle, wie das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) und das interzelluläre Adhäsionsmolekül (ICAM-1) eine frühe Rolle in der Entstehung von atherosklerotischen Plaques (Cybulsky & Gimbrone, 1991). Der Bildung der atherosklerotischen Plaques geht eine endotheliale Dysfunktion voraus. Durch den endothelialen Schaden vermitteln Chemokine und Zytokine die B

indung von Monozyten und T-Zellen an VCAM-1 und deren Einwanderung in die Gefäßwand. Monozyten werden zu Makrophagen und nehmen mittels Scavenger-Rezeptoren oxidierte Lipoproteine auf (Ylä-Herttua et al., 1996), die bei Anhäufung veränderter Lipide zu Schaumzellen akkumulieren. Die Aufnahme von oxidierten Lipoproteinen durch Makrophagen stellt unter nicht-pathologischen Umständen einen Schutzmechanismus des Immunsystems dar, um zytotoxische und proinflammatorische oxidativ veränderte Lipoproteine zu eliminieren (Glass & Witztum, 2001).

Sogenannte „Fatty streaks“ sind streifenartige Fetteinlagerungen, bestehend aus lipidbeladenen Schaumzellen, die als Monozyten in die subendotheliale Schicht gewandert sind (Libby, 2006). Aus Monozyten werden Makrophagen, die die Bildung von Schaumzellen begünstigen, und mit aktivierten T-Zellen die Stabilität der Plaques reduzieren, sowie die Thrombusbildung begünstigen (Stary et al., 1995). Der zentrale inflammatorische Mediator Interferon- γ wird von T-Zellen produziert. Interferon- γ veranlasst die Expression einer Vielzahl von proinflammatorischer Zytokine (IL-1 α , β , IL-6, TNF- α), rekrutiert Makrophagen und T-Lymphozyten und begünstigt die Bildung von Schaumzellen (McLaren & Ramji, 2009). Interferon- γ unterstützt durch weitere Prozesse die Progression der Plaques, sodass „Fatty streaks“ mit der Zeit zu fibrinösen Plaques werden, die von Bindegewebe und intra-/

extrazellulären Lipiden umgeben sind (Hansson et al., 1988; Ylä-Herttuala et al., 1996). Im Gegensatz zu den „Fatty streaks“ sind diese atherosklerotischen Plaques irreversibel. So werden die Gefäße immer enger und es kommt zur Koronarstenose.

1.3.3 Risikofaktoren und genetischer Einfluss auf KHK

Die Entstehung einer KHK ist multifaktoriell und abhängig von vielen Risikofaktoren. Die Risikofaktoren werden gemäß der INTERHEART-Studie eingeteilt in nichtmodifizierbare (konstitutionelle) und potentiell modifizierbare Risikofaktoren (Yusuf et al., 2004). Die INTERHEART-Studie wurde in 52 Ländern durchgeführt, um die wichtigsten Risikofaktoren für Herzinfarkte zu ermitteln, unter gleichzeitiger Erfassung regionaler Unterschiede oder ethnischer Gruppen. Alter, Geschlecht und genetische Disposition sind dabei nicht modifizierbare Risikofaktoren. Zu den weltweit bedeutendsten Risikofaktoren für Erkrankungen der Koronararterien zählen modifizierbare Faktoren, wie Nikotinabusus und Stress. Weitere Risikofaktoren sind Dyslipoproteinämie (erhöhte Werte von low density lipoprotein= LDL, erniedrigte Werte von high density lipoprotein=HDL), Adipositas, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, hoher Alkoholkonsum, geringe körperliche Bewegung und geringer Verzehr von Obst und Gemüse. Beim Auftreten mehrerer Risikofaktoren kommt es sowohl zur Addition der einzelnen Risikofaktoren, als auch zum exponentiellen Anstieg des Erkrankungsrisikos (Yusuf et al., 2004). Durch einen gesunden Lebensstil lässt sich das Risiko für eine KHK um 60-80% senken (Stampfer et al., 2000; Chiuve et al., 2006). Auch sozio-ökonomische Faktoren wie das Einkommen nehmen Einfluss auf die KHK (Yan et al., 2017). Im Hinblick auf die Genetik werden molekulare Veränderungen in Kandidatengenen der Atherosklerose gesucht. Bereits Marenberg und Kollegen zeigten anhand von Zwillingstudien den genetischen Einfluss auf die KHK sowohl bei Männern als auch bei Frauen. Ein männlicher, monozygoter Zwilling weist ein 8,1-fach erhöhtes Risiko auf an einer KHK zu versterben, wenn sein Zwillingsbruder bis zum Alter von 55 Jahren an einer KHK verstorben ist. Im Gegensatz lag das Risiko bei dizygoten Zwillingen nur bei 3,8. Bei Frauen waren die Ergebnisse ebenso eindeutig: Monozygote Zwillingsschwester hatten ein 15-fach erhöhtes Risiko an einer KHK zu versterben, wenn eine der Schwestern vor dem Alter von 65 Jahren durch eine KHK verstarb. Bei dizygoten Schwestern betrug das Risiko 2,6 (Marenberg et al., 1994). Bis heute sind 46 Risikogene für eine KHK bekannt. Zusätzlich konnten 104 weitere Gene identifiziert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit das Krankheitsrisiko erhöhen (The CARDIoGRAMplusC4D Consortium, 2012). Der größte Teil dieser Genvarianten liegt in non-coding Bereichen, nur ein kleiner Teil liegt in codierenden Genabschnitten. Weitere Veränderungen wurden in Genen für die Immunabwehr, Endothelfunktion- und regeneration, Hypertonie, Triglyceride, LDL und HDL identifiziert (McPherson, 2013).

1.4 Wechselwirkung zwischen Parodontitis und KHK

1.4.1 Assoziationsstudien zwischen Parodontitis und KHK

Sowohl PA, als auch die KHK sind multifaktorielle, inflammatorische Erkrankungen. Bereits im letzten Jahrhundert wurde durch Studien eine mögliche Beziehung zwischen Infektionen und atherosklerotischen Läsionen gezeigt (Frothingham, 1911). Der Zusammenhang zwischen PA und KHK rückte immer mehr in den Fokus von Studien, welche die Bedeutung einer parodontalen Inflammation für das Risiko und die Prognose der KHK darlegen wollten. Es wurden vor allem klinische Assoziationsstudien durchgeführt, aber auch in-vitro Experimente, Tierversuche und histopathologisch-immunologische Untersuchungen erbrachten neue Erkenntnisse. Matilla und Kollegen stellten 1989 fest, dass die Mundgesundheit bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt signifikant schlechter war, als bei einer gesunden Kontrollgruppe (Mattila et al., 1989). Joshipura und Kollegen stellten in ihrer Studie fest, dass Männer mit einer parodontalen Erkrankung und ≤ 10 Zähnen ein höheres Risiko hatten an einer KHK zu erkranken, als Männer, die 25 oder mehr Zähne hatten (Odds Ratio [OR]= 1,67; 95% Konfidenzintervall [KI]: 1,03-2,71) (Joshipura et al., 1996). In weiteren Studien war das relative Risiko bei Parodontitispatienten eine KHK zu erleiden ebenfalls bestätigt worden (Humphrey et al., 2008). Da die mikrobielle Besiedelung der Mundhöhle ein Pathogenitätsfaktor in der Ätiologie der PA ist, wurde die Bedeutung der Parodontopathogene für Koronarereignisse untersucht. Es konnte u.a. *P.g.* in atherosklerotischer Plaque nachgewiesen werden (Chiu, 1999). Viele Studien stellten positive Assoziationen zwischen der subgingivalen Plaque und der KHK fest (Haraszthy et al., 2000; Nonnenmacher et al., 2007). Eine indische Forschergruppe wies bei Patienten die DNA von *A.a.*, *P.g.*, *P.i.* und *T.f.* sowohl in deren atherosklerotischen Plaques, als auch in deren subgingivalen Plaque nach (Rath et al., 2014). Anhand von 11.869 untersuchten Frauen und Männer konnte ein Zusammenhang zwischen schlechter Mundhygiene und einem erhöhten Risiko einer KHK festgestellt werden (Oliveira et al., 2010). Eine Studie untersuchte geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der Wechselwirkung zwischen Parodontalerkrankungen, Zahnverlust und Atherosklerose. Die Daten dieser Studie deuten darauf hin, dass Zahnverlust und ChP im Zusammenhang mit Atherosklerose bei Männern, jedoch nicht bei Frauen stehen. Die Diskrepanz zwischen beiden Geschlechtern könnte durch unterschiedliche Risikofaktoren erklärt werden (Desvarieux et al., 2004).

1.4.2 Biologische Mechanismen für die Beziehung zwischen Parodontitis und KHK

Da beide Erkrankungen eine multifaktorielle Genese haben, liegt es nahe, dass die Assoziation zwischen PA und KHK nicht auf einem einzigen biologischen Mechanismus beruht. Gewisse Pathomechanismen legen einen kausalen Zusammenhang zwischen PA und kardiovaskulären Erkrankungen nahe. Grundlage ist der Eintritt von oralen Bakterien bzw. deren Toxine in den Blutkreislauf. Bakteriämien werden durch Mikroverletzungen in der Mundhöhle ausgelöst (bspw.

Kauen, Zähneputzen) (Kebuschall et al., 2010). Die Parodontopathogene gelangen in den Blutkreislauf und konnten in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden (Haraszthy et al., 2000; Ohki et al., 2012). Taylor-Robinson und Kollegen wiesen unter anderem *A.a.* und *P.i.* in atherosklerotischen Arterien nach (Taylor-Robinson et al., 2002). Anhand von in-vitro und in-vivo Studien konnten die These der direkten Beteiligung von Parodontopathogenen an der Pathogenese der KHK gefestigt werden. *P.g.* fördert die Bildung von Schaumzellen, da es zu einer gesteigerten Migration von Monozyten, einer gesteigerten Aufnahme von LDL durch oxidierte Monozyten und einer gesteigerten Oxidation von LDL kommt (Deshpande et al., 1998; Giacona et al., 2004).

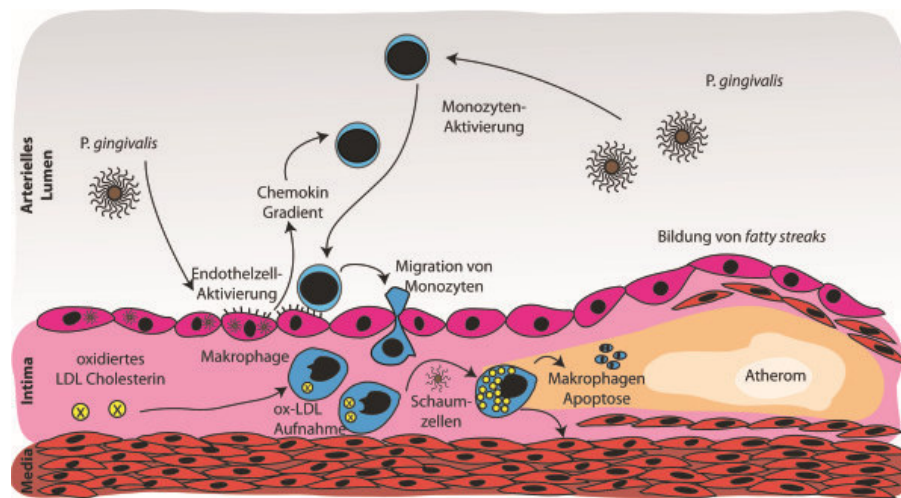


Abb.5: Die durch *P. gingivalis* geförderte Bildung von „Fatty streaks“ (adaptiert nach Kebuschall et al., 2010).

Durch den Nachweis einer quantitativen Keimlast von expliziten, subgingival-parodontalen Keimen und kardiovaskulären Outcomes konnte die These der direkten Beteiligung von Parodontopathogenen an der Progression einer KHK untermauert werden (Desvarieux et al., 2005; Nonnenmacher et al., 2007). Die Auslösung autoimmuner Kreuzreaktionen könnte ebenfalls die Pathogenese der Atherosklerose, durch Parodontopathogene gegen endotheliale Strukturen befördern (Hinode et al., 1998). Hohe Konzentrationen von Antikörpern gegen *P. g.* können das Risiko für eine KHK um das Zwei- bis Dreifache erhöhen (Pussinen et al., 2003). Direkte Effekte parodontaler Bakterien auf die Thrombozytenaggregation wurden in verschiedenen Studien nachgewiesen: wenn proteolytische Enzyme der Parodontopathogene in den Blutkreislauf gelangen, können sie Protein C, Prothrombin und Faktor X aktivieren. Als Folge wird Thrombin freigesetzt, es kommt zur Thrombozytenaggregation, Fibrinogen wird zu Fibrin umgewandelt, was letztendlich zur Bildung intravaskulärer Blutgerinnsel führt und die Thrombosebildung begünstigt (Loesche, 1994; Herzberg & Weyer, 1998). In-vitro Studien deuten darauf hin, dass aufgrund der Invasion von *P. g.* in Endothelzellen die Expression von

Zelladhäsionsmolekülen und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen/ Chemokinen gefördert wird (Takahashi et al., 2006; Roth et al., 2007). Patienten mit schwerer PA haben erhöhte Serumwerte von typischen Entzündungsmarkern wie TNF- α , IL-6 oder CRP (Kurtis et al., 2005; Kanaparthi et al., 2012). Das kardiovaskuläre Risiko ist für Patienten mit erhöhten Serumwerten von Zytokinen (IL-1, IL-6), TNF- α oder CRP ebenfalls verstärkt (Ridker et al., 2000a; Ridker et al., 2000b; Danesh et al., 2008). Des Weiteren stellten Ridker und Kollegen eine vermehrte chronische Koagulationsneigung bei erhöhten CRP-Werten an gesunden Probanden mit höherem kardiovaskulärem Langzeitrisiko fest (Blake & Ridker, 2002; Ridker et al., 2002). Das von der Leber ausgeschüttete CRP bildet Ablagerungen an verletzten Blutgefäßen und bindet Komplement, was eine Phagozytenaktivierung zur Folge hat. Diese setzen Stickoxid frei und begünstigen die Atherombildung (Genco, 1998). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es nach einer Parodontitistherapie, welche die klinischen Symptome der PA vermindert, zu einer herabgesetzten Expression des Entzündungsmarkers CRP kam (Paraskevas et al., 2008).

1.4.3 Gemeinsame genetische Risikofaktoren

Polymorphismen treten in einer Population mit einer Mindestfrequenz von 1% auf. Der Großteil der Bevölkerung weist Polymorphismen in Genen auf, die nur unter gewissen Umwelteinflüssen eine Krankheit, bzw. das Risiko an ihr zu erkranken, beeinflussen können. Dies wird durch die Tatsache untermauert, dass spezifische Allelfrequenzen häufiger bei Erkrankten als bei Gesunden nachzuweisen sind, auch wenn keine eins-zu-eins Korrelation eines spezifischen Allels zu einer komplexen Erkrankung besteht (Kinane & Hart, 2003; Kinane et al., 2005). Single Nucleotid Polymorphisms (SNPs) sind die am häufigsten auftretenden genetischen Marker und stehen im Mittelpunkt der genetischen Epidemiologie. SNPs können in nicht kodierenden Regionen (Introns, bspw. ANRIL), kodierenden Regionen (Exons) oder in regulatorischen Genregionen lokalisiert sein (Vaithilingam et al., 2014). Sowohl genetische Faktoren (Michalowicz et al., 2000; Topol et al., 2006), als auch Lebensgewohnheiten (z.B. Ernährung, Rauchen, Sport, Stress) (Borrell & Papanou, 2005) beeinflussen die Entstehung und die Progression von multifaktoriellen Erkrankungen wie PA und die KHK. Bei multifaktoriellen Krankheiten führt nicht ein abberantes Gen alleine zur Ausprägung der Krankheit, sondern die Interaktion verschiedener Gene untereinander bzw. der Gene zur Umwelt.

In der vorliegenden Studie wurde die lange nicht-codierende RNA ANRIL als parodontaler und kardiovaskulärer Risikomarker untersucht. Der Einfluss des ANRIL-Gens auf den Glukosemetabolismus, die Inflammation und den Lipidstoffwechsel, welche wiederum Einfluss auf PA und kardiovaskuläre Erkrankungen haben, wurde bereits in mehreren Studien behandelt (Ahmed et al., 2013; Bochenek et al., 2013; Hannou et al., 2015). Bochenek et al. (2013) zeigen in ihrer Studie, dass spezifische Isoformen von ANRIL verschiedene Gene des Glukose- und Fettsäurestoffwechsels (ADIPOR1, VAMP3 und C11ORF10) regulieren können. Andere Studien

bestätigten die wichtige Bedeutung des ANRIL-Gens für den Glukose- und Fettstoffwechsel und bei der Regulation kardiometabolischer Gene (Helfand et al., 2009; Ghanbari et al., 2015).

1.5 Die lange nicht-kodierende RNA ANRIL

1.5.1 Chromosom 9p21.3

ANRIL liegt auf Chromosom 9p21.3 (Abb. 6). In genomweiten genetischen Assoziationsstudien wurde der häufigste Befund zur Genetik von PA und KHK auf Chromosom 9p21.3 veröffentlicht (Helgadottir et al., 2007; McPherson et al., 2007; Samani et al., 2007; Schaefer et al., 2011, 2013; Aarabi et al., 2017).

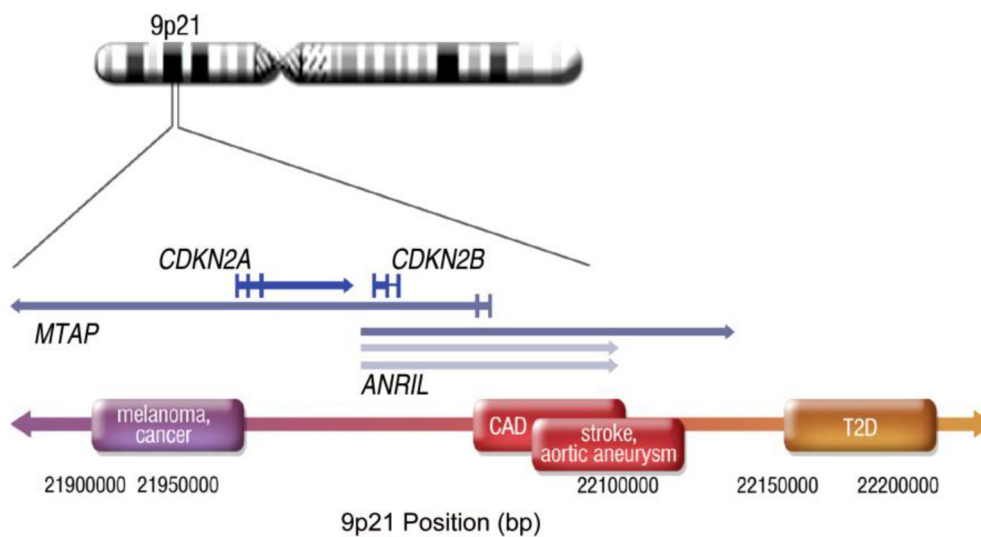


Abb. 6: Überblick über den Chromosom-9p21.3-Locus mit den Genen CDKN2A, CDKN2B, CDKN2BAS (ANRIL) und MTAP. Kodierte Transkripte sind als graue Pfeile gemäß ihrer Lage und Richtung dargestellt. Ganz unten sind verschiedene Phänotypen dargestellt, mit denen Abschnitte des 9p21.3-Locus eine Assoziation zeigen. (Typ-2-Diabetes: T2D) (modifiziert nach Zeller et al., 2012).

Für ANRIL (=antisense noncoding RNA in the INK4 locus) existieren mehrere Synonyme: CDKN2BAS (CDKN2B antisense RNA) und CDKN2B-AS1 (CDKN2B antisense RNA 1). In unmittelbarer Umgebung auf dem INK4b-ARF-INK4a Locus (inhibitor of cyclin-dependent kinase 4, INK) befinden sich die zwei cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren CDKN2A und CDKN2B und die Methylthioadenosin-Phosphorylase (MTAP) (Cunnington et al., 2010). CDKN2A und CDKN2B kodieren für drei Proteine, welche ihrerseits als Tumorsuppressorgene und in der Zellzykluskontrolle für Proliferation, Zellalterung und Apoptose involviert sind (Gilley & Fried, 2001). Das MTAP-Gen kodiert für ein Enzym, welches die Phosphat-abhängige Abspaltung eines Adenins von 5'-Desoxy-5'-methylthioadenosin unterstützt und somit zur Polyamin-Biosynthese beiträgt. Polyamine sind für die DNA-Replikation, sowie die

Zellproliferation wichtig und Mutationen des *MTAP*-Gens wurden mit der Karzinogenese in Zusammenhang gestellt (Thomas & Thomas, 2001; Hellerbrand et al., 2006).

1.5.2 ANRIL

ANRIL ist der am besten replizierte Risiko-Locus für PA und Atherosklerose (Helgadottir et al., 2007; Schaefer et al., 2009). Über den STAT1 (Signal Transducer and Transcription 1) - Signalweg, der die Entzündungsantwort nach Stimulierung mit dem entzündungsfördernden Zytokin Interferon- γ steuert, wird ANRIL reguliert (Harismendy et al., 2011). Auch der TGF- β -Signalweg wird diskutiert (Schaefer et al., 2015). Das Gen ANRIL codiert eine lange Ribonukleinsäurekette (RNA-Transkript). ANRIL scheint einen regulatorischen Einfluss auf die Aktivität anderer Gene zu nehmen. Der cis-regulatorische Einfluss auf seine Nachbar-Tumorsuppressorgene *CDKN2A / B* wurde bereits beschrieben (Yap et al., 2010). Die meisten krankheits-assoziierten Polymorphismen wurden mit der Expression von ANRIL anstelle von *CDKN2A / B* oder *MTAP* assoziiert (Holdt et al., 2010; Congrains et al., 2012; Congrains et al., 2013). So wird vermutet, dass ANRIL unter anderem ein Risikofaktor für Typ-2-Diabetes (Cugino et al., 2012), Alzheimer (Emanuele et al., 2011), oder diverse Krebsarten wie Leukämie (Sherborne et al., 2010) oder das Melanom (Kumar et al., 2001) ist.

In der vorliegenden Studie wurden die SNPs rs1333049 und rs3217992 untersucht, da es hierzu bereits funktionelle Analysen gibt. Ahmed und Kollegen belegten eine Assoziation des rs1333049 zur KHK und zum Myokardinfarkt (Ahmed et al., 2013). Ferner zeigten Schaefer und Kollegen, dass ein Zusammenhang des rs3217992 zur AgP besteht (Schaefer et al., 2011). Es wurden Assoziationen des ANRIL-Gens zur PA unter anderem in deutschen, niederländischen, irischen und türkischen Populationen anhand weiterer Studien untersucht und bestätigt (Ernst et al., 2010; Schaefer et al., 2011; Schaefer et al., 2013). Wie genau diese Varianten des ANRIL-Gens zu unterschiedlichen Krankheitsausprägungen führen, ist noch unbekannt. Bochenek und Kollegen wiesen *trans*-regulatorische Funktionen einer verminderten ANRIL-Expression auf die Transkriptionsänderung von *ADIPOR1*, *VAMP3* und *C11ORF10* nach (Bochenek et al., 2013). *ADIPOR1* stellt ein Rezeptor für das Hormon Adiponectin dar. Durch diese Bindung wird der oxidative Abbau von Fettsäuren und die Glucoseaufnahme geregelt. Darüber hinaus hat Adiponectin einen Einfluss in der Unterdrückung metabolischer Störungen (T2D, Adipositas). Bereits durch Divaris et al. (2012) wurden *VAMP3* und Parodontitis in Zusammenhang gebracht. Sie zeigten, dass die chromosomale Region von *VAMP3* signifikant mit einem erhöhten Vorkommen von subgingivalen Keimen des orangen Komplexes (Socransky et al., 1998) assoziiert ist. Außerdem nimmt *VAMP3* Einfluss auf die TNF- α vermittelte Phagozytose durch Makrophagen (Murray et al., 2005) und auf die zelluläre Glucoseverfügbarkeit (Schwenk et al., 2008). *C11ORF10* liegt innerhalb von Genen, die einen Einfluss auf die metabolische Regulation des Verhältnisses von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren nehmen. Eine Assoziation u.a. zum

metabolischen Syndrom (Zabaneh & Balding, 2010) sowie zur AgP wurde gezeigt (Bochenek et al., 2013).

Wie in Abbildung 7 dargestellt, nimmt ANRIL einen Einfluss auf Schlüsselgene des Glukosemetabolismus, der Inflammation und des Lipidstoffwechsels (Bochenek et al., 2013).

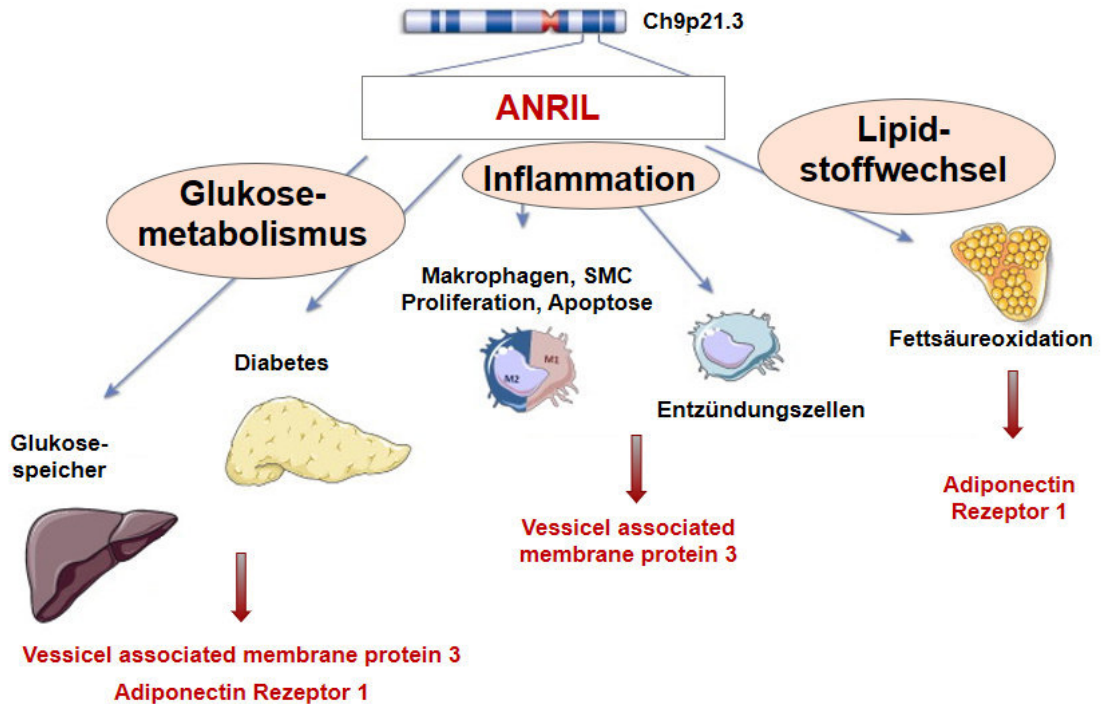


Abb. 7: Übersicht über regulatorische Funktionen von ANRIL (SMC: smooth muscle cells) (adaptiert nach Bochenek et al., 2013; Hannou et al., 2015).

1.5.3 ANRIL als gemeinsames Risikogen der Parodontitis und Atherosklerose

Bereits 2009 wurde die Assoziation zwischen einem erhöhten Risiko an AgP zu erkranken und spezifischen ANRIL-Varianten belegt (Schaefer et al., 2009). 2011 identifizierten Schaefer und Kollegen den SNP rs3217992 als den Polymorphismus mit der größten Assoziation zu AgP. Auch nach Stratifizierung für die Kovariablen Rauchen, Geschlecht und Diabetes (deutsche Probanden: OR=1.48, 95% KI: 1.19 - 1.85; p= 0.0004) blieb dieser SNP signifikant (Schaefer et al., 2011). In-vivo konnten sie die Genexpression von CDKN2BAS, CDKN2A/B und CDK4 in gesundem und entzündeten Epithel der Gingiva und im Verbundepithel nachweisen. Des Weiteren wiesen sie eine signifikant erhöhte Expression von CDKN2BAS im gesunden Verbindungsepithel im Vergleich zum gesunden Gingivaepithel nach. Nach einer 24-stündigen Stimulierung mit *P.g.* in Streptococcus gordonii vorbehandelten, gingivalen Fibroblasten und kultivierten gingivalen Epithelzellen wurde eine 25-fache Zunahme der CDKN2BAS-Genexpression in beiden Zelllinien detektiert.

In Bezug zur Atherosklerose ist der Chromosomenabschnitt 9p21.3 der am häufigsten replizierte Gen-Lokus des Menschen (Roberts & Stewart, 2012). Holdt und Kollegen zeigten, dass die

ANRIL-Transkriptionslevel mit der Schwere der Atherosklerose korrelieren (Holdt et al., 2010). Das Ausschalten von ANRIL in vaskularisierten glatten Muskelzellen von Säugetieren führte zu einer verminderten Zellproliferation, wohingegen eine Überexpression von ANRIL eine beschleunigte Proliferation und eine verminderte Apoptoserate zur Folge hatte (Holdt & Teupser, 2013). Die beiden in der vorliegenden Studie untersuchten Polymorphismen rs1333049 und rs3217992 wurden bereits in Zusammenhang mit PA und KHK gebracht. Ahmed et al. (2013) wiesen nach, dass der SNP rs1333049 in der pakistanischen Bevölkerung mit MI assoziiert ist. In ihrer Fall-Kontroll-Studie mit 611 Probanden, identifizierten sie den CC-Genotyp als Risikogenotyp ($p < 0.001$). Das Risikoallel C trat bei Patienten mit MI signifikant häufiger auf, als in einer gesunden Kontrollgruppe (OR= 1,55, 95%KI: 1,22-1,96; $p < 0,001$). Auch in der logistischen Regression wurde das C-Allel als Risikoallel für MI bestätigt unter Einbeziehung weiterer Risikofaktoren (OR= 3,17, 95%KI: 1,85-5,44; $p < 0,001$). Schaefer et al. zeigten sieben mit AgP assoziierte ANRIL SNPs, wobei rs3217992 die höchste Signifikanz aufwies (AgP holl. Probanden: OR= 2,53, 95%KI: 1,29-5,1; $p = 0,007$) (Schaefer et al., 2011). Diese Assoziationsstudien lassen vermuten, dass SNPs im ANRIL-Gen indikativ für PA und KHK sein könnten und sie liefern wichtige Erkenntnisse für deren Ätiopathogenese, indem sie auf die Interaktion des Glukose- und Fettmetabolismus mit dem Immunsystem hinweisen.

2 Zielstellung

Bereits seit langem wird ein Zusammenhang zwischen entzündlichen parodontalen und systemischen Erkrankungen diskutiert. Eine Vielzahl von Studien stützt die Hypothese, dass sowohl orale Mikroorganismen und deren Toxine, als auch ein Anstieg der systemischen Entzündungsreaktion bei PA für diesen Zusammenhang verantwortlich sind. Seit mehreren Jahren rückten genetische Untersuchungen zum Zusammenhang von PA und KHK in den Fokus (Aarabi et al., 2017). So war es Ziel dieser Arbeit eine Assoziation zwischen parodontalen und kardiovaskulären Erkrankungen auf genetischer Ebene festzustellen. Die gemeinsame Schnittstelle wurde auf dem ANRIL-Gen gesucht. Im Mittelpunkt stehen zwei Polymorphismen des ANRIL-Gens (rs1333049 und rs3217992), welche sich auf Chromosom 9p21.3 befinden. Bereits Schaefer und Kollegen haben im Jahr 2011 die Assoziation des SNP rs3217992 zur PA nachgewiesen (Schaefer et al., 2011). Ahmed und Hannou et al., belegten eine Assoziation des SNP rs1333049 zur KHK und zum Myokardinfarkt (Ahmed et al., 2013; Hannou et al., 2015).

2.1. Ziele der Basisuntersuchung

- Hauptziel Basisuntersuchung: Ist es möglich unter stationären Patienten mit KHK eine mögliche Assoziation der SNPs rs1333049 und rs3217992 des ANRIL-Gens zur Schwere der PA nachzuweisen?

- Nebenziele Basisuntersuchung: Bestehen Assoziationen der SNPs des ANRIL-Gens zu klinischen und parodontologischen Parametern, zum Auftreten von parodontopathogenen Bakterien, zu serologischen Parametern, sowie zu bekannten Vorerkrankungen?

2.2. Ziele des 3-Jahres Follow-Up

- Hauptziel 3-Jahres-Follow-Up: Können diese SNPs als Prognosefaktoren für das Auftreten eines kombinierten Endpunktes (kEP) (kardiovaskulärer Tod, Tod durch Schlaganfall, Myokardinfarkt, Schlaganfall/TIA) innerhalb eines 3-Jahres-Follow-Ups herangezogen werden?
- 3-Jahres-Follow-Up: Sind die SNPs prognostisch von Bedeutung bei separater Betrachtung der Endpunkte kardiovaskulärer Tod, Tod durch Schlaganfall, Myokardinfarkt, Schlaganfall/TIA?

Sollte der Zusammenhang zur Schwere der PA bzw. der Inzidenz des kEPs bestätigt werden, so könnten PA- und KHK-Patienten in ein intensiveres Recall aufgenommen werden, über zukünftige Risiken aufgeklärt und präventive Maßnahmen ergriffen werden. Auf zahnmedizinischer Ebene könnten gefährdete Patienten von Parodontologen engmaschiger und spezialisierter behandelt werden.

2.3 Hypothesen

Basisuntersuchung

H1: Das C-Allel /der CC-Genotyp des rs1333049 (Ahmed et al., 2013), sowie das A-Allel/der AA-Genotyp des SNP rs3217992 (Schaefer et al., 2011) sind mit einer schweren PA assoziiert.

H2: Patienten, welche das C-Allel/den CC-Genotyp (rs1333049) bzw. das A-Allel/den AA-Genotyp (rs3217992) tragen, weisen bei den dentalen, parodontologischen Untersuchungen signifikante Krankheitsmerkmale auf.

H3: Parodontopathogene, subgingivale Keime werden bei Trägern des C-Allels/CC-Genotyps (rs1333049) und bei Trägern des A-Allels/AA-Genotyps (rs3217992) häufiger nachgewiesen.

H4: Aufgrund der mit dem C-Allel/CC-Genotyp (rs1333049), sowie dem A-Allel/AA-Genotyp (rs3217992) einhergehenden erhöhten Entzündungslast, weisen Träger dieser Allele bzw. Genotypen einen erhöhten Spiegel der Entzündungsmediatoren CRP oder IL-6 auf.

H5: Träger des C-Allels/CC-Genotyps (rs1333049) und des A-Allels/AA-Genotyps (rs3217992) haben häufiger kardiovaskuläre Vorerkrankungen.

3-Jahres Follow-Up

H6: Patienten, die das C-Allel/den CC Genotyp (rs1333049) bzw. das A-Allel/den AA-Genotyp (rs3217992) tragen, erleiden signifikant häufiger einen kardiovaskulär bedingten kEP innerhalb des 3-Jahres Follow-Ups.

H7: C-Allel/CC-Genotypen (rs1333049) und A-Allel/AA-Genotypen (rs3217992) widerfährt bei separater Betrachtung der einzelnen Endpunkte häufiger ein kardiovaskuläres Sekundärereignis.

3 Material und Methodik

3.1 Patienten

3.1.1 Auswahl der Patienten

Die vorliegende Studie ist eine Substudie der Studie ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01045070, Titel: „Parodontale Erkrankungen und ihre mikrobiologischen Erreger als Risikofaktoren für kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit Koronarer Herzerkrankung“. Alle Probanden wurden vor der Untersuchung schriftlich und mündlich über das Ziel der Studie informiert. Die Basisuntersuchungen erfolgten von Oktober 2009 bis Februar 2011. Jeder Patient unterschrieb eine Einverständniserklärung zur Verwendung seiner persönlichen Daten in anonymisierter Form. Von Seiten der Ethikkommission der Martin-Luther-Universität erhielt die Studie ein positives Votum.

3.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Probanden waren Kaukasier und hatten das 18. Lebensjahr vollendet. Ausgewählt wurden die Probanden an der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Die Anzahl der Probanden betrug 1002. In diese Studie wurden Patienten eingeschlossen, bei denen angiographisch eine Koronarstenose von mindestens 50% von mindestens einer dominanten Herzkranzarterie nachgewiesen wurde.

Ein Ausschluss aus der Studie erfolgte bei Funktionsstörungen oder Krankheiten, welche eine Teilnahme nicht ermöglichen. Zum Ausschluss führte auch eine nicht mehr als 30 Tage zurückliegende klinische Prüfung des Patienten im Zusammenhang mit einer anderen Studie. Außerdem wurden schwangere Probandinnen ausgeschlossen, Probanden, welche Medikamente einnahmen die zu Gingivahyperplasien führen könnten (Hydantoin, Cyclosporin u.a.) und Patienten, welche innerhalb der letzten 6 Monate eine parodontale Therapie (subgingivales Scaling, Kürettage, Lappenoperation) bzw. innerhalb der letzten 3 Monate eine Antibiotikatherapie erfahren haben. Als dentale Voraussetzung mussten die Patienten mindestens vier eigene Zähne besitzen.

3.1.3 Erhebung der klinischen Daten

Die Rekrutierung der KHK-Patienten erfolgte durch apl. Prof. Dr. med. habil. Axel Schlitt, MHA (Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III Halle (Saale), jetzt Paracelsus Harz-Klinik Bad-Suderode). Alle Patienten wurden hinsichtlich kardiologischer Erkrankungen untersucht, einschließlich Langzeit EKG, Echokardiographie und biochemischer Labordiagnostik

(Durchführung erfolgte im Zentrallabor der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität).

Man befragte die Patienten in Form eines halbstandardisierten Fragebogens. Die klinisch-parodontalen Daten wurden unter der Aufsicht von apl. Prof. Dr. med. dent. Stefan Reichert durch die Doktoranden Frau Zahnärztin Andrea Lutze und Herrn Zahnarzt Tim Seifert, innerhalb folgender Parallelstudien, erhoben:

- Parallelstudie A. Lutze: „Die Prävalenz von schwerer Parodontitis bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung und ihre prognostische Bedeutung für erneute kardiovaskuläre Folgeereignisse – eine Longitudinalstudie“
- Parallelstudie T. Seifert: „Ist der Nachweis parodontaler Markerkeime bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung ein Prädiktor für kardiovaskuläre Folgeereignisse?“

Es erfolgte die Einholung der Einverständniserklärung, sowie die Erhebung des Zahn- und Parodontalstatus, inklusive der Probeentnahme zur Bestimmung des mikrobiologischen Befundes von Markerkeimen der PA (*Aggegatibacter actinomycetemcomitans*, *Porhyromonas gingivalis*, *Tannarella forsynthia*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga sputigena*, *gingivalis* und *ochracea*).

In der parodontalen Anamnese wurden die Probanden nach ihrer Häufigkeit des Zähneputzens/ Tag, Häufigkeit eines Zahnarztbesuches/ Jahr und Raucherstatus befragt. Ebenso wurde eine parodontale Familienanamnese aufgenommen.

Der zahnärztliche Befund beinhaltet das Erfassen des DMFT-Index zur Erhebung der Anzahl kariöser (decayed), fehlender (missing) und gefüllter (filled) Zähne. Es wurde der Plaqueindex = PI nach Silness und Loe 1964 ohne Anfärben, aber mit Hilfe einer Sonde aufgenommen an allen 4 Zahnflächen (oral, vestibulär-zentral, vestibulär-mesial, vestibulär-distal) bei allen Zähnen. Die Beurteilung des PI erfolgt von 0-3 (0: keine Plaque durch Inspektion und Sondierung nachweisbar; 1: hauchdünner Belag, der klinisch nicht sichtbar ist, jedoch beim Abschaben mit einer Sonde an der Spitze haften bleibt; 2: bandförmige Beläge, die im Sulkus und im gingivanahen Abschnitt des Zahnes angeheftet sind, jedoch den Interdentalraum nicht ausfüllen; 3: dickere Zahnbeläge, die mit dem bloßen Auge erkennbar sind und den Interdentalraum ausfüllen) (Silness & Loe, 1964). Zur Bestimmung des Ausprägungsgrades der PA wurde eine 6-Punktmessung =PD (probing depth = PD, Distanz marginale Gingiva bis apikaler Stopp bei einem Sondierungsdruck von 0,25 N) mit einer druckkalibrierten Messsonde (DB764R Aesculap AG& Co.KG, Tuttlingen, Germany) vorgenommen und jeweils der höchste Wert pro Zahn nach 6 Messungen (distobukkal, bukkal, mesiobukkal, mesiooral, oral und distooral) notiert, sowie der Attachmentverlust = CAL (clinical attachment loss = CAL), definiert als Distanz Schmelz-Zementgrenze bis apikaler Stopp der Messsonde) und CAL bakt.: Attachmentverlust an

bakterieller Entnahmestelle. In die Mittelwertberechnung gingen jeweils die höchsten Werte für PD und CAL ein. Die Probanden wurden nach den Kriterien von Tonetti und Claffey in zwei Gruppen eingeteilt. Zum einen bestand ein leichter Parodontitisfall, wenn an 2 nicht aneinandergrenzenden Zähnen ein approximaler CAL von größer gleich 3mm vorlag. Ein schwerer Parodontitisfall bestand, wenn bei mindestens 30% der Zähne ein CAL größer gleich 5mm vorlag (Tonetti & Claffey, 2005). Danach wurde der Blutungsindex (BOP) bestimmt (BOP= bleeding on probing, entsprechend Ainamo & Bay, 1975, 4-Punktmessung [bukkal, oral, mesial, distal] an allen Zähnen, 30 sec. warten, messen: Anzahl der Zahnflächen mit Sondierblutung x 100/ Anzahl Zahnflächen) (Ainamo & Bay, 1975). Zuletzt wurde eine Blutentnahme zur Analyse der Genpolymorphismen vorgenommen.

3.1.4 Erhebung der biochemisch-serologischen Daten

Im Rahmen der biochemischen Labordiagnostik wurden die Konzentrationen der Entzündungsparameter C-reaktives Proteins (CRP), Leukozyten und Interleukin-6 ermittelt. Des Weiteren wurde Kreatinin, Gesamtcholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin und Triglyceride bestimmt. Alle serologischen Daten wurden im Zentrallabor der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität bestimmt.

3.1.5 Erhebung der Follow-Up-Daten

Im Rahmen einer Follow-Up-Studie, welche von November 2013 bis Januar 2015 erfolgte, wurden die Probanden nach drei Jahren erneut postalisch kontaktiert und gebeten, den beiliegenden Fragebogen (siehe Anhang) auszufüllen und zurück zu senden (Parallelstudie Ann-Christin Benten: „Kardiovaskuläre Folgeereignisse bei stationären Patienten mit koronarer Herzerkrankung unter Berücksichtigung einer parodontalen Vorerkrankung – 3 Jahres Follow-Up“). Erfolgte keine postalische Rückantwort, so war es notwendig die Informationen telefonisch zu erfragen. War der Patient verstorben, so wurden die zuletzt behandelnden Hausärzten, bzw. Kliniken oder Standesämter bezüglich der Todesursache kontaktiert.

3.2 Genomische Untersuchungen

3.2.1 Blutentnahme

Die Blutabnahmen aller Patienten erfolgten im Rahmen der klinischen Routine. So wurden 9ml venöses Blut aus einer Armvene den Probanden entnommen und in Monovetten kühl gelagert, bis sie zur DNA-Isolation weiterverwendet wurden.

3.2.2 DNA-Isolation

Die Erhebung der genetischen Daten erfolgte im Forschungslabor der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie der Martin-Luther-Universität. Mit Hilfe des QIAamp

Mini Kits erfolgte die DNA-Isolation. 200µl Blut wurden in ein 1,5ml Tube pipettiert und danach 20µl Proteinkinase K und 200µl Puffer AL zugegeben. Es folgte eine schüttelnde Inkubation für 15min bei 56°C. Nach kurzem Vortexen (Vortex Genie, Bender & Hobein AG, Bruchsal, Deutschland) wurden 200µl Ethanol hinzugegeben und auf die Mitte eines Säulchens pipettiert, um das Tube 1min lang bei 8000rpm (Heraeus, Hanau, Deutschland) zu zentrifugieren. Dieses Säulchen wurde nun auf ein neues Sammel tube gesetzt, erst mit 500µl Puffer AW1, dann mit 500µl Puffer AW2 gewaschen und bei 1300rpm für drei Minuten zentrifugiert. Nachdem das Säulchen getrocknet war, wurde die DNA mit 200µl Aqua dest. nach 5-minütiger Inkubation, sowie durch Zentrifugation (bei 1300rpm für 1min) von der Säule eluiert. Bei -20°C wurde die DNA bis zur Verwendung gelagert.

3.2.3 DNA-Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung (Amplifizierung) von spezifischen DNA-Sequenzen dient die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR). Hierbei kommt es nach der Denaturierung des DNA-Doppelstranges zur Anlagerung von Primern an die entstandene Einzelstrang-DNA (Annealing). Im Folgenden, der sogenannten Elongation, wurde die DNA mit Hilfe der *Taq*-Polymerase, durch welche komplementäre Nukleotide an den einzelnen Strang binden können, zum Doppelstrang vervollständigt. Eine PCR umfasste 20-40 Zyklen und lief in einem Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) ab.

3.2.4 PCR zur Genotypisierung des rs1333049 im ANRIL-Gen

Grundlage für die Genotypisierung bildete das ANRIL-Gen (Ahmed et al., 2013). Für die Amplifizierung des 495 bp (Basenpaar) langen Genabschnittes wurden zwei PCR-Ansätze gewählt. Der erste PCR-Ansatz (20µl) enthielt 10µl Mix (Promega), 0,2µl Primer Anril-1, 0,4µl Primer Anril-2, 0,4µl Primer Anril-4, 8µl Wasser und 1µl genomische DNA. Der zweite PCR-Ansatz (20µl) enthielt 10µl Mix (Promega), 0,2µl Primer Anril-1, 0,4µl Primer Anril-3, 0,4µl Primer Anril-4, 8µl Wasser und 1µl genomische DNA. Die Kontroll-PCR (Positivkontrolle) war in beiden Fällen das Produkt aus Primer 1 und 4. Primer 2 und 3 unterschieden sich darin, dass Primer 2 mit C endet und an das C-Allel bindet, wohingegen Primer 3 mit G endet und an das G-Allel bindet. Für jeden Patienten wurden zwei PCRs mit den sequenzspezifischen Primern angesetzt. Zusätzlich erfolgte bei jeder PCR das Ansetzen einer Nullkontrolle ohne Patienten-DNA. Die Sequenz des 495 bp langen Fragments ist in Abbildung 8 dargestellt.

GAAGATCATACCCGAAGTAGAGCTGCAAAGATATTTGGAATATTGGTAATATCCAATA
AAGAATGACCTTCATGCTATTTTGAGGAGATGTTTAAATGTCGAATTATTGAAATATTTAT
AAAATACAAATAAACTAACTCTGCTTCATATTCCAACCTGTGTATGACACTTCTTAGGCTA
TCATTTTCATTCCAAATTTATGGTCACTACCCTACTGTCATTCCTCATACTAACCATATGA
TCAACAGTTSAAAAGCAGCCACTCGCAGAGGTAAGCAAGATATATGGTAAATACTGTGT
TGACAAAAGTATGCAGAAGCAGTCACATTTATACAGTAGTGAAGGAAATGTAAATTGGA
CAAACCTTTTGGGAAGATAAGTTGAGAATGTCAAAAATCAAACACACTTTCTGTTTTATTC
AGCAATTATGAGCCCTTTGTTTTACAGCTATGCTCACAAATATATACAAACATGTATGCA
CAATTATGTTCACTGT

Abb. 8: PCR-Produkt zur Genotypisierung des ANRIL SNPs rs1333049 (Ahmed et al., 2013).

Primer:

ANRIL-1: GAA GAT CAT ACC CGA AGT AGA GCT GC

ANRIL-2: TCC TCA TAC TAA CCA TAT GAT CAA CAG TTC

ANRIL-3: TCC TCA TAC TAA CCA TAT GAT CAA CAG TTG

ANRIL-4: ACA GTG AAC ATA ATT GTG CAT ACA T

Nachdem der PCR-Ansatz erfolgt war, lief die PCR im Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wie folgt ab:

PCR-Programm (ANRIL58):

Denaturierung	95°C	2min	
Denaturierung	92°C	30sec	I
Annealing	58°C	30sec	I 15 Zyklen
Elongation	72°C	30sec	I
Delay	1sec	delay	I
Denaturierung	92°C	30sec	I
Annealing	56°C	30sec	I 26 Zyklen
Elongation	72°C	30sec	I
Delay	1sec	delay	I
Elongation	72°C	5min	
Hold	10°C	hold	

3.2.5 Darstellung im Agarosegel

Für die Darstellung im Agarosegel wurde 1,5% (1,5g) Sekam-Agarose in 50ml 0,5xTBE mit 20µl Midori Green Advance DNA Farbstoff (Verdünnung 1:10) verwendet. Jeweils 15 µl des Ansatzes PCR 1 und 15µl des Ansatzes PCR 2 wurden in Geltaschen nebeneinander pipettiert. Durch die

Agarose-Gelelektrophorese wurden die DNA-Stränge nach ihrer Länge aufgetrennt, indem eine Spannung von 300V für 10min angelegt wurde. Die negativ geladenen DNA-Abschnitte wurden durch die angelegte Spannung durch das Gel in Richtung Anode gezogen. Längere Abschnitte bewegten sich langsamer durch die Gelmatrix als kurze. In die erste Gelkammer wurde eine kommerziell erhältliche DNA-Leiter (Mischung verschiedener DNA-Stränge bekannter Basenpaarlänge) gegeben, mit deren Hilfe man die Längen der jeweiligen DNA-Fragmente bestimmen konnte. Während des Gellaufs lagerte sich der Farbstoff in die DNA ein, sodass es unter UV-Licht fluoreszierte und die DNA-Banden bei einer Wellenlänge von 320nm betrachtet und ausgewertet werden konnten. Ein Beispiel ist in Abbildung 9 dargestellt.

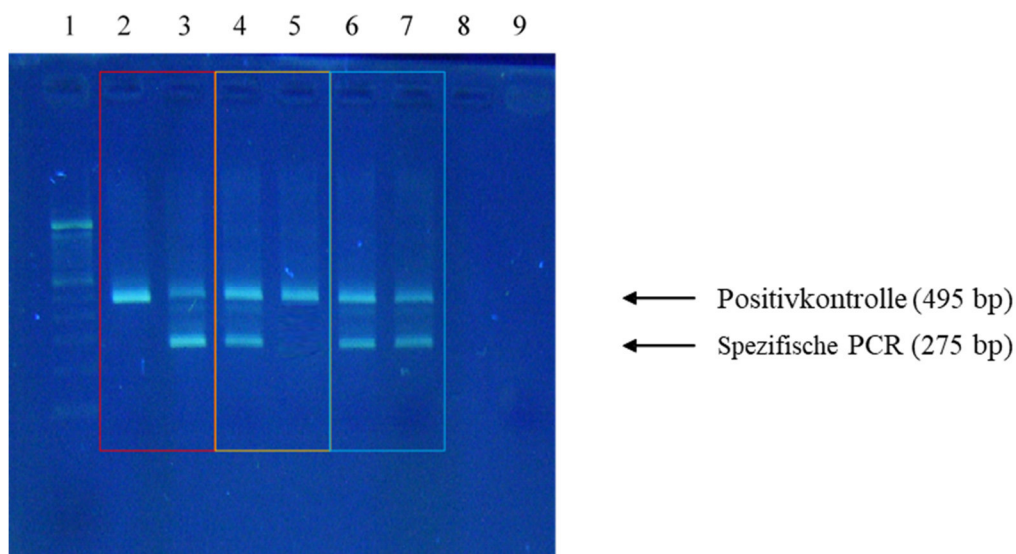


Abb. 9: Genotypisierung des rs1333049 im ANRIL-Gen (bp: Basenpaar).

Tab. 1: Erklärung zu Abb. 9

	Patient	Primerpaare	Genotyp
Bahn 1	100bp-Leiter		
Bahn 2	336h	ANRIL1+2+4	GG-homozygot
Bahn 3		ANRIL1+3+4	
Bahn 4	333h	ANRIL1+2+4	CC-homozygot
Bahn 5		ANRIL1+3+4	
Bahn 6	338h	ANRIL1+2+4	CG-heterozygot
Bahn 7		ANRIL1+3+4	
Bahn 8	Nullkontrolle	ANRIL1+2+4	
Bahn 9		ANRIL1+3+4	

3.2.6 PCR zur Genotypisierung des rs321799 im ANRIL-Gen

Grundlage für die Genotypisierung bildete das ANRIL-Gen (Schaefer et al., 2011). Für die Amplifizierung des 164 bp (Basenpaar) langen Genabschnittes wurde der PCR-Ansatz für 15µl folgendermaßen pipettiert: 7.5µl Mix (Promega), 0,3µl Primer ANRIL-9, 0,3µl Primer ANRIL-10, 5,9µl Wasser und 1µl genomische DNA. Das 164 bp lange PCR-Fragment ist in Abbildung 10 zu sehen.

```
TGGTATCAATTACCACCTGGTTGTATTAA/GAAATAGTAACTTATCAATGCCATGTAAA  
AATTAATTCCATTTTCGAAGCCACCTGGCAGACAGGTTTAGCTGTTTCATCAGCAGC  
CTAATATATACTGTAAATTTGTTAAGGATTCACCTTGAAGGATACATGCA
```

Abb. 10: PCR-Produkt zur Genotypisierung des ANRIL SNPs rs3217992 (Schaefer et al., 2011).

Primer:

Upper primer: **ANRIL-9:** **GGT ATC AAT TAC CAC CTG GTT GTT TT**

Lower primer: **ANRIL-10:** **TGC ATG TAT CCT TCA AAG TGA AAT CC**

Nachdem der PCR-Ansatz erfolgt war, lief die PCR im Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wie folgt ab:

PCR-Programm (ANRIL50):

Denaturierung	95°C	2min	
<hr/>			
Denaturierung	92°C	30sec	I
Annealing	50°C	30sec	I 15 Zyklen
Elongation	72°C	30sec	I
Delay	1sec	delay	I
<hr/>			
Denaturierung	92°C	30sec	I
Annealing	45°C	30sec	I 30 Zyklen
Elongation	72°C	30sec	I
Delay	1sec	delay	I
<hr/>			
Elongation	72°C	5min	
Hold	10°C	hold	

Nach dem Durchlauf im Thermocycler erfolgte ein Gelauftrag im Agarosegel zur PCR-Kontrolle

Hierbei wurde wieder 1,5% (0.75g) Sekam-Agarose (Biozym), in 50ml 0.5xTBE mit 25µl Midori Green Advance DNA Farbstoff (Verdünnung 1:10) verwendet und das Gel 10min bei 300V laufen

gelassen. Eine Nullkontrolle ohne Verunreinigung ist in Bahn 2 dargestellt (Abb. 11). Nach Kontrolle der Proben erfolgte die Spaltung mit einem Restriktionsenzym. Restriktionsenzyme sind spezifische Enzyme, die PCR-Produkte an einer Zielsequenz definiert schneiden, wodurch einzelne DNA Fragmente entstehen.

3.2.7 Restriktionsspaltung mit DraI (20µl Gesamtansatz)

Hierzu wurden 15µl PCR-Produkt, 2µl Puffer cutsmart (NEB), 0,25µl DRAI (20.000U/ml) (NEB) und 2,75µl Wasser als Ansatz pipettiert und dieser für 4 ½ Stunden bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte ein Gelauftrag zur Genotypisierung.

3.2.8 Gelauftrag im Agarosegel zur Genotypisierung

Für die Darstellung im Agarosegel wurde 3% (1g) Sekam-Agarose in 50ml 0,5xTBE mit 20µl Midori Green Advance DNA Farbstoff (Verdünnung 1:10) verwendet. In jede Geltasche wurden 15µl des Ansatzes pipettiert. Nach Durchlauf des Gels erfolgte die Auswertung anhand von Bildern, wie in Abbildung 11 zu sehen ist.

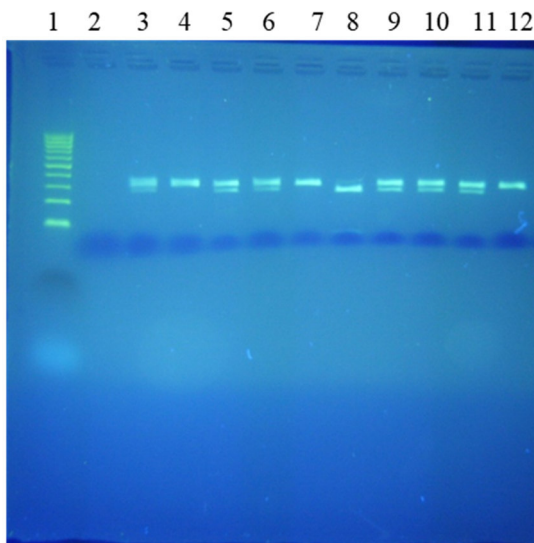


Abb. 11: Genotypisierung des rs321799 im ANRIL-Gen.

Tab. 2: Erklärung Genotypisierung zu Abb. 11.

	Patient	Primerpaare	Genotyp
Bahn 1	100bp-Leiter		
Bahn 2	Nullkontrolle	ANRIL 9+10	
Bahn 3	64h	ANRIL 9+10	AG heterozygot
Bahn 4	70h	ANRIL 9+10	GG homozygot
Bahn 5	152h	ANRIL 9+10	AG heterozygot
Bahn 6	153h	ANRIL 9+10	AG heterozygot

Bahn 7	154h	ANRIL 9+10	GG homozygot
Bahn 8	169h	ANRIL 9+10	AA homozygot
Bahn 9	175h	ANRIL 9+10	AG heterozygot
Bahn 10	323h	ANRIL 9+10	AG heterozygot
Bahn 11	343h	ANRIL 9+10	AG heterozygot
Bahn 12	344h	ANRIL 9+10	GG homozygot

3.3 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm Microsoft SPSS (IBM, Armonk, USA) Version 25.0 verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Mit dem Kolmogorow-Smirnov-Test wurden alle metrischen Daten auf Normalverteilung und mit Hilfe des Levene-Testes auf Varianzhomogenität getestet. Lag eine Normalverteilung vor, so wurde für Mittelwertvergleiche zweier nicht verbundener Variablen der t-Test nach Student verwendet. Bei nicht normalverteilten Werten fand der U-Test nach Mann-Whitney Verwendung. Wenn mehr als zwei Gruppen hinsichtlich der Mittelwerte/ Medianwerte verglichen wurde, verwendete man bei Normalverteilt/ Mittelwert Anova und bei Nichtnormalverteilt/ Median wurde der Kruskal-Wallis Test angewendet. Zur Auswertung von kategorialen Daten wurde der Chi²-Test verwendet und es folgte anschließend eine Yates-Korrektur der Werte. Waren die erwarteten Werte in einer Zelle der Vierfeldertafel $\leq 5\%$, dann wurde der exakte Test nach Fisher verwendet. Der Einfluss mehrerer Faktoren (Confounders) auf eine dichotome Variable wurde mit binärer logistischer Regression berechnet. War die abhängige Variable eine metrische Variable so wurde die lineare Regression angewendet. Mit Hilfe des Kaplan-Meier-Verfahrens, sowie des Log-Rank Tests wurden die Überlebenszeitanalysen durchgeführt. Multivariate Überlebenszeitanalysen wurden mit der Cox-Regression berechnet. Mit Hilfe von Microsoft® Excel wurde getestet, ob die Genotypverteilung der untersuchten ANRIL-Polymorphismen der Hardy-Weinberg-Verteilung entsprach.

3.4 Chemikalien

Genomische Untersuchung

1.DNA-Isolation

QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden (Deutschland)
Aqua dest.	
Ethanol	

2.Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2x Master Mix (50 U/ml <i>Taq</i> Polymerase in Reaktionspuffer pH 8,5, 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP, 3mM MgCl ₂) Aqua dest.	Progema, Mannheim (Deutschland)
--	---------------------------------

Primer für rs1333049:

Anril 1: 5' -GAA GAT CAT ACC CGA AGT AGA GCT GC-3'
Anril 2: 5' -TCC TCA TAC TAA CCA TAT GAT CAA CAG TTC-3'
Anril 3: 5' -TCC TCA TAC TAA CCA TAT GAT CAA CAG TTG-3'
Anril 4: 5'-ACA GTG AAC ATA ATT GTG CAT ACA T-3'

Primer für rs321799:

Anril 9: 5' -GGT ATC AAT TAC CAC CTG GTT GTT TT-3'
Anril 10: 5' - TGC ATG TAT CCT TCA AAG TGA AAT CC-3'

3.Restrictiionsspaltung

Restriktionsenzym DRA I	New England Biolabs, Schwalbach (Deutschland)
-------------------------	--

4.Gelelektrophorese

Sekam-Agarose	Biozym, Oldendorf (Deutschland)
100bp-Leiter	Gibco BRL, Eggenstein (Deutschland)
0,5x TBE-Puffer (45mM Tris-HCL, 45mM Borsäure, 0,5mMEDTA, pH 8,3)	
Midori Green Advance DNA Farbstoff (Verdünnung 1:10)	Biozym, Oldendorf (Deutschland)

3.5 Geräte

Vortex Genie2™	Bender und Hobein AG, Bruchsal (Deutschland)
Thermocycler Gradient (mit Heizdeckel)	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Bioplex® Strehlau und Kruse GmbH, Freiburg (Deutschland)
UV-Transilluminator	AGS,Heidelberg (Deutschland)
Schüttler Unimax 1010	Heidolph Instruments, Schwabach (Deutschland)
Inkubator 1000	Heidolph Instruments, Schwabach (Deutschland)

4 Ergebnisse

4.1 Studienteilnehmer

In die Studie wurden 1002 Patienten aufgenommen. Hiervon konnte bei 933 Patienten eine Genotypisierung durchgeführt werden. Von 933 Patienten waren 444 von einer schweren PA betroffen und 489 Patienten hatten keine oder nur eine leichte PA. Nach drei Jahren (3-Jahres Follow-Up) wurden die Patienten erneut kontaktiert und hinsichtlich eines erneuten kardiovaskulären Ereignisses im Sinne eines kombinierten Endpunktes (kEP) befragt. Dazu zählten kardiovaskulärer Tod, Tod durch Schlaganfall, Myokardinfarkt, Schlaganfall oder transitorische ischämische Attacke (TIA). Bei 47 Patienten war keine Befragung möglich. Dies entsprach einer Drop-Out Rate von 5%. In das 3-Jahres Follow-Up konnten demnach Daten von 886 Studienteilnehmern aufgenommen werden. Bei 143 Patienten trat ein erneutes kardiovaskuläres Ereignis im Sinne des Endpunkts ein. Bei 743 Patienten blieb ein kombinierter Endpunkt aus (Abb. 12).

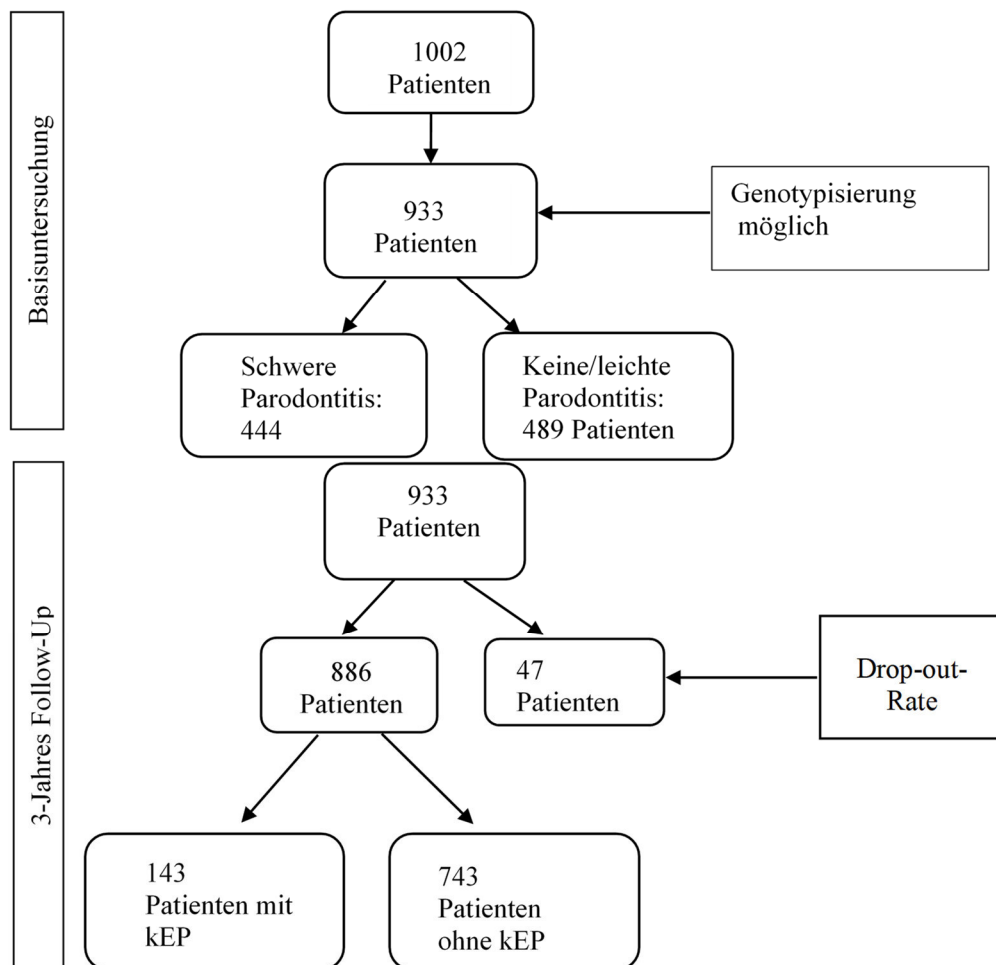


Abb. 12: Flowchart der Patientenaufnahme.

4.2 Basisuntersuchungen: Charakterisierung der Patientenkohorte in Assoziation zur parodontalen Diagnose

Demografische und klinische Daten der Kohorte in Abhängigkeit zur parodontalen Diagnose wurden bereits in einer Parallelstudie publiziert (Kohnert M, Medizinische Dissertation, 2016). Deshalb sollen hier nur prägnante Unterschiede genannt werden.

In der Gruppe der Patienten mit schwerer PA waren signifikant mehr Männer (78,6% vs. 69,7%, $p=0,003$) und aktive Raucher (16,2% vs. 8,8%, $p=0,001$), als in der Gruppe mit keiner bzw. leichter PA. Die Medianwerte für BMI und Alter unterschieden sich nicht signifikant.

Des Weiteren wurden bereits bekannte Vorerkrankungen (Schlaganfall/TIA, Diabetes mellitus, Myokardinfarkt, Periphere Verschlusskrankheit, Bluthochdruck, Dyslipoproteinämie, rheumatoide Arthritis) in Assoziation zur parodontalen Diagnose untersucht. Es war zu erkennen, dass Patienten mit schwerer PA signifikant häufiger bereits an einem Myokardinfarkt erkrankt waren, als Patienten mit keiner oder leichter PA (41,9% vs. 35,2%, $p=0,041$). Die Prävalenz von allen anderen berücksichtigten Erkrankungen unterschied sich hinsichtlich des parodontalen Befundes nicht signifikant.

Bei der Analyse biochemischer Parameter zeigte sich, dass die Werte von CRP und Interleukin-6 in der Gesamtgruppe im Vergleich zu den vom Zentrallabor der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität herausgegebenen Referenzwerten erhöht waren. Außerdem wurden signifikant höhere Werte für CRP (mg/l) (10,15 [5,0/37,68] vs. 7,45 [3,13/28,08], $p=0,011$), IL-6 (8,1 [4,2/17,75] vs. 6,8 [3,4/13,8], $p=0,004$) und Kreatinin (mg/l) (88,0 [73,25/110,75] vs. 85,0 [72,0/104], $p=0,040$) in der Gruppe von Patienten mit schwerer PA im Vergleich zu Individuen mit keiner oder leichter PA gemessen.

In der Gruppe mit schwerer PA war der prozentuale Anteil von Patienten, bei denen die parodontalen Markerbakterien *P.g.* (72,3% vs. 55,2%, $p<0,001$), *T.f.* (81,3% vs. 73,0%, $p=0,003$), *T.d.* (65,3% vs. 55,8%, $p=0,004$), *P.i.* (27,0% vs. 20,0%; $p=0,015$), *P.m.* (82,0% vs. 75,3%, $p=0,016$), *C.r.* (66,7% vs. 57,7%, $p=0,006$) und *E.n.* (37,2% vs. 24,7%, $p<0,001$) nachgewiesen werden konnten, signifikant höher als in der Gruppe mit keiner oder leichter PA. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der parodontalen Diagnose und den anderen parodontopathogenen Bakterien konnte nicht gezeigt werden, jedoch war die Summe der nachgewiesenen verschiedenen Bakterienspezies bei schwerer PA signifikant höher (7,0 [5,0/9,0] vs. 6,0 [4,0/8,0], $p<0,001$).

Klinisch parodontologische Parameter, wie die Indizes für Plaque (1,2 [0,8/2,0] vs. 0,66 [0,4/0,9], $p<0,001$) und Sondierblutung (8,1 [3,6/15,48] vs. 3,7 [0/7,90], $p<0,001$) waren im Patientenkollektiv mit schwerer PA signifikant erhöht. Probanden mit schwerer PA hatten signifikant mehr fehlende Zähne (15,0 [8,0/21,0] vs. 7,0 [3,0/13,0], $p<0,001$) und kariöse Zähne ($0,39\pm 1,1$ vs. $0,21\pm 0,7$, $p=0,004$), wohingegen die Anzahl der gefüllten Zähne (4,0 [1,0/6,0]: schwere PA vs. 7,0 [4,0/10,0]: keine/leichte PA, $p<0,001$) niedriger war. Somit war der DMF-T-

Index in der Gruppe mit schwerer PA signifikant höher (21,0 [14,0/24,0]: schwere PA vs. 15,00 [11,0/21,0]: keine/leichte PA, $p < 0,001$).

4.3 Basisuntersuchungen: ANRIL Polymorphismen rs1333049 und rs3217992

Die Genotypverteilung beider Polymorphismen entsprach dem Hardy-Weinberg-Gesetz.

Untersucht wurde die Allelverteilung sowie die Verteilung der Genotypen in jeder Konstellation. rs133049: CC+CG vs. GG, GG+CG vs. CC, GG+CC vs. CG; rs3217992: AA+AG vs. GG, AG+GG vs. AA und AA+GG vs. AG.

4.3.1 Genotyp- und Allelverteilung beider ANRIL Polymorphismen in Assoziation zum Schweregrad der Parodontitis

rs1333049

Von den insgesamt 933 Patienten, die genotypisiert werden konnten, waren 157 Patienten Träger des CC-Genotyps, 526 Träger des CG-Genotyps und 250 Träger des GG-Genotyps. In Tabelle 3 ist die dazu entsprechende Anzahl der Allele dargestellt. Es ist weder eine Assoziation der einzelnen Genotypen, noch der einzelnen Allele zur Schwere der PA erkennbar (Tab. 3).

Tab. 3: Assoziation des Genotyps und der Allelverteilung des ANRIL rs1333049 zum Schweregrad der Parodontitis.

	Gesamt	Keine oder leichte Parodontitis	Schwere Parodontitis	p-Wert
Genotypen	(n=933)	(n=489)	(n=444)	
CC (%)	16,8	17,4	16,2	0,676*
CG (%)	56,4	55,0	57,9	
GG (%)	26,8	27,6	25,9	
CG + GG (%)	83,2	82,6	83,8	0,698*
CC (%)	16,8	17,4	16,2	
Allele	(n=1866)	(n=978)	(n=888)	
C (%)	45,0	44,9	45,2	0,944*
G (%)	55,0	55,1	54,8	

*Chi²-Test mit Yates-Korrektur

rs3217992

Für den Polymorphismus ANRIL rs3217992 konnten 167 Patienten Träger des AA-Genotyps, sowie 410 Träger des AG-Genotyps charakterisiert werden. 356 Patienten waren Träger des GG-Genotyps. Entsprechend dazu sind die Allele in Tabelle 4 dargestellt. Hinsichtlich der

Allelverteilung konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Patienten mit schwerer PA waren im Vergleich zu Patienten ohne/ mit leichter PA signifikant häufiger AG Genotypträger (Abb. 13, $p=0,022$).

Tab. 4: Assoziation des Genotyps und der Allelverteilung des ANRIL rs3217992 zum Schweregrad der Parodontitis.

	Gesamt	Keine oder leichte Parodontitis	Schwere Parodontitis	p-Wert
Genotypen	(n=933)	(n=489)	(n=444)	
AA (%)	17,9	18,6	17,1	0,056*
AG (%)	43,9	40,3	48,0	
GG (%)	38,5	41,1	34,9	
Allele	(n=1866)	(n=978)	(n=888)	
A (%)	39,9	38,8	41,1	0,323*
G (%)	60,1	61,2	58,9	

*Chi²-Test mit Yates-Korrektur

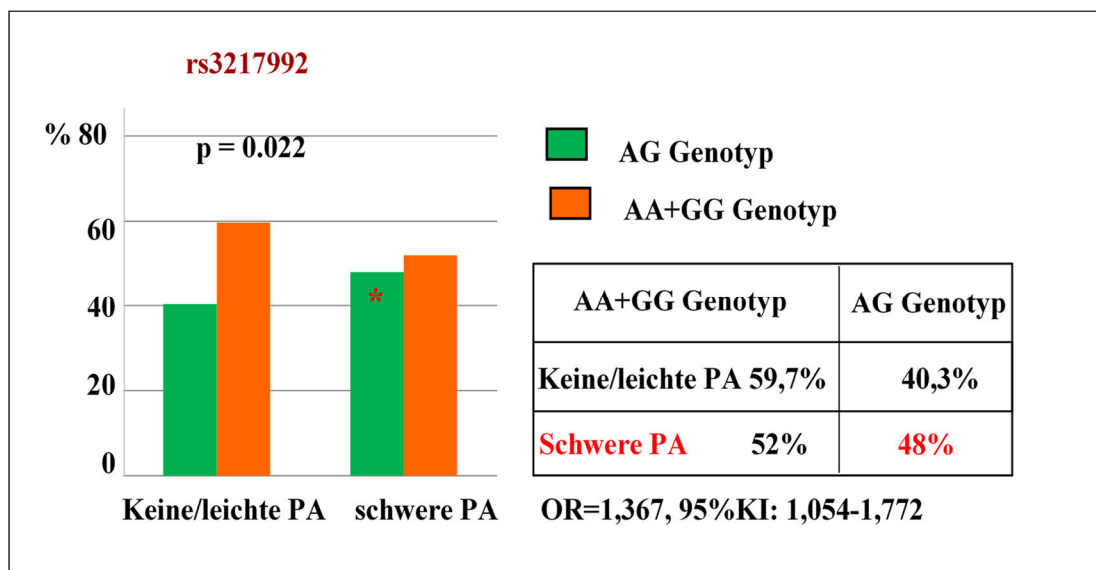


Abb. 13: Assoziation des ANRIL SNPs rs3217992 zur Schwere der Parodontitis. Der AG-Genotyp kam signifikant häufiger bei schwerer Parodontitis vor im Vergleich zur Gruppe mit keiner oder leichter Parodontitis (gekennzeichnet mit *).

Mit Hilfe der binären logistischen Regression wurde untersucht, ob der AG-Genotyp des rs3217992 Polymorphismus auch nach Adjustierung für die Kovariablen Alter, Geschlecht, Rauchen, BMI und Plaqueindex positiv mit der Prävalenz einer schweren PA assoziiert ist. Unter Berücksichtigung dieser Confounder hatten Patienten, die Träger des AG-Genotyps waren, ein

1,4fach erhöhtes adjustiertes Risiko an einer schweren PA zu erkranken (OR= 1,366, 95% KI: 1,024-1,821; p=0,034) (Tab. 5).

Tab. 5: Binäre logistische Regression (Einschluss) zur Untersuchung der Assoziation des ANRIL rs3217992 AG-Genotyps zur Prävalenz einer schweren Parodontitis adjustiert für die Kofaktoren Alter, Geschlecht, Body mass index, Plaqueindex, Raucherstatus und Diabetes (BMI: Body mass index, m: männlich).

	Regressions-Koeffizient	Standard-Fehler	p-Wert	Odds Ratio	95% Konfidenzintervall für EXP(B)	
					Unterer	Oberer
Alter	,014	,008	,058	1,014	1,000	1,030
Geschlecht(m)	,233	,170	,170	1,262	,905	1,760
BMI	,000	,017	,990	1,000	,967	1,034
Plaqueindex	1,241	,117	,000	3,459	2,749	4,352
Raucher	,571	,254	,025	1,769	1,075	2,911
Diabetes	,009	,161	,956	1,009	,736	1,383
AG-Genotyp	,312	,147	,034	1,366	1,024	1,821
Konstante	-2,719	,792	,001	,066		

4.3.2 Parodontologische Parameter in Assoziation zu beiden ANRIL Polymorphismen

Es wurde für beide SNPs überprüft, ob sie zu den klinischen Parametern PI, BOP, PD, CAL, CAL_{bakt}, der Anzahl fehlender, kariöser, gefüllter Zähne und zum DMFT-Index assoziiert waren. Nur Träger des G-Allels oder von Genotypen, die mindestens ein G-Allel des SNPs rs3217992 exprimierten, hatten signifikant höhere BOP-Werte (Tab. 6). Zu allen anderen klinischen Parametern lagen keine Assoziationen vor. Zum rs1333049 konnte ebenfalls keine Signifikanz nachgewiesen werden.

Tab. 6: Assoziation des Genotyps und der Allelverteilung des ANRIL rs3217992 zu BOP (BOP: Bluten auf Sondierung).

	BOP Median, 25/75 Perzentile
Genotypen, rs3217992	
AA	4,8(1,9/7,8)
AG	5,6 (1,375/12,5)
GG	6,25 (2,325/13,75)
p-Wert	0,039
A	5 (1,7/10,7)
G	6,0 (1,9/12,5)
p-Wert	0,009

In der multivariaten Analyse wurde unter Berücksichtigung der Kofaktoren Alter, Geschlecht, Rauchen, Diabetes und BMI die Assoziation des G-Allels auf das Ausmaß der Sondierblutung bestätigt ($p= 0,016$) (Tab. 7). Hinsichtlich der Genotypverteilung konnten in der multivariaten Analyse die AG- bzw. GG-Genotypen nicht als unabhängige Risikofaktoren bestätigt werden.

Tab. 7: Lineare Regression (Einschluss) zur Untersuchung der Assoziation des ANRIL rs3217992 auf BOP mit Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, Rauchen, Diabetes und Body mass index (BMI) (m: männlich), Modellübersicht.

Modell	R	R-Quadrat	Angepasstes R-Quadrat		Standardfehler der Schätzung	
1	,131 ^a	,017	,014		14,2068	
		Standardisierte Koeffizienten			95% Konfidenzintervall für EXP(B)	
		Beta	t-Statistik	p-Wert	Unterer	Oberer
Alter		,010	,393	,695	-,053	,079
Geschlecht(m)		,026	1,106	,269	-,648	2,324
BMI		-,012	-,497	,619	-,189	,113
Plaueindex		-,074	,096	,437	,769	1,120
Raucher		,026	1,019	,308	-1,042	3,295
Diabetes		,114	4,781	,000	2,035	4,865
G-Allel		,056	2,419	,016	,308	2,948
Konstante			1,388	,165		12,067

4.3.3 Assoziation beider ANRIL Polymorphismen zum Nachweis subgingivaler parodontaler Markerkeime

Beide ANRIL SNPs wurden auf ihre Assoziation zu folgenden subgingivalen parodontalen Markerbakterien untersucht: *A.a.*, *P.g.*, *T.f.*, *T.d.*, *E.c.*, *F.n.*, *P.i.*, *P.m.*, *C.r.*, *C.s.*, und *E.n.* Der individuelle Nachweis von *E.c.* und *P.m.* war zur Genotyp- und Allelverteilung des SNP rs1333049 assoziiert. Der Nachweis von *E.c.* war zum SNP rs3217992 assoziiert. Zu allen anderen parodontalen Markerkeimen konnte keine Assoziation nachgewiesen werden.

rs1333049

CG-Genotypträger des ANRIL Polymorphismus rs1333049 wiesen signifikant häufiger *E.c.* ($p=0,028$) in der subgingivalen Plaque auf. Im G-dominanten genetischen Modell konnte die Assoziation zwischen G-Allel tragenden Genotypen und dem Nachweis von *E.c.* bestätigt werden ($p=0,037$). CG+GG-Genotypträger wiesen ein 1,49-fach erhöhtes Risiko einer *E.c.*-Besiedlung auf (Abb. 14).

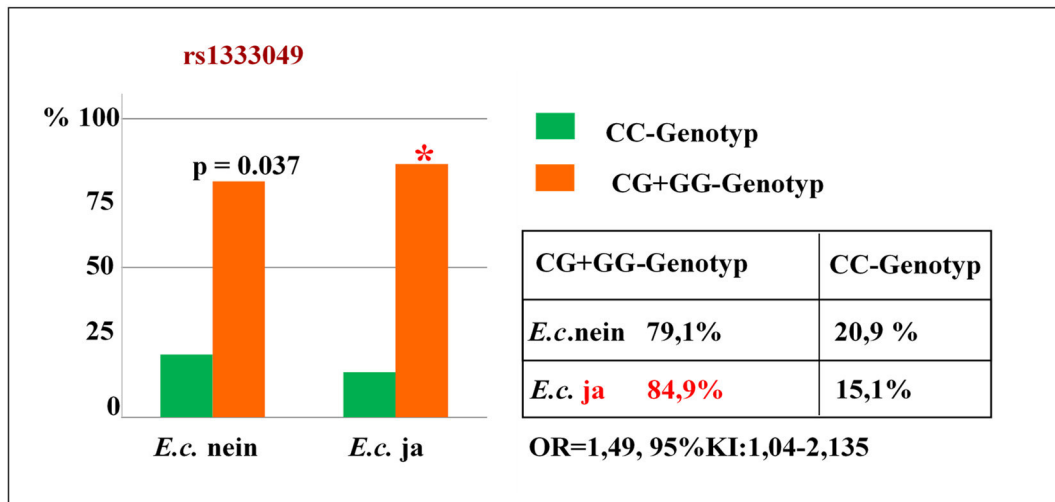


Abb. 14: Assoziation des ANRIL SNPs rs1333049 zum Auftreten von *E.c.* Dargestellt ist der CC+CG Genotyp mit einem signifikant gehäuftem Auftreten von *E.c.* (gekennzeichnet mit *).

In der binär logistischen Regression unter Berücksichtigung der Kovariablen Alter, Geschlecht, Rauchen, BMI und PI wurde der CG+GG-Genotyp als Risikofaktor für eine Besiedelung mit *E.c.* bestätigt (OR= 1,52, 95% KI: 1,06-2,2; p=0,024) (Tab. 8). Es konnten keine signifikanten Assoziationen der Allele zum Auftreten von *E.c.* gefunden werden.

Tab. 8: Binäre logistische Regression (Einschluss) zur Untersuchung der Assoziation des CG + GG-Genotyps des rs1333049 zum Auftreten von *E.c.* unter Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, Body mass index, Plaqueindex, Rauchen und Diabetes (BMI: Body mass index, m: männlich).

	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	p- Wert	Odds Ratio	95% Konfidenzintervall für EXP(B)	
					Unterer	Oberer
Alter	-,029	,008	,000	,972	,957	,987
Geschlecht(m)	,297	,166	,073	1,346	,973	1,862
BMI	,017	,017	,311	1,018	,984	1,052
Plaqueindex	-,074	,096	,437	,928	,769	1,120
Raucher	-,171	,258	,509	,843	,508	1,399
Diabetes	-,113	,159	,478	,893	,654	1,220
CG+GG-Genotyp	,423	,187	,024	1,526	1,059	2,201
Konstante	1,881	,806	,020	6,559		

Im G-dominanten genetischen Modell zeigten CC-Genotypträger häufiger eine Besiedlung mit *P.m.* (Abb. 15).

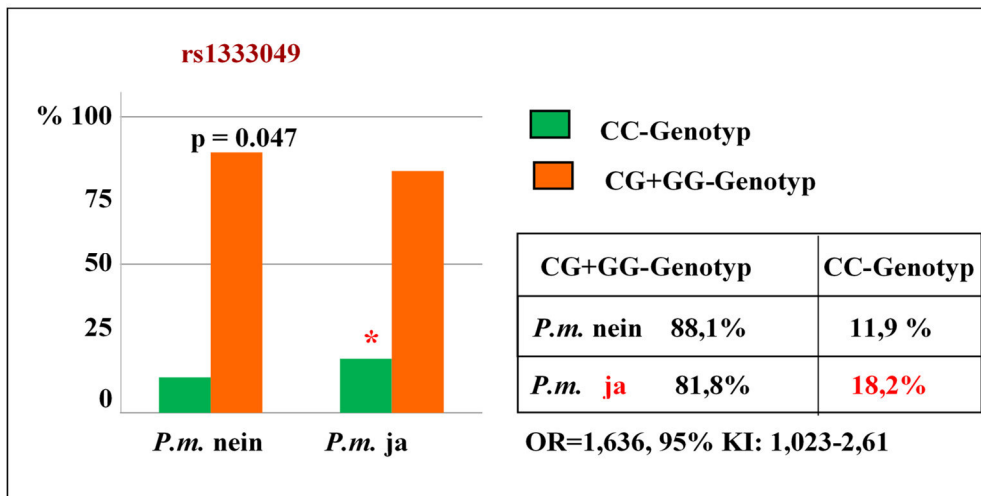


Abb. 15: Assoziation des ANRIL SNPs rs1333049 zum Auftreten von *P.m.* Dargestellt ist der CC- Genotyp mit einem signifikant gehäuften Auftreten von *P.m.* (gekennzeichnet mit *).

Nach binärer logistischer Regression und Berücksichtigung der Kovariablen Alter, Geschlecht, BMI, Rauchen, Diabetes und Plaqueindex konnte die positive Assoziation zwischen dem CC-Genotyp und dem individuellen Nachweis von *P.m.* bestätigt werden. (Tab. 9). Die Allele C und G im Einzelnen waren nicht zum Nachweis von *P.m.* assoziiert.

Tab. 9: Binäre logistische Regression (Einschluss) zur Untersuchung der Assoziation des CC-Genotyps des rs1333049 auf das Auftreten von *P.m.* unter Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, Body mass index, Plaqueindex, Rauchen und Diabetes (BMI: Body mass index, m: männlich).

	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	p-Wert	Odds Ratio	95% Konfidenzintervall für EXP(B)	
					Unterer	Oberer
Alter	-,003	,008	,729	,997	,981	1,014
Geschlecht(m)	-,074	,187	,693	,929	,644	1,340
BMI	,024	,019	,207	1,025	,987	1,064
Raucher	,753	,332	,023	2,124	1,108	4,071
Diabetes	-,108	,176	,539	,898	,636	1,267
Plaqueindex	,200	,112	,076	1,221	,980	1,522
CC-Genotyp	,492	,240	,040	1,636	1,023	2,616
Konstante	,046	,920	,960	1,047		

rs3217992

AG-Genotypträger waren im Vergleich zu AA-Genotyp- und GG-Genotypträgern signifikant häufiger *E.c.* positiv ($p=0,004$). Dies wurde auch im AA+GG vs. AG-Genotypmodell bestätigt (Abb. 16).

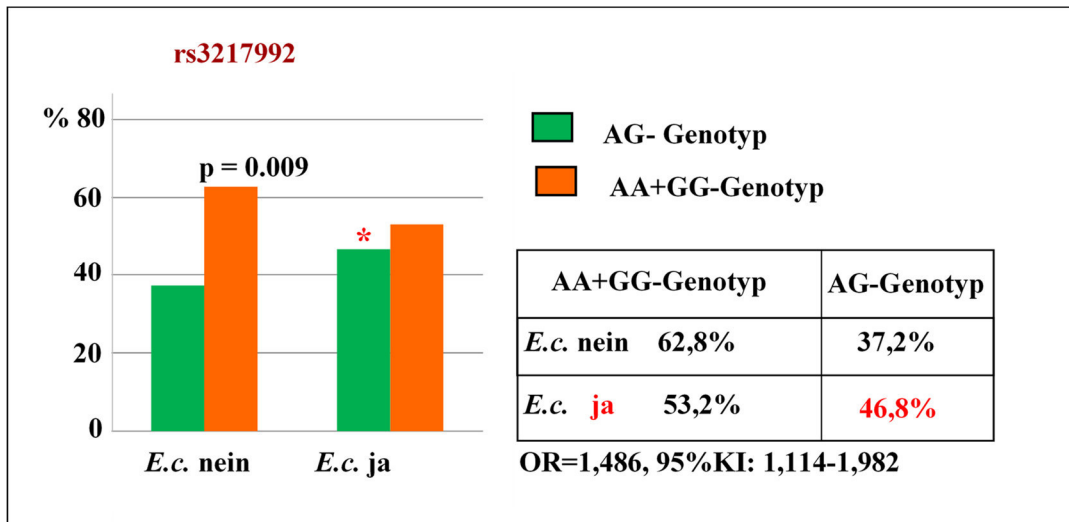


Abb. 16: Assoziation des ANRIL SNPs rs3217992 zum Auftreten von *E.c.* Die signifikante Assoziation des AG-Genotyps ist mit * gekennzeichnet.

Unter Berücksichtigung der Kofaktoren Alter, Geschlecht, BMI, Rauchen, Diabetes und Plaqueindex konnte der AG-Genotyp im multivariaten Modell als unabhängiger Risikofaktor für den individuellen Nachweis von *E.c.* bestätigt werden ($p=0,011$) (Tab. 10).

Tab. 10: Binäre logistische Regression (Einschluss) zur Untersuchung der Assoziation des AG-Genotyps des rs3217992 auf das Auftreten von *E.c.* unter Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, Body mass index, Plaqueindex, Rauchen und Diabetes (BMI: Body mass index, m: männlich).

	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert	Odds Ratio	95% Konfidenzintervall für EXP(B)	
					Unterer	Oberer
Alter	-,028	,008	,000	,973	,958	,988
Geschlecht(m)	,289	,166	,081	1,335	,965	1,847
BMI	,018	,017	,290	1,018	,985	1,053
Raucher	-,210	,259	,418	,811	,488	1,347
Diabetes	-,118	,159	,458	,889	,651	1,214
Plaqueindex	-,085	,096	,377	,919	,762	1,109
AG-Genotyp	,380	,149	,011	1,462	1,091	1,958
Konstante	2,007	,800	,012	7,441		

4.3.4 Assoziation des Genotyps und der Allelverteilung beider ANRIL Polymorphismen zu serologischen Parametern

Beide Polymorphismen wurden daraufhin untersucht, ob Assoziationen zu den Parametern CRP, Leukozyten, IL-6, Kreatinin, Gesamtcholesterin, HDL, LDL und Triglyceride bestanden. Der SNP rs3217992 war zu keinem der genannten biochemischen Parameter assoziiert. Signifikante Assoziationen wurden nur zwischen dem SNP rs1333049 und dem CRP- und HDL Serumspiegel nachgewiesen. CC-Genotypträger des SNP rs1333049 hatten im Vergleich zu CG+GG-Trägern einen signifikant erhöhten CRP-Spiegel ($p=0,025$, Abb. 17).

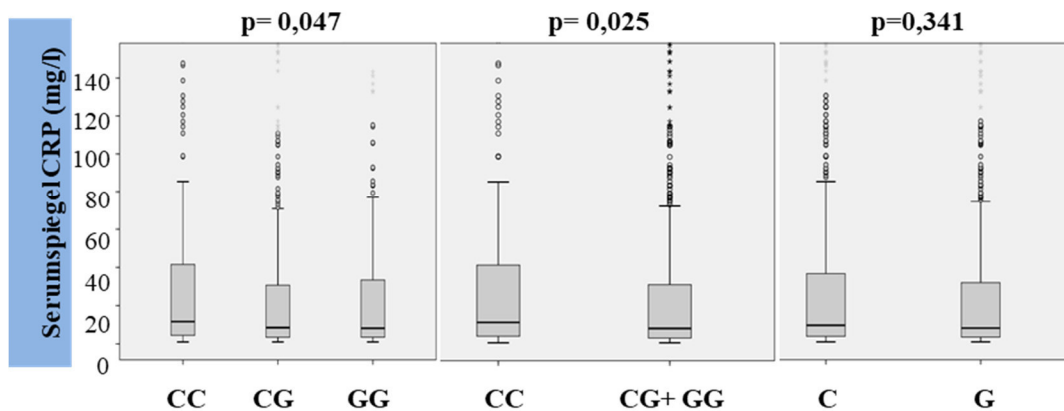


Abb. 17: Boxplotdarstellung zur Untersuchung der Assoziation des ANRIL rs1333049 zum Serumspiegel für CRP (CRP: C-reaktives Protein). CC-Genotypträger hatten einen signifikant höheren Serumspiegel für CRP im Vergleich zu CG- oder GG-Genotypträgern.

Unter der Berücksichtigung weiterer möglicher Kofaktoren wie Alter, Geschlecht, Rauchen, BMI und Diabetes konnte der CC-Genotyp als unabhängiger Risikoindikator für erhöhte CRP-Spiegel in der linearen Regression (Einschluss) bestätigt werden (Tab. 11).

Tab. 11: Lineare Regression (Einschluss) zur Untersuchung einer Assoziation des Genotyps CC des ANRIL rs1333049 auf den CRP-Spiegel unter Berücksichtigung der Kofaktoren Geschlecht, Rauchen, BMI, Diabetes und Alter (BMI: Body mass index).

Modell	R-Quadrat	Angepasstes R-Quadrat		Standardfehler der Schätzung	
1	,010	,003		48,5935	
Modell	Standardisierte Koeffizienten	t-Statistik	p-Wert	Konfidenzintervall für B (95,0%)	
	Beta			Untergrenze	Obergrenze
(Konstante)		1,791	,074	-3,031	66,298
Alter	-,001	-,037	,971	-,327	,315
Geschlecht	-,060	-1,802	,072	-13,843	,590

Raucher	-,033	-,905	,366	-15,335	5,657
BMI	-,013	-,371	,711	-,873	,595
Diabetes	,019	,544	,586	-4,962	8,769
CC-Genotyp	,068	2,075	,038	,482	17,303

Auch HDL war zum rs1333049 signifikant assoziiert. So war der CC-Genotyp mit einem verringerten HDL-Spiegel assoziiert (Abb. 18).

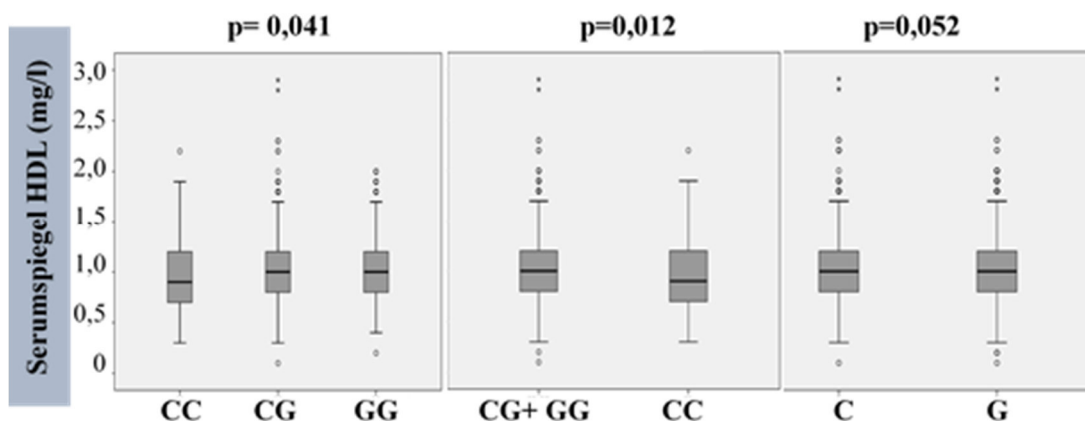


Abb. 18: Boxplotdarstellung zur Untersuchung der Assoziation des ANRIL rs1333049 zum Serumspiegel für HDL (HDL: high density lipoprotein).

Unter Einschluss von Alter, Geschlecht, Rauchen, Diabetes und BMI konnte mit linearer Regression (Einschluss) der CC-Genotyp als unabhängiger Risikofaktor für einen erniedrigten HDL-Spiegel bestätigt werden ($p=0,020$) (Tab. 12).

Tab. 12: Modellübersicht; Lineare Regression (Einschluss) zur Untersuchung der Auswirkung des ANRIL rs1333049 auf den HDL-Spiegel mit Berücksichtigung von Geschlecht, Rauchen, BMI, Diabetes und Alter (BMI: Body mass indes, m: männlich).

Modell	R-Quadrat	Angepasstes R-Quadrat		Standardfehler der Schätzung	
1	,128	,122		,3342	
Modell	Standardisierte Koeffizienten	t-Statistik	p-Wert	Konfidenzintervall für B (95,0%)	
	Beta			Untergrenze	Obergrenze
(Konstante)		6,424	,000	,569	1,070
Alter	,088	2,490	,013	,001	,005
Geschlecht (m)	,265	8,365	,000	,165	,266

Raucher	-,005	-,142	,887	-,079	,069
Diabetes	-,091	-2,781	,006	-,116	-,020
BMI	-,153	-4,686	,000	-,018	-,007
CC-Genotyp	-,073	2,324	,020	7,8	85,5

4.3.5 Assoziation beider ANRIL Polymorphismen zur Prävalenz bekannter Vorerkrankungen

Die Genotyp- und Allelverteilung des SNP rs1333049 unterschied sich nicht signifikant hinsichtlich der zum Zeitpunkt der Basisuntersuchung schon bekannten Vorerkrankungen (Schlaganfall, Myokardinfarkt, PAVK, Diabetes, Dyslipoproteinämie und Rheuma).

Für den SNP rs3217992 konnte ausschließlich zum Schlaganfall eine signifikante Assoziation nachgewiesen werden. Patienten mit einer Genotypkonstellation AA oder GG hatten in der Vergangenheit signifikant häufiger einen Schlaganfall erlitten als AG-Träger (Tab. 13).

Tab. 13: Assoziation des Genotyps/ der Allelverteilung des ANRIL rs3217992 zur Vorerkrankung Schlaganfall.

	Schlaganfall, ja	Schlaganfall, nein	p-Wert
Genotyp rs3217992	(n=122)	(n=811)	
AA (%)	18,1	17,8	0,078*
AG (%)	35,2	45,3	
GG (%)	46,7	36,9	
AG (%)	35,2	45,3	
AA +GG (%)	64,8	54,7	0,048* OR=1,517, 95%KI: 1,021-2,257
Allele	(n=244)	(n=1622)	
A (%)	35,7	40,5	0,170*
G (%)	64,3	59,5	

*Chi²-Test mit Yates-Korrektur

In der binär logistischen Regression wurde getestet, ob die AA+GG-Genotypkonstellation als unabhängiger Risikofaktor für die Prävalenz eines zum Untersuchungszeitpunkt der Basisuntersuchung schon bekannten Schlaganfalls bestätigt werden konnte. Unter Berücksichtigung der Kovariablen Alter, Geschlecht, BMI, Rauchen, Diabetes und Plaqueindex konnte die Genotypkonstellation AA+GG als unabhängiger Risikofaktor bestätigt werden (OR=1,497, 95% KI: 1,003-2,235; p=0,048) (Tab. 14).

Tab. 14: Binäre logistische Regression (Einschluss) zur Untersuchung einer Assoziation der ANRIL rs3217992 AA + GG Genotypen zur Prävalenz eines zum Zeitpunkt der Basisuntersuchung bekannten Schlaganfalls mit Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, Body mass index, Rauchen, Diabetes und Plaqueindex (BMI: Bodymass index, m: männlich).

	Regressions - Koeffizient	Standard- fehler	p-Wert	Odds Ratio	95% Konfidenzintervall für EXP(B)	
					Unterer	Oberer
Alter	,007	,010	,500	1,007	,987	1,028
Geschlecht(m)	,219	,238	,357	1,245	,781	1,985
BMI	-,037	,024	,122	,964	,920	1,010
Raucher	-,248	,370	,503	,780	,378	1,612
Diabetes	,545	,208	,009	1,725	1,148	2,592
Plaqueindex	,090	,127	,476	1,095	,854	1,403
AA+GG-Genotyp	,404	,204	,048	1,497	1,003	2,235
Konstante	-2,024	1,084	,062	1,132		

4.4 Das 3-Jahres Follow-Up

4.4.1 Charakterisierung der Patientenkohorte

Von den 933 genotypisierten Patienten konnten 886 Patienten im 3-Jahres Follow-Up innerhalb von 153,4±48,7 Wochen befragt werden (Drop-out von 5%). Von 886 Patienten erlitten 143 ein kardiovaskuläres Ereignis im Sinne des kombinierten Endpunkts (= 16,1%). In Abbildung 19 sind die aufgetretenen Ereignisse zusammengefasst, welche innerhalb des 3-Jahres Follow-Up bei den befragten 886 Patienten eingetreten sind.

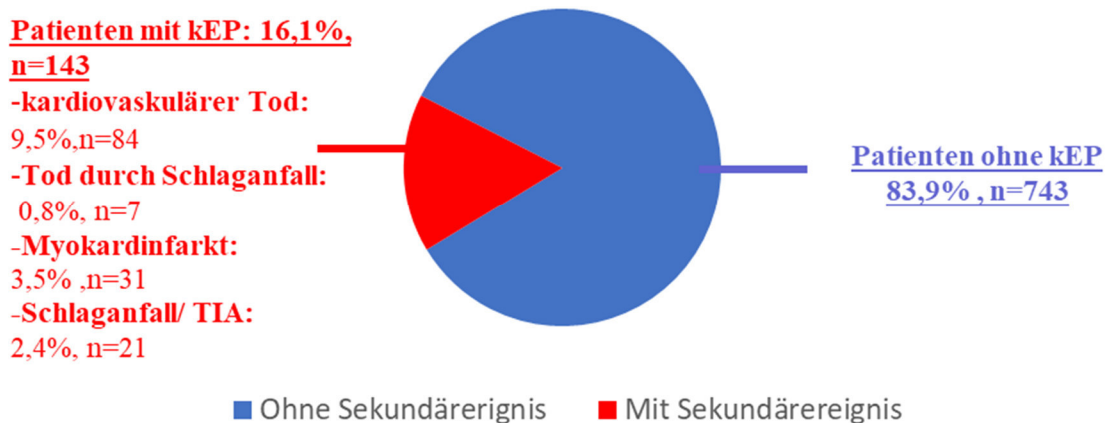


Abb. 19: Inzidenz des kombinierten Endpunkts nach drei Jahren Follow-Up. Als Endpunkt der Studie wurden ein Myokardinfarkt, kardialer Tod sowie Schlaganfall/TIA (fatal, nicht fatal) definiert. (TIA: transitorische ischämische Attacke).

4.4.2 Bedeutung der beiden ANRIL Polymorphismen als prognostische Faktoren in Bezug auf den kardiovaskulären Endpunkt

Beide Polymorphismen wurden hinsichtlich einer Assoziation zur Inzidenz des kEP statistisch untersucht. Vor den Überlebensanalysen wurde zunächst die Verteilung der Genotypen und Allele beider Polymorphismen in den Gruppen mit kEP und ohne kEP miteinander verglichen. Dabei konnten keine signifikanten Assoziationen gezeigt werden (Tab. 15,16).

rs1333049

Tab. 15: Assoziation des Genotyps und der Allelverteilung des ANRIL rs1333049 zum kardiovaskulärem Outcome (kEP: kombinierter Endpunkt).

	Gesamt- gruppe	kEP erreicht	kEP nicht erreicht	p-Wert
Genotypen	(n=886)	(n=143)	(n=743)	
CC (%)	16,9	17,5	16,8	0,952*
CG (%)	56,2	56,6	56,1	
GG (%)	26,9	25,9	27,1	
Allele	(n=1772)	(n=286)	(n=1486)	
C (%)	45,0	45,8	44,9	0,825*
G (%)	55,0	54,2	55,1	

*Chi²-Test mit Yates-Korrektur

rs3217992

Tab. 16: Assoziation des Genotyps und der Allelverteilung des ANRIL rs3217992 zum kardiovaskulärem Outcome (kEP: kombinierter Endpunkt).

	Gesamt- gruppe	kEP erreicht	kEP nicht erreicht	p-Wert
Genotypen	(n=886)	(n=143)	(n=743)	
AA (%)	18,2	23,8	17,1	0,180*
AG (%)	43,3	39,9	44,0	
GG (%)	38,5	36,4	38,9	
AA %	18,2	23,8	17,1	
AG+GG (%)	81,8	76,2	82,9	0,075*
Allele	(n=1772)	(n=286)	(n=1486)	
A (%)	39,8	43,7	39,1	0,164*
G (%)	60,2	56,3	60,9	

*Chi²-Test mit Yates-Korrektur

4.4.3 Das 3-Jahres Follow-Up: Überlebenszeitanalyse zur Inzidenz des kombinierten Endpunktes in Abhängigkeit von der jeweiligen Genotypkonstellation

rs1333049

In dieser statistischen Auswertung des ANRIL rs1333049 wurde den individuellen Genotypkonstellationen und den Allelen sowohl die Anzahl des kumulativen Überlebens (Tod durch Myokardinfarkt, Tod durch Schlaganfall, Myokardinfarkt und Schlaganfall/TIA), als auch die Zeit bis zum Eintreten des kombinierten Endpunkts gegenübergestellt. In der Kaplan-Meier-Statistik war weder eine Genotypkonstellation, noch eines der Allele innerhalb des 3-Jahres Follow-Up signifikant zum kombinierten Endpunkt assoziiert. Auch die statistischen Untersuchungen der Genotypen CC, CG und GG blieben im Hinblick auf die einzelnen Endpunkte (Tod durch Myokardinfarkt, Tod durch Schlaganfall, Myokardinfarkt, Schlaganfall/TIA) beim ANRIL rs1333049 ohne signifikante Ergebnisse.

rs3217992

Überlebenszeitanalyse zur Inzidenz des kombinierten Endpunktes in Abhängigkeit von der jeweiligen Genotypkonstellation

Auch hier wurde den individuellen Genotypkonstellationen und den Allelen die Anzahl des kumulativen Überlebens (Tod durch Myokardinfarkt, Tod durch Schlaganfall, Myokardinfarkt und Schlaganfall/TIA), sowie die Zeit bis zum Eintreten des kEP gegenübergestellt. Der AA-Genotyp des ANRIL rs3217992 wurde als prognostischer Faktor ermittelt (Abb. 20).

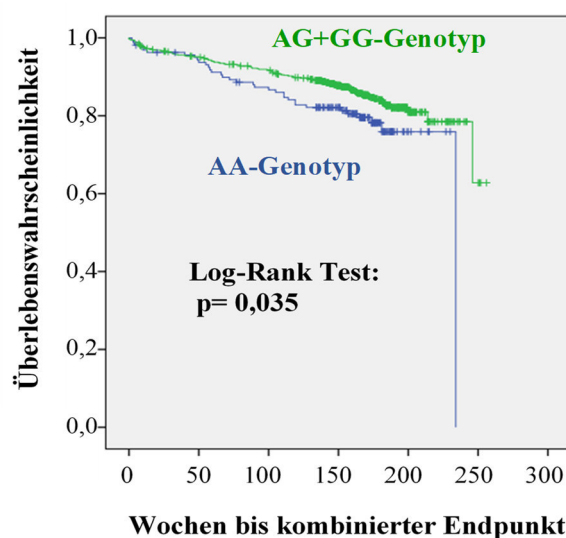


Abb. 20: Kaplan-Meier-Kurve zur Auswirkung des AA-Genotyps des ANRIL rs3217992 auf die Inzidenz des kombinierten Endpunkts (kEP).

In der Cox Regression (Einschluss), unter Berücksichtigung weiterer Kovariablen wie Alter, Geschlecht, Rauchen, Diabetes und BMI erwies sich der Genotyp AA als unabhängiger Prognosefaktor für die Inzidenz des kEP (Hazard Ratio=1,63, 95% KI: 1,1-2,4; p=0,014, Tab. 17).

Tab. 17: Cox-Regression zur Untersuchung der Assoziation des AA-Genotyps zur Inzidenz des kombinierten Endpunktes adjustiert für die Kofaktoren Alter, Geschlecht, Rauchen, Diabetes und Body mass index (BMI: Body mass index, m: männlich).

	Regressionskoeffizient	Standardabweichung	p-Wert	Hazard Ratio	95,0% Konfidenzintervall für Exp(B)	
					Unterer	Oberer
Alter	,035	,010	,000	1,035	1,015	1,055
Geschlecht (m)	,511	,211	,016	1,667	1,102	2,523
BMI	-,035	,021	,096	,966	,927	1,006
Raucher	,109	,352	,756	1,116	,559	2,226
Diabetes	-,727	,176	,000	,483	,343	,682
AA-Genotyp	,489	,199	,014	1,631	1,104	2,408

4.4.4 Überlebenszeitanalyse des ANRIL rs3217992 bei separater Betrachtung der einzelnen Endpunkte, abhängig von der jeweiligen Genotypkonstellation

In dieser Untersuchung wurden alle Endpunkte separat betrachtet. Das A-Allel des rs3217992 war signifikant (p=0,026) mit einem höheren Risiko für das Auftreten eines Myokardinfarktes assoziiert (Abb. 21). Zu allen anderen Endpunkten wurde keine Abhängigkeit nachgewiesen.

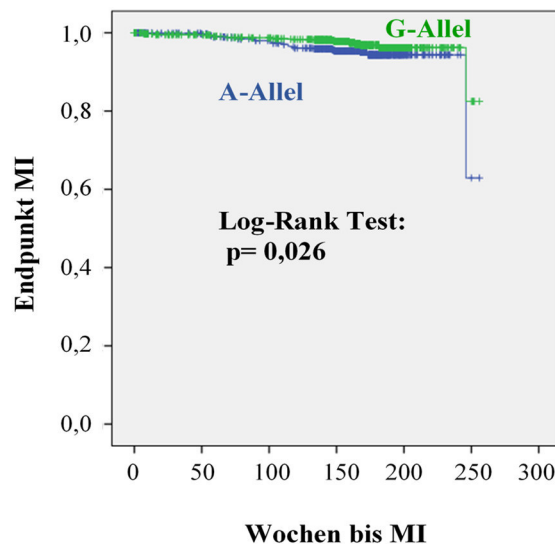


Abb. 21: Kaplan-Meier-Kurve zur Auswirkung des A-Allels des ANRIL rs3217992 auf die Inzidenz eines Myokardinfarktes in Abhängigkeit von der Zeit (MI: Myokardinfarkt).

In der Cox Regression (Einschluss), unter Berücksichtigung weiterer Kovariablen wie Alter, Geschlecht, Rauchen, Diabetes und BMI hat sich das A-Allel als unabhängiger Prognosefaktor

für das Auftreten eines Myokardinfarktes innerhalb des 3-Jahres Follow-Up erwiesen (Hazard Ratio=1,74, 95% KI: 1,05-2,87, p=0,030) (Tab. 18). Alle Genotypkonstellationen und Allele des ANRIL rs3217992 waren in Hinblick auf die anderen Endpunkte (kardiovaskulärer Tod, Tod durch Schlaganfall, Schlaganfall/TIA) nicht signifikant.

Tab. 18: Cox-Regression zur Untersuchung der Assoziation des A-Allels zur Inzidenz des MI adjustiert für die Kofaktoren Alter, Diabetes mellitus, BMI, Rauchen und Geschlecht (BMI: Body mass index, m: männlich).

	Regressionskoeffizient	Standardabweichung	p-Wert	Hazard Ratio	95,0% Konfidenzintervall für Exp(B)	
Alter	-,021	,013	,116	,979	0,954	1,005
Geschlecht (m)	1,651	,2519	,001	5,210	1,883	14,414
BMI	-,067	,034	,050	,936	,875	1,000
Raucher	,1283	,416	,496	1,327	,588	2,995
Diabetes	-,663	,274	,015	,516	,302	,881
A-Allel	,4554	,256	,030	1,740	1,054	2,872

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.5.1 Übersichtstabelle

In Tabelle 19 sind die Ergebnisse gemäß ihrer Assoziation dargestellt.

Tab. 19: Systematische Zusammenfassung der Ergebnisse nach Assoziation ja/nein.

	Assoziation des rs1333049 ja/nein	Assoziation des rs3217992 ja/nein
Schwere PA	Nein	Ja
Sondierblutung	Nein	Ja
Bakterien	Ja (<i>E.c.</i> , <i>P.m.</i>)	Ja (<i>E.c.</i>)
Serologische Parameter	Ja (CRP, HDL)	Nein
Vorerkrankungen	Nein	Ja (Schlaganfall)
kEP	Nein	Ja
Einzelner EP	Nein	Ja (Myokardinfarkt)

4.5.2 Basisuntersuchungen

Hypothese (H) 1: Bei den Untersuchungen der beiden SNPs war nur der rs3217992, nicht aber der rs1333049 signifikant zur Schwere der PA assoziiert. Patienten mit schwerer PA waren im Vergleich zu Patienten mit keiner/leichter PA signifikant häufiger Träger der Genotypen AA und GG (rs3217992) (p=0,022). Im multivariaten Vergleich unter Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, Rauchen, BMI, Plaque-Index wurde diese Assoziation bestätigt (OR=1,37, 95%KI: 1,02-1,82; p=0,034). Die Hypothese 1 wurde für rs1333049 nicht bestätigt.

H2: Hinsichtlich parodontologischer Parameter konnte für den SNP rs1333049 keine signifikante Assoziation gezeigt und damit Hypothese 2 nicht bestätigt werden. Träger des G-Allels des rs3217992 wiesen im Vergleich zu A-Allel Trägern erhöhte BOP-Werte auf (6,0 vs. 5,0; $p=0,009$). Dies wurde auch in der multivariaten Analyse bestätigt.

H3: Die Assoziation beider SNPs zum Nachweis subgingivaler parodontaler Markerkeime wurde für den rs1333049 zu *E.c.* (CC +GG- Genotypträger) und *P.m.* (CC-Genotypträger) und für den rs3217992 zu *E.c.* (AG-Genotypträger) sowohl univariat, als auch multivariat bestätigt. Die Ergebnisse für *P.m.* entsprechen der Hypothese drei, dass parodontopathogene, subgingivale Keime bei CC-Genotypen (rs1333049) häufiger nachgewiesen werden. Alle weiteren signifikanten Assoziationen bestätigen Hypothese 3 nicht.

H4: Zu den Serumspiegeln für CRP und HDL war der rs1333049 signifikant assoziiert, was auch multivariat bestätigt werden konnte. So wiesen CC-Genotypträger häufiger einen erhöhten CRP-Spiegel und einen verminderten HDL-Spiegel auf. Dies entspricht der Hypothese, dass der CC-Genotyp des rs1333049 mit einer erhöhten Entzündungslast assoziiert ist.

H5: Hypothese 5 wurde nicht bestätigt. Stattdessen waren AA+GG-Genotypen des rs3217992 vermehrt zu Schlaganfall assoziiert, was multivariat bestätigt werden konnte.

4.5.3 Das 3-Jahres Follow-Up

Im 3-Jahres Follow-Up wurden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt: „kEP erreicht“ und „kEP nicht erreicht“. Von allen genotypisierten Patienten erlitten 143 innerhalb der drei Jahre einen kEP. Um die beiden SNPs als prognostische Faktoren in Bezug auf den kEP zu identifizieren, wurde zuerst die Verteilung der Genotypen und Allele beider SNPs in den Patientenkollektiven „kEP erreicht“ und „kEP nicht erreicht“ untersucht. Hierbei konnte keine Assoziation festgestellt werden.

H6: In der statistischen Auswertung bezüglich der Überlebenszeitanalysen wurde den individuellen Genotypkonstellationen und den Allelen die Anzahl des kumulativen Überlebens, sowie die Zeit bis zum Eintreten des kEP gegenübergestellt. Gemäß unserer Hypothese konnte der AA-Genotyp des rs3217992 als Risikofaktor für das Eintreten eines kEP bestätigt werden (Log-Rank Test, $p=0,035$). In der multivariaten Cox-Regression (Kofaktoren: Alter, Geschlecht, BMI, Rauchstatus, Diabetes) wurde der AA-Genotyp als koronarer Prognosefaktor bestätigt (HR=1.63, 95%KI: 1.1-2.4; $p=0.014$).

H7: Hinsichtlich des Auftretens eines Myokardinfarktes innerhalb der 3 Jahre wurde das A-Allel des rs3217992 als ein prognostischer Faktor verifiziert (Log-Rank Test $p=0,026$). Dies bestätigte sich auch nach multivariater Cox-Regression (HR=1.74, 95%KI: 1.05-2.87; $p=0.03$) und entspricht der Hypothese. Für den rs1333049 Polymorphismus konnte keine Assoziation zum Auftreten eines kombinierten kardiovaskulären Endpunktes (Kaplan-Meier-Statistik, Log-Rank-Test, Cox-Regression) nachgewiesen werden.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methode

5.1.1 Studiendesign

In der vorliegenden Studie (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01045070) wurden konsekutiv-prospektiv 1002 Patienten, die stationär in der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg betreut wurden, dental-parodontal und kardiologisch untersucht. Die kardiologische und parodontologische Diagnostik beruhte auf einer klinischen Untersuchung und ist daher im Vergleich zu Studien, die nur anamnestische Daten verwendeten, viel sicherer. Dies stellten auch Eriksen und Sneftrup in ihrer Studie fest, indem sie den anamnestisch erhobenen Gewichtsverlust bei Krankenhauspatienten mit dem realen Verlust verglichen (Eriksen & Sneftrup, 2013). Voraussetzung für den Einschluss in unsere Studie war, dass mindestens eine 50%-ige Stenose einer Herzkranzarterie vorlag. Dies wurde sichergestellt durch eine angiografische Untersuchung im Rahmen einer perkutanen koronaren Intervention (PCI) oder einer Koronararterien-Bypass-Operation. Alle Patienten waren Kaukasier und untereinander nicht verwandt. Des Weiteren hatten alle Probanden das 18. Lebensjahr vollendet und konnten daher selbst der Studienteilnahme zustimmen. Unsere Studie ist eine prospektive Kohortenstudie. Der Vorteil einer prospektiven Studie ist, dass das Studiendesign optimal in Bezug zur Fragestellung gestaltet werden kann. Als Nachteile der Studie sind ein hoher Zeit- und Kostenaufwand zu nennen. Die Basisdaten wurden von zwei ausgebildeten Zahnärzten (Andrea Lutze und Tim Seifert) aufgenommen. Dies ist von Vorteil, da beide Untersucher klinische Erfahrung aufwiesen. Den Patienten wurde Blut abgenommen und die serologischen Parameter im Zentrallabor der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Saale bestimmt. Daher entfallen Methoden assoziierte Fehler. Wären mehrere Labore beteiligt, könnten Fehler aufgrund unterschiedlicher Bestimmungstechniken oder Kalibrierung der Labore auftreten. Die genetischen Untersuchungen zu beiden ANRIL SNPs rs1333049 und rs3217992 erfolgten im Forschungslabor der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie der Martin-Luther-Universität Halle-Saale unter Aufsicht einer erfahrenen Biochemikerin. Um mögliche Kontaminationen mit Fremd-DNA auszuschließen und damit die Güte der PCR zu überprüfen, wurde in jedem Versuchsansatz eine Negativkontrolle ohne DNA mitgeführt. Als Positivkontrolle der PCR wurde in jedem Experiment bekannte DNA entsprechend der drei möglichen Genotypen der ANRIL SNPs koamplifiziert. Beim 3-Jahres Follow-Up wurden die Patienten nicht noch einmal ärztlich oder zahnärztlich untersucht, sondern ihr Gesundheitszustand durch ein schriftliches/ telefonisches Interview oder über Befragung der Hausärzte, bzw. Gesundheitsämter ermittelt (Parallelstudie Benten). Somit konnten unvollständige oder gar falsche Angaben durch die Patienten nicht sicher ausgeschlossen werden. Als Endpunkte wurden Folgende gewählt: kardiovaskulärer Tod, Tod durch Schlaganfall, Myokardinfarkt, Schlaganfall/TIA. Diese wurden zu einem kombinierten Endpunkt (kEP)

zusammengefasst. Die Auswahl der Endpunktereignisse wurde an andere klinische Längsschnittuntersuchungen angelehnt (Gullestad et al., 2012). Damit ist unsere Studie mit anderen kardialen Risikostudien vergleichbar. Unter Berücksichtigung der am Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik (Prof. Dr. A. Wienke) durchgeführten Fallzahlplanung (Annahmen: Primärer Endpunkt bei 15% der Patienten, Drop-Out Rate von 20%, $1-\beta=0,80$, $\alpha=0,05$) ist diese Studiengröße ($n=1002$) ausreichend groß, um eine Einflussvariable mit einem hypothetischen Hazard Ratio von 1,24 für das Auftreten eines kombinierten Endpunktes zu erkennen (Reichert et al., 2016). Der Fallzahlplanung liegt das Hauptziel der Studie, ob eine PA zum kEP assoziiert ist, zugrunde. Für die Untersuchung des ANRIL-Polymorphismus in Assoziation zum kEP wurde keine separate Fallzahlplanung durchgeführt.

5.1.2 Kardiologische Untersuchungen

Die Koronarangiographie ist eine hochsensitive Untersuchungsmethode und stellt den Goldstandard in der Diagnostik der KHK dar. Im Vergleich zu Studien, in denen die Diagnose KHK z.B. nur anamnestisch erfasst wurde (Arbes et al., 1999), hatten wir eine hohe Diagnosesicherheit.

5.1.3 Dentale, parodontologische Untersuchungen

Die Patienten wurden stationär am Krankenbett untersucht. So konnten auch immobile Patienten teilnehmen und die Probanden mussten nicht zu einem separaten Termin kommen. Nachteil dieser „Bedside-Untersuchung“ war das Fehlen einer zahnärztlichen Behandlungseinheit mit optimalen Lichtverhältnissen und optimaler Patientenlagerung. Da es eines der Hauptziele der Studie war eine Assoziation der beiden ANRIL SNPs zur Schwere der Parodontitis zu untersuchen, wurden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt (keine/leichte Parodontitis vs. schwere Parodontitis) (Tonetti und Claffey, 2005). Nur 20 Studienteilnehmer waren parodontal gesund, sodass diese wegen der geringen Kohortengröße in eine Gruppe mit keiner/leichter Parodontitis aufgenommen wurden. Die Parodontitisdefinition nach Tonetti und Claffey eignet sich gut für wissenschaftliche Studien, da einerseits ein Parodontitisfall sehr sensitiv erfasst, aber auch eine schwere Parodontitis von leichteren Formen abgegrenzt werden kann (Matuliene et al., 2008; Eke et al., 2012). Weil der Hauptrisikofaktor für das Entwickeln einer Parodontitis die dentale Plaque ist, erfolgte die Bestimmung des Plaqueindex nach Silness und Loe. Er ist vor allem deshalb für wissenschaftliche Studien geeignet, weil er die Plaqueakkumulation in 4 verschiedene Codes unterteilt (Silness & Loe, 1964). Dadurch sind nicht nur „ja/nein“ Entscheidungen wie beim API möglich, sondern es werden auch qualitative Unterschiede erfasst. Als Nachteil ist zu nennen, dass nur die supragingivale (wie auch bei vielen anderen Indizes), aber nicht die subgingivale Plaque erfasst werden kann.

Patienten, welche Medikamente einnahmen die zu Gingivahyperplasien führen könnten (Hydantoin, Cyclosporin u.a.) und Patienten, welche innerhalb der letzten 6 Monate eine parodontale Therapie (subgingivales Scaling, Wurzelglättung, Lappenoperation) bzw. innerhalb der letzten 3 Monate eine Antibiotikatherapie erhalten hatten, wurden aus der Studie ausgeschlossen. Eine Antibiotikatherapie bzw. parodontale Behandlung könnten die mikrobiologischen und klinischen Befunde zum Zeitpunkt der Basisuntersuchung relevant beeinflussen. Im Rahmen einer Schwangerschaft kommt es häufig temporär zu Gingivahyperplasien (Raber-Durlacher et al., 1994). Carrillo-de Albornoz und Kollegen zeigten bei Schwangeren eine Assoziation zwischen der Speichel-Progesteron-Konzentration und dem vermehrten Vorkommen von *P. gingivalis* in subgingivalen Taschen (Carrillo-de-Albornoz et al, 2010). Aufgrund dieser Zusammenhänge, führte auch eine Schwangerschaft zum Studienausschluss.

5.1.4 Bestimmung parodontaler Markerkeime

In Anlehnung an die von Socransky et al. (1998) entworfenen Bakterienkomplexen wurde der parodontale Sulcus auf 13 Markerkeime des roten, orangenen und grünen Komplexes getestet (Parallelstudie Promotion Tim Seifert). Eick et al. (2011) zeigten, dass die Analyseergebnisse sowohl nach Verwendung der DNA-Strip-Technologie, als auch nach der Anaerobieranzucht mit der Sondiertiefe assoziiert waren. Parodontitis-Keime lassen sich mit molekularbiologischen Tests besser erkennen, als z.B. mit Färbemethoden. Das Anlegen bakterieller Kulturen beispielsweise gehört zu den klassischen Methoden. Aufgrund des langsamen Wachstums der Anaerobier kann jedoch ein definitives Resultat erst nach drei Wochen erwartet werden (Rateitschak et al., 2012b). Der Nachteil molekularbiologischer Tests ist, dass nur die bakterielle DNA nachgewiesen wird und keine Aussage über die Vitalität der Bakterien getroffen werden kann. Außerdem kann kein Antibiotogramm erstellt werden und es können auch nur die Bakterien nachgewiesen werden, für welche die entsprechenden speziesspezifischen Primer vorhanden sind.

5.1.5 Genetische Untersuchungen

Die Untersuchung von Varianten in Kandidatengenen und ihre funktionellen Auswirkungen sind Bestandteil vieler Studien (Aarabi et al., 2017). Prospektiv erhofft man sich dadurch die Umsetzung einer besseren Prävention oder Diagnostik von parodontalen Erkrankungen sowie einer individuellen Therapie. Varianten von SNPs können u.a. auf Proteinebene zu Veränderungen führen oder die Transkriptionsrate von Genen modulieren (Yan et al., 2002). Es können möglicherweise komplexe Stoffwechselwege beeinträchtigt werden und die Entwicklung einer Erkrankung gefördert werden. Das ANRIL-Gen kodiert nicht für ein Protein. Vielmehr wird dem Transkript eine regulative Wirkung auf die Expression von Genen zugeschrieben (Bochenek et al., 2013). Es gingen ausschließlich Kaukasier in die Untersuchung ein, da die Allel- und

Genotypfrequenzen der ANRIL- SNPs ethnischen Unterschieden unterliegen könnten (Hu et al., 2009; Schaefer et al., 2011; Ahmed et al., 2013; Ivanova et al., 2017). Deshalb lassen sich die Ergebnisse unserer Studie nur mit Vorsicht auf andere ethnische Gruppen übertragen (Loos et al., 2005). Anhand des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes (Hardy-Weinberg-Equilibrium, HWE) wurden mögliche Abweichungen in den Genotypfrequenzen der untersuchten ANRIL SNPs analysiert. Dieses Gleichgewicht steht für ein Populationsgleichgewicht, in welchem Genotypfrequenzen und Allelhäufigkeiten unter äußeren, konstanten Einflüssen über Generationen hinweg gleichmäßig vererbt werden. In dieser Studie entsprachen beide ANRIL SNPs dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Würden die SNPs nicht im HWG liegen, so könnte dies darin begründet sein, dass es einen Selektionsvor- bzw. nachteil für spezielle Genotypträger gibt. Darüber hinaus könnte es bedeuten, dass die Genotypveränderung noch nicht so lange her ist (Founder-Effekt) und es bspw. in einem isolierten Gebiet zufällig zu einer Mutation gekommen ist. Es würde viele Generationen dauern bis dieser genetische Austausch nach dem HWG verteilt ist.

5.2 Ergebnisdiskussion der Basisuntersuchungen

5.2.1 Basisuntersuchungen bezüglich der Charakterisierung der Patientenkohorte in Assoziation zur parodontalen Diagnose

Sowohl die PA als auch die KHK sind inflammatorische Erkrankungen mit einer hohen Prävalenz und Inzidenz in den westlichen Industrienationen (Micheelis et al., 2008; Dahlöf, 2010). Studien zeigen, dass Entzündungen des Parodonts mit dem Auftreten von Atherosklerose und nachfolgenden Krankheiten wie KHK und Schlaganfall assoziiert sind (Janket et al., 2003; Bahekar et al., 2007). Als Hauptursache für das Erkranken an einer PA wird die pathogene Plaque im subgingivalen Kompartiment betrachtet. Des Weiteren wird in primäre und sekundäre Risikofaktoren unterschieden, die modulierend auf beide Erkrankungen wirken können. Zu den sekundären beeinflussbaren Risikofaktoren zählen u.a. Rauchen, Stress, fehlender Recall, Diabetes mellitus, HIV/AIDS und zu den nicht beeinflussbaren Risikofaktoren zählen Alter, Geschlecht, ethnische Zugehörigkeit, Genetik (Rateitschak et al., 2012a).

Im Folgenden sollen für PA und KHK bedeutende Risikofaktoren anhand unserer Daten im Einzelnen diskutiert werden.

-Alter:

In unserer Studie wurde keine signifikante Assoziation des Alters der Studienteilnehmer zur Schwere der Parodontitis nachgewiesen. Von unseren Probanden (Altersdurchschnitt: 67 Jahre) litten 47,6% an einer schweren Parodontitis, wohingegen gemäß der 5. deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS V) nur 20% der 65-74-Jährigen an einer schweren Parodontitis

erkrankt waren (Jordan & Micheelis, 2016). In der vierten DMS betrug dieser Anteil noch 39,8% (Micheelis, 2011); allgemein ist demnach eine Abnahme der PA zu verzeichnen. Im Vergleich zur DMS V sind unsere Probanden häufiger an schwerer PA erkrankt, woraus man schließen könnte, dass es eine Assoziation zwischen Parodontitis und KHK geben könnte. Limitierend sind jedoch die unterschiedlichen Methoden der beiden Studien (Messung des Attachmentverlust, Definition schwere PA, Definition der Altersgruppen). Es kann anhand unserer Daten deshalb nicht belegt werden, dass KHK-Patienten allgemein eine höhere Parodontitisprävalenz im Vergleich zur Normalbevölkerung aufweisen.

-Geschlecht:

In unserer Studie litten signifikant mehr Männer als Frauen unter einer schweren Parodontitis (78,6 % vs. 21,4 %, $p=0,003$). Erklärend dafür könnte der signifikant höhere PI und der Anteil aktiver Raucher bei Männern im Vergleich zu Frauen sein (PI Mittelwert: 1,135 vs. 0,854, $p<0,001$; aktive Raucher: 13,5% vs. 9,0%; $p=0,065$). Unsere Ergebnisse der häufigeren Prävalenz der PA bei Männern stehen in Einklang zu anderen Studien (Albandar et al., 1999; Eke et al., 2012). Hinsichtlich der höheren Prävalenz von schwerer PA bei Männern könnte auch die von Geschlechtshormonen abhängige Expression von Genen der Immunantwort sein (Shiau & Reynolds, 2010).

-Raucherstatus:

Rauchen ist ein Hauptrisikofaktor für das Erkranken an einer PA, weil es unter anderem mit einer verminderten Immunantwort, sowie einer eingeschränkten gingivalen Mikrozirkulation assoziiert ist. Die Entzündungsreaktion auf die mikrobielle Plaque kann überschießend sein und so eine Progression der PA gefördert werden (Genco, 1996). Dies wird durch die Ergebnisse unserer Studie gestützt, denn Patienten mit schwerer PA waren häufiger aktive Raucher als Patienten der Gruppe „keine/leichte Parodontitis“ (16,2% vs. 8,8%, $p=0,001$).

-Bekannte Vorerkrankungen:

Weiterhin wurden bereits bekannte Vorerkrankungen (Schlaganfall/TIA, Diabetes mellitus, Myokardinfarkt, Periphere arterielle Verschlusskrankheit, Bluthochdruck, Dyslipoproteinämie rheumatoide Arthritis) in Assoziation zur parodontalen Diagnose untersucht. Es war zu erkennen, dass Patienten mit schwerer Parodontitis signifikant häufiger bereits an einem Myokardinfarkt erkrankt waren, als Patienten mit keiner/leichter Parodontitis (41,9% vs. 35,2%, $p=0,041$). Dieser Zusammenhang könnte durch eine erhöhte Endotoxinausschwemmung erklärt werden, die mit der Schwere der PA assoziiert ist (Geerts et al., 2002). Damit steht dieses Ergebnis in Einklang mit vielen weiteren Studien (Humphrey et al., 2008; Xu et al., 2017). Auffällig war, dass zu allen anderen Vorerkrankungen keine signifikante Assoziation nachgewiesen werden konnte.

Hervorzuheben ist dabei die fehlende Assoziation zu Diabetes mellitus. Studien vermuten eine bidirektionale Beziehung zwischen PA und Diabetes mellitus (Bascones-Martínez et al., 2015). Die in unserer Studie fehlende Signifikanz ist möglicherweise darin begründet, dass zusätzlich der Schweregrad der Diabetes-Erkrankung einen Einfluss auf die PA hat. In der vorliegenden Studie hatten insulinpflichtige Probanden häufiger eine schwere PA im Vergleich zu nicht insulinpflichtigen Diabetikern (20,5% vs. 14,5%, $p=0,116$). Da bei insulinpflichtigen Diabetikern häufig nur eine schlechte glykämische Einstellung möglich ist, werden als Folge einer anhaltenden Hyperglykämie vermehrt AGEs gebildet (Bashan et al., 2015). Nachdem diese an spezifische Oberflächenrezeptoren von Zellen gebunden haben (RAGE), verursachen sie eine proinflammatorische Kaskade mit einer stärkeren Vernetzung des Kollagens und einer erhöhten Apoptoserate von Osteoblasten und Fibroblasten. Als Folge kann es zu einer beschleunigten Progression der PA kommen (Graves et al., 2006; Deschner et al., 2011). Ein integraler Bestandteil des Diabetesmanagements sollte daher die Behandlung einer bestehenden Parodontitis sein.

-Biochemisch-serologische Untersuchungen:

Parodontitis gilt als Infektionserkrankung und geht mit erhöhten Spiegeln verschiedener Entzündungsparameter einher (Paraskevas et al., 2008). Dies zeigt sich auch in unserer Betrachtung der Serumspiegel des Akute-Phase-Proteins CRP und des proinflammatorischen Zytokins IL-6. Beide zeigten signifikant erhöhte Werte in der Gruppe mit schwerer PA (CRP mg/l: 10,15 [5,0/37,68] vs. 7,45 [3,13/28,08], $p=0,011$ und IL-6 mg/l: 8,1 [4,2/17,75] vs. 6,8 [3,4/13,8], $p=0,004$). Verschiedene Zellen (Endothelzellen, Monozyten, Lymphozyten, Fibroblasten) produzieren IL-6, welches Leukozyten rekrutiert und die Blutgerinnungskaskade initiiert. Zusätzlich gilt das IL-6 als Regulator der CRP-Synthese in der Leber. Unsere Ergebnisse der erhöhten CRP- und IL-6-Werte bei schwerer Parodontitis stehen im Einklang mit anderen Studien (Noack et al., 2001). Paraskevas und Kollegen haben herausgefunden, dass die CRP-Plasmaspiegel bei PA-Patienten erhöht sind (Paraskevas et al., 2008). Loos et al. (2000) stellten fest, dass Parodontitis zu höheren systemischen Spiegeln von CRP und IL-6 führt. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass mit einer kardiovaskulären Entzündung erhöhte CRP-Werte einhergehen und das C-reaktive Protein wurde als starker, unabhängiger Risikofaktor für KHK identifiziert (Ridker et al. 1997, Ridker et al., 1998, Strang & Schunkert, 2014). Ebenso wird das IL-6 als Risikomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen diskutiert (Ridker et al., 2000a; Haba et al., 2011).

-Subgingivale parodontopathogene Keime:

Parodontopathogene Bakterien in der subgingivalen Plaque wurden von Socransky und Kollegen bereits 1998 in verschiedene Komplexe eingeteilt. Dabei besitzt der rote Komplex (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*) die höchste Pathogenität. In der vorliegenden Studie wurden Bakterien des roten Komplexes erwartungsgemäß häufiger unter Patienten mit schwerer PA nachgewiesen. Ebenso wurden Bakterien des orangenen Komplexes (*P. intermedia*, *P. micros*, *C. rectus*, *E. nodatum*) häufiger in der Gruppe mit schwerer PA nachgewiesen. Socransky et al. betitelten die Bakterien des orangenen Komplexes als sog. Brückenbakterien. Sie sind ausschlaggebend für die Etablierung des roten Komplexes. Das vermehrte Vorkommen von Parodontopathogenen in der Gruppe mit schwerer PA bestätigt die Hypothese, dass bestimmte parodontale Bakterien mit der Schwere der PA assoziiert sind. Dies steht im Einklang mit vielen weiteren Studien (Socransky et al., 1998; Chen et al., 2005; Rescala et al., 2010). Auffallend war weiterhin, dass auch die Gesamtsumme verschiedener nachgewiesener bakterieller Spezies in der Gruppe mit schwerer PA im Vergleich zur Gruppe mit keiner/leichter PA signifikant erhöht war (7,0 [5,0/9,0] vs. 6,0 [4,0/8,0], $p < 0,001$). Bakterien des grünen Komplexes (*E. corrodens*, *C. sputigena*, *C. gingivalis*, *C. ochracea*, *A. actinomycetemcomitans*) zeigten in der vorliegenden Studie keine Signifikanz zur Schwere der PA. Bei allen untersuchten Parodontitispatienten unserer Kohorte stellten wir die Verdachtsdiagnose ChP, wobei eine mögliche Fehldiagnose bei nur einmaliger Untersuchung nicht ausgeschlossen werden kann.

-Klinische dentale, parodontologische Untersuchungen:

Silness und Loe postulierten, dass die individuelle Mundhygiene einen enormen Einfluss auf die Ausbildung und Progression einer PA habe (Silness & Loe, 1964). Die Plaque als primärer Faktor für das Entwickeln einer PA steht im Einklang mit unseren Ergebnissen, weil Patienten in der Gruppe mit schwerer PA gegenüber den Patienten mit keiner/leichter PA einen reduzierten Mundhygienestatus aufwiesen (PI Median 25/75 % Perzentile: 1,2 [0,8/2,0] vs. 0,66 [0,4/ 0,9], $p < 0,001$).

Die PA gilt als inflammatorische Erkrankung, deren Entzündungsgrad mithilfe des BOP geschätzt werden kann (Ainamo & Bay, 1975). Studien bestätigten bereits die Assoziation zwischen dem Sondierblutungsindex zur Parodontitis (Camelo-Castillo et al., 2015). So war auch in der vorliegenden Studie in der Gruppe mit schwerer PA der Entzündungsgrad erhöht (BOP Median 25/75 % Perzentile: 8,1 [3,6/15,48] vs. 3,7 [0/7,90], $p < 0,001$). Gilbert und Kollegen zeigten, dass zunehmender Attachmentverlust mit einem erhöhten Risiko für Zahnverlust verbunden ist (Gilbert et al., 2002). Dies konnten wir in unserer Studie bestätigen, indem der Zahnverlust mit der Schwere der PA assoziiert war (Anzahl fehlende Zähne Median 25/75 % Perzentile: 15,0 [8,0/21,0] vs. 7,0 [3,0/13,0], $p < 0,001$). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass neben der Parodontitis

auch andere Gründe für den Zahnverlust in Betracht kommen könnten, wie z.B. Karies, Traumata oder Extraktionen aus therapiestrategischen Gründen.

5.2.2 Ergebnisdiskussion zu den ANRIL-Polymorphismen rs1333049 und rs3217992

Bisherige Studien liefern eindeutige Hinweise auf gemeinsame genetische Risikofaktoren für PA und KHK (Schaefer et al., 2009; Ahmed et al., 2013; Schaefer et al., 2015). Besondere Aufmerksamkeit gilt dabei den zu beiden Krankheiten assoziierten Polymorphismen im ANRIL-Gen (Aarabi et al., 2017). Auf Grundlage bisheriger Daten wurden in der vorliegenden Studie die Auswirkungen der beiden ANRIL SNPs rs1333049 und rs3217992 auf die Schwere der PA untersucht, sowie die Inzidenz neuer kardiovaskulärer Ereignisse innerhalb eines 3-Jahres Follow-Ups.

Hauptziel Basisuntersuchung: Diskussion der Genotyp- und Allelverteilung beider ANRIL Polymorphismen in Assoziation zum Schweregrad der Parodontitis

In Assoziation zur Schwere der PA wurden hinsichtlich der Genotypverteilung verschiedene genetische Modelle für den rs1333049 und rs3217992 getestet. Weiterhin wurde eine Assoziation zu den Allelen beider SNPs untersucht. Für den SNP rs1333049 konnten wir keine Assoziation zum Schweregrad der PA unter KHK-Patienten nachweisen. Unser Ergebnis zum rs1333049 steht im Einklang mit der Arbeit von Schaefer und Kollegen (2009), obwohl Unterschiede im Design im Vergleich zu unserer Studie vorlagen. Unsere Patienten waren alle an einer KHK erkrankt. Dies war bei Schaefer et al. nicht der Fall. Darüber hinaus waren die Probanden und deren Eltern in der Studie von Schaefer et al. niederländischer bzw. deutscher Herkunft. Unsere Patienten waren ausschließlich Deutsche kaukasischer Herkunft. Bis heute wurden in keiner anderen Studie signifikante Assoziationen zwischen dem rs1333049 Polymorphismus und Parodontalerkrankungen nachgewiesen. In Anlehnung an die Studie von Schaefer et al. (2011), in welcher der rs3217992 in der multivariaten Analyse am stärksten zur AgP assoziiert war, untersuchten wir den rs3217992 in Assoziation zur Schwere der PA bei KHK-Patienten. Schaefer et al. stellten eine signifikant verringerte Häufigkeit von GG-Genotyp-Trägern in Kombination mit einem erhöhten Auftreten von AG- und AA-Genotyp-Trägern unter deutschen AgP-Patienten fest (OR=1,48, 95%KI: 1,2-1,9; p = 0,0004). In unserer Studie tendierten die Werte des GG-Genotyps/ G-Allels ebenfalls zu niedrigeren Werten bei Probanden mit schwerer PA im Vergleich zu keiner/leichter PA (34,9% vs. 41,1%, p=0,056). Der AG-Genotyp des rs3217992 erwies sich dagegen nach binärer logistischer Regression als ein unabhängiger Risikoindikator für eine schwere PA unter Patienten mit KHK (OR= 1,367, 95%KI: 1,054-1,772; p=0,022).

In Untersuchungen zur ChP unter deutschen Probanden zeigten Schaefer et al., dass genetische Varianten im ANRIL-Gen (u.a. rs3217992) in bivariaten Analysen mit der ChP assoziiert waren, welche jedoch im multivariaten Vergleich nicht mehr signifikant waren (Schaefer et al., 2011).

Bei holländischen Patienten konnte sowohl univariat, als auch multivariat eine Assoziation zur ChP festgestellt (u.a. rs3217992) werden. Es wurde wieder eine verringerte Frequenz des GG-Genotyps festgestellt. Der rs3217992 ist demnach nicht nur zur AgP (Schaefer et al.) assoziiert, sondern auch zur Schwere der PA unter KHK-Patienten. Ob der rs3217992 möglicherweise auch ein Risikofaktor für weitere entzündliche Erkrankungen sein könnte, muss in zukünftigen Studien untersucht werden. Zu möglichen Assoziationen zwischen rs3217992 und der ChP liegen zum jetzigen Zeitpunkt außer der Arbeit von Schaefer et al. (2011) keine vergleichbaren Daten vor. Bemerkenswert ist, dass die Genotypverteilung in der vorliegenden Studie kongruent mit der Verteilung bei holländischen ChP Patienten war.

Tab. 20: Genotypfrequenzen des rs3217992 bei AgP und ChP (Schaefer et al., 2011) im Vergleich zu den in unserer Studie ermittelten Werten (n=Anzahl der Probanden, holl. = holländisch, n.a.=nicht angegeben).

	GG	AG	AA	Patienten vs. Kontrollen p-Wert OR (95% KI)
Deutsche Kontrollen, Schaefer et al., 2011	n=281 42,5%	n=298 45,0%	n=83 12,5%	n.a.
Holländische Kontrollen, Schaefer et al., 2011	n=171 41,1%	n=182 43,6%	n=64 15,3%	n.a.
AgP deutsche Probanden, Schaefer et al., 2011	n=96 32,3%	n=145 48,8%	n=56 18,9%	p=0,00044 1,48 (1,2-1,9)
AgP holl. Probanden, Schaefer et al., 2011	n=66 41,5%	n=78 49,1%	n=15 9,4%	p=0,007 2,53 (1,3-5,1)
ChP holl. Probanden, Schaefer et al., 2011	n=60 39,2%	n=67 43,8%	n=26 17,0%	p=0,060 1,82 (1,0-3,4)
Vorliegende Studie, ChP unter Patienten mit KHK -univariat AG vs. AA + GG	n=356 38%	n=410 44%	n=167 18%	Schwere ChP vs. keine/milde ChP p= 0,022, univariat OR= 1,367 (1,054-1,772) p= 0,034, adjustiert OR= 1,366 (1,024-1,821)

Nebenziele Basisuntersuchung:

-Beide Polymorphismen in Assoziation zu dentalen und parodontologischen Parametern

Zur Identifikation eines genetischen Effekts auf parodontale Parameter wurden beide SNPs bezüglich PI, BOP, PD, CAL, CAL_{bakt}, der Anzahl fehlender Zähne, der Anzahl kariöser Zähne, der Anzahl gefüllter Zähne und zum DMFT-Index statistisch untersucht. Bezüglich des

rs1333049 konnten keine signifikanten Assoziationen nachgewiesen werden. Für den rs3217992 hat sich das G-Allel als ein Risikoindikator für eine erhöhte Sondierungsblutung erwiesen (univariat $p=0,009$; multivariat $p=0,016$). Zu allen anderen klinischen Parametern lagen keine Assoziationen vor. Derzeit finden sich keine vergleichbaren Studien dazu. Es sollte berücksichtigt werden, dass klinische Parameter wie der PI oder BOP (hier signifikant) als Indikator einer wirksamen Mundhygiene im Rahmen des stationären Aufenthalts nur einmal aufgenommen wurde und somit womöglich von den Mundhygienemaßnahmen zuhause differieren könnte. Der BOP ist ein Indikator für CAL. Wenn der BOP positiv ist, so besteht eine 30%-ige Wahrscheinlichkeit, dass CAL sich progressiv verhält. Wenn ein negativer BOP vorliegt, so besteht eine 98%-ige Wahrscheinlichkeit, dass CAL stagniert.

-Diskussion subgingivaler parodontaler Markerkeime in Assoziation zu beiden SNPs

Eine wichtige Rolle für die Progredienz der Parodontitis spielt das Vermögen des Immunsystems auf Parodontopathogene zu reagieren. Ein entscheidender Faktor dabei ist eine individuelle genetische Prädisposition. Um den genetischen Einfluss der beiden ANRIL SNPs auf die subgingivale Besiedlung mit Parodontopathogenen zu untersuchen, wurden beide SNPs auf ihre Assoziation zu folgenden Keimen getestet: *A.a.*, *P.g.*, *T.f.*, *T.d.*, *E.c.*, *F.n.*, *P.i.*, *P.m.*, *C.r.*, *C.s.*, und *E.n.*. Aufgrund unserer Ergebnisse vermuten wir, dass der CG+GG-Genotyp des rs1333049 ein unabhängiger Risikofaktor für die erhöhte subgingivale Besiedelung mit *E.c.* (univariat: $p=0,037$; multivariat: $p=0,024$) und für *P.m.* der CC-Genotyp ist (univariat: $p=0,047$; multivariat: $p=0,040$). Beim rs3217992 scheint der AG-Genotyp ein Risikogenotyp für die erhöhte Präsenz von *P.m.* zu sein (univariat: $p=0,009$; multivariat: $p=0,011$). Zu anderen Markerkeimen wurde keine Signifikanz nachgewiesen. *E.c.* kann in Endothelzellen eindringen und vermittelt dort intrazelluläre Entzündungsprozesse, während *P.m.* als Wegebereiter für Bakterien des roten Komplexes gilt (Socransky et al., 1998; Kozarov, 2012). Auffällig ist, dass trotz der Assoziationen des rs1333049 zu *E.c.* und *P.m.* keine Assoziation zur Schwere der Parodontitis gezeigt werden konnte. Offensichtlich führt der gezeigte genetische Einfluss auf die Komposition des Biofilms nicht zu klinisch deutlich erudierbaren Veränderungen im Erscheinungsbild der Parodontitis.

Es fehlen derzeit vergleichbare Studien, welche die Bedeutung der beiden ANRIL SNPs auf subgingivale Markerkeime untersucht haben.

-Diskussion beider Polymorphismen zu serologischen Parametern

Parodontitis und die KHK gelten als komplexe chronische Entzündungserkrankungen und können neben den lokalen Entzündungserscheinungen mit systemisch erhöhten Leveln von Akute-Phase-Proteinen wie CRP oder pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 einhergehen. Des Weiteren wird vermutet, dass erhöhte Serumwerte dieser Entzündungsmarker die Parodontitis sowie die

atherosklerotische Pathogenese an der Gefäßwand negativ beeinflussen (Loos et al., 2000). Sowohl die Expression von CRP, als auch die von IL-6 wird unter anderem genetisch beeinflusst. In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass das CRP-Niveau mit genetischen Varianten im ANRIL-Gen (rs1333048) assoziiert ist (Teeuw et al., 2015). Beide in unserer Studie analysierten SNPs wurden hinsichtlich einer möglichen Assoziation zu den biochemischen Parametern CRP, Leukozyten, IL-6, Kreatinin, Gesamtcholesterin, HDL, LDL und Triglyceride untersucht. Signifikante Assoziationen wurden nur zwischen dem SNP rs1333049 und dem CRP- bzw. HDL Serumspiegel nachgewiesen. Der CC-Genotyp des rs1333049 steigerte das Risiko für erhöhte CRP-Spiegel signifikant (univariat: $p=0,025$; multivariat: $p=0,038$; standardisierter Regressionskoeffizient $B = 0,068$). In den statistischen Untersuchungen zum HDL-Serumspiegel wurde ebenfalls der CC-Genotyp als Risikofaktor für erniedrigte HDL-Werte identifiziert (univariat: $p=0,012$; multivariat: $p=0,020$; standardisierter Regressionskoeffizient $B = 0,069$). Unsere Ergebnisse werden gestützt durch weitere Studien. Ahmed und Kollegen untersuchten die Assoziation des SNPs rs1333049 bei Patienten mit MI und familiärer Hypercholesterinämie und bestimmten die Auswirkungen des Genotyps auf die Lipidspiegel in einer nordpakistanischen Population. Sie identifizierten den CC-Genotyp bzw. das C-Allel als Risikofaktor für MI und bei familiärer Hypercholesterinämie hatten CC-Genotypen im Vergleich zu den CG- und GG-Individuen einen signifikant niedrigeren Gesamtcholesterinspiegel, LDL-Spiegel und Triglyceridspiegel ($p < 0,05$) (Ahmed et al., 2013). Zhao und Kollegen notierten im Rahmen ihrer Studie zum rs1333049 bei hämorrhagischen Schlaganfallpatienten signifikant höhere Konzentrationen von LDL ($p = 0,027$), HDL ($p < 0,001$) und Gesamtcholesterin ($p < 0,001$) bei GG+CG-Genotypträgern (Zhao et al., 2017).

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass der SNP rs1333049 ein prognostischer Faktor für einen erhöhten CRP, aber verringerten HDL-Spiegel ist. In verschiedenen anderen Studien wurden zudem Assoziationen des rs1333049 zum MI, Schlaganfall und plötzlichen Herztod gezeigt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der rs1333049 eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielen könnte. Die Ursache dafür, dass der rs1333049 in unserer Studie zum CRP- und HDL-Spiegel assoziiert ist, jedoch nicht zum kEP könnte darin begründet sein, dass das kardiovaskuläre Outcome noch von einer Vielzahl anderer Variablen mit möglicherweise höherer Bedeutung beeinflusst wird (Alter, Geschlecht, BMI, Rauchen, Diabetes).

Der SNP rs3217992 war zu keinem der genannten biochemischen Parameter assoziiert. Zum derzeitigen Zeitpunkt existieren keine anderen Studien, die entsprechende Assoziationen zeigen. Die differenten Ergebnisse beider Polymorphismen hinsichtlich ihrer Assoziationen zu serologischen Parametern lassen vermuten, dass unterschiedliche Pathomechanismen vorliegen. Auf der einen Seite steuert ANRIL Gene mit entzündlichen Funktionen über den STAT1-Signalweg (Harismendy et al., 2011), auf der anderen Seite Gene mit nicht-entzündlichen

Funktionen (ADIPOR1, C11ORF10, VAMP3) (Bochenek et al., 2013). Diese Gene stehen in Assoziation mit Mechanismen, die den Fett- und Kohlenhydratmetabolismus und das Immunsystem verbinden. Alle diese Stoffwechselwege spielen sowohl bei der Parodontitis, als auch bei der KHK eine wichtige Rolle.

-Kardiovaskuläre Vorerkrankungen in Assoziation zu beiden SNPs

Die Assoziation des rs1333049 zu KHK wird bereits seit vielen Jahren in verschiedensten Ethnizitäten untersucht. Schunkert et al. bestätigten in ihrer Meta-Analyse in sieben verschiedenen Populationen den Zusammenhang des rs1333049 zur KHK, was diesen Marker zum am bisher besten replizierten genetischen Risiko-Locus für die KHK macht (Schunkert et al., 2008). Bayoglu et al. zeigten eine Assoziation zum systolischen Blutdruck, während Ahmed und Kollegen in ihrer Fall-Kontrollstudie den rs1333049 zur Inzidenz des MI in der pakistanischen Bevölkerung untersuchten (Bayoglu et al., 2016, Ahmed et al., 2013). Ahmed et al. wiesen in der logistischen Regression den höheren Anteil des CC-Genotyps bei Patienten mit MI im Vergleich zu gesunden Kontrollen nach (OR= 3,17, 95% KI: 1,85-5,44, $p < 0,001$). Ebenso trat das Risikoallel C signifikant häufiger bei Patienten mit MI im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (OR= 1,55, 95% KI: 1,22, $p < 0,001$) (Ahmed et al., 2013). Ivanova und Kollegen untersuchten in ihrer Studie den rs1333049 in Assoziation zu einem plötzlichen Herztod. Sie stellten fest, dass bei männlichen Probanden mit dem CC-Genotyp des rs1333049 ein signifikant höheres Risiko besteht, einen plötzlichen Herztod zu erleiden ($p = 0,019$) (Ivanova et al., 2017). Auch Karvanen et al. identifizierten das C-Allel als Risikoallel des SNP rs1333049 für KHK und Schlaganfall (Karvanen et al., 2009). Auf Basis dieser Daten untersuchten wir den rs1333049 und rs3217992 auf mögliche Assoziationen zum Zeitpunkt der Basisuntersuchung bekannten Vorerkrankungen wie Schlaganfall, Myokardinfarkt, PAVK, Diabetes, Dyslipoproteinämie und rheumatoide Arthritis. Wir konnten keine signifikanten Assoziationen hinsichtlich der Genotyp- und Allelverteilung des SNP rs1333049 zeigen. Gründe für die zu anderen Studien abweichenden Ergebnisse könnten in der Auswahl der Fall- und Kontrollgruppen, dem gewählten Studiendesign (Querschnittsstudie, Longitudinalstudie, kontrollierte Studie) und ethnischen Unterschieden in der Genotypverteilung liegen.

Zu Beginn der Basisuntersuchung hatten unsere Patienten mit der Genotypkonstellation AA + AG des rs3217992 signifikant häufiger einen Schlaganfall erlitten (univariat: $p = 0,048$, multivariat: $p = 0,048$). Diese Ergebnisse werden gestützt durch weitere Studien. Konsistente Ergebnisse zum rs3217992 präsentierten Ghanbari und Kollegen. Sie zeigten in ihrer Meta-Analyse, dass der rs3217992 an der Expression von kardiometabolischen Merkmalen der mikro-RNA-vermittelten Regulation beteiligt ist, indem er sie verringert oder aufhebt (Ghanbari et al., 2015). Anhand dieser Untersuchungen konnte die funktionelle Rolle des rs3217992 bei Genen des kardiovaskulären Umbaus gezeigt werden. Hu und Kollegen konnten in einer

Fallkontrollstudie mit 355 Patienten zwischen 27-85 Jahren der han-chinesischen Bevölkerung keine Assoziation des rs3217992 zum Schlaganfall nachweisen. (Hu et al., 2009). Abweichende Ergebnisse könnten wieder in ethnischen Unterschieden begründet sein. In der vorliegenden Studie war der rs3217992 sowohl zur Schwere der PA, als auch zur Vorerkrankung Schlaganfall im Rahmen der Basisuntersuchung assoziiert. In der Meta-Analyse von Leira et al. wurde die Auswirkung der PA auf einen Schlaganfall gezeigt (Leira et al., 2017). Prospektiv betrachtet, sollten noch weitere Studien durchgeführt werden, um sichere Beweise für den Zusammenhang zwischen PA und Schlaganfall zu erforschen.

5.3 Ergebnisdiskussion des 3-Jahres Follow-Up

-Charakterisierung der Patientenkohorte

Von insgesamt 933 genotypisierten Patienten konnten die Daten von 886 Patienten im 3-Jahres Follow-Up innerhalb von $153,4 \pm 48,7$ Wochen ermittelt werden (Drop-out Rate von 5%). Vergleicht man unsere Drop-out Rate von lediglich 5% mit anderen Studien, so ist diese als sehr gering zu betrachten (Yoon et al., 2013; Könecke et al., 2016). Von 866 Patienten erlitten 16,1% ein kardiovaskuläres Sekundärereignis. Vergleicht man diese Zahl des Outcomes mit anderen Studien, so erlitten beispielsweise in der Studie von Gullestad und Kollegen (2012) 12,7 % der Patienten nach 3 Monaten ein erneutes kardiovaskuläres Ereignis. Ein Grund für die vergleichsweise geringe Zahl von 16,1% Probanden mit Sekundärereignissen nach 3 Jahren könnte sein, dass unsere Probanden durch häufige ärztliche und zahnärztlichen Untersuchungen/Befragungen zum Thema „Gesundheit“ sensibilisiert wurden und sie möglicherweise zu einem gesünderen Lebensstil motiviert werden konnten. Des Weiteren könnte es sich aber auch um rein zufällige Besonderheiten des Patientenkollektivs handeln, die mit einem verbesserten Outcome einhergehen könnten. Einschränkender Aspekt beim 3-Jahres Follow-Up ist die Tatsache, dass die Endpunktereignisse nur per Interview, aber nicht durch eine erneute internistische Untersuchung erfasst wurden. Im Fall des Todes eines Patienten wurden Hausärzte oder Gesundheitsämter nach der Todesursache befragt. Es ist deshalb nicht ausgeschlossen, dass Fehldiagnosen aufgrund unvollständiger oder fehlerhafter Angaben gestellt wurden.

-Hauptziel des 3-Jahres Follow-Up: ANRIL SNPs in Abhängigkeit zur Inzidenz des kombinierten Endpunktes

Das zweite Hauptziel der vorliegenden Studie war zu ermitteln, ob die beiden ANRIL SNPs für weitere kardiovaskuläre Ereignisse von prognostischem Wert sind (Arbiol-Roca et al., 2017). In der statistischen Auswertung der beiden SNPs rs1333049 und rs3217992 wurde den individuellen Genotypkonstellationen und den Allelen sowohl die Anzahl des kumulativen Überlebens (kardiovaskulärer Tod, Tod durch Schlaganfall, Myokardinfarkt, Schlaganfall/TIA), als auch die Zeit bis zum Eintreten des kombinierten Endpunkts gegenübergestellt. Beim rs1333049 war in

der Kaplan-Meier-Statistik weder eine Genotypkonstellation, noch eines der Allele innerhalb des 3-Jahres Follow-Up signifikant zum kombinierten Endpunkt assoziiert. Auch die statistischen Untersuchungen der Genotypen CC, CG und GG im Hinblick auf die einzelnen Endpunkte (kardiovaskulärer Tod, Tod durch Schlaganfall, Myokardinfarkt, Schlaganfall/TIA) blieben ohne signifikante Ergebnisse. Eine Follow-Up Studie bei Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung untersuchte die Assoziation einzelner ANRIL SNPs zur Prävalenz höherer kardiovaskulären Morbidität und Mortalität (Arbiol-Roca et al., 2017). Sie verwendeten andere ANRIL SNPs als in unserer Studie, aber Schaefer et al. zeigten 2009, dass der in unserer Studie untersuchte rs1333049 im Kopplungsungleichgewicht mit rs10757278 ist, welcher sich in der Studie von Arbiol-Roca et al. als prognostischer kardiovaskulärer Faktor erwiesen hat. So hatten Patienten, die homozygot das Risikoallel G exprimierten, während der Hämodialyse ein 2,17 - fach erhöhtes Risiko einen primären Endpunkt zu erreichen im Gegensatz zu AA- oder AG-Genotypträgern (Arbiol-Roca et al., 2017). Unsere Studienergebnisse weichen möglicherweise deshalb davon ab, da wir erneute KHK-Ereignisse bei Patienten mit bereits bestehender KHK untersuchten.

Haver und Kollegen veröffentlichten eine Assoziationsanalyse von sieben SNPs (u. a. rs1333049) an sieben gut etablierte KHK-Risiko-Loci (u.a. ANRIL) von 3320 Patienten, bei welchen eine ischämische Erkrankung mit systolischer Herzinsuffizienz festgestellt wurde. Sie konnten keine signifikante Assoziation zu einem primären Endpunkt feststellen (kardiovaskulärer Tod, nicht-tödlicher Myokardinfarkt, nicht-tödlicher Schlaganfall) (Haver et al., 2014).

Der rs3217992 als Prognosefaktor für ein kardiovaskuläres Sekundärereignis (kardiovaskulärer Tod, Tod durch Schlaganfall, Myokardinfarkt, Schlaganfall / TIA) wurde bisher in klinischen Studien noch nicht untersucht. Wir konnten den AA-Genotyp des rs3217992 als signifikanten prognostischen Faktor für das Erreichen eines kEP ermitteln (signifikanter Log-Rank Test: $p=0,035$). Auch nach Adjustierung für weitere Risikofaktoren (Alter, männliches Geschlecht, Rauchen, Diabetes mellitus, Body Mass Index, Bluthochdruck, Dyslipoproteinämie und schwere Parodontitis) erwies sich der rs3217992 als unabhängiger Prädiktor für den kEP. Die aktuelle Studienlage erklärt die zugrunde liegenden biologischen Mechanismen dieser Assoziation noch nicht vollständig. Studien bestätigten bereits die wichtige Bedeutung des ANRIL-Gens für den Glukose- und Fettstoffwechsel und bei der Regulation kardiometabolischer Gene (Helfand et al., 2009; Bochenek et al., 2013; Ghanbari et al., 2015;).

Nebenziel 3-Jahres Follow-Up: -Diskussion der ANRIL SNPs zur Inzidenz der einzelnen Endpunkte

Aufgrund der aktuellen Studienlage stellten wir die Hypothese auf, dass C-Allel/CC-Genotypen (rs1333049) und A-Allel/AA-Genotypen (rs3217992) bei separater Betrachtung der einzelnen kardiovaskulären Endpunkte häufiger ein kardiovaskuläres Sekundärereignis erleiden. Ahmed et

al. (2013) zeigten, dass das C-Allel des rs1333049 signifikant mit einem MI assoziiert ist (OR = 1,55, $p < 0,001$). In einer groß angelegten Fall-Kontroll Studie wurde das C-Allel ebenfalls als signifikanter Prognosefaktor für die KHK identifiziert, sowohl bei männlichen, als auch bei weiblichen Probanden (Lian et al., 2014). In der gleichen Studie verglichen Lian und Kollegen in einer Meta-Analyse insgesamt 21 Studien mit 20.969 Fällen/34.114 Kontrollen und zeigten auch hier wieder die starke Assoziation zwischen dem rs1333049 und der KHK. Unsere Ergebnisse zum rs1333049 zeigten jedoch nur eine Tendenz dafür, dass das C-Allel mit einem höheren Risiko verbunden ist einen MI zu erleiden (Log-Rank Test: 0,061). Einzig das A-Allel des rs3217992 war signifikant ($p=0,026$) mit einem höheren Risiko für das Auftreten eines Myokardinfarkts assoziiert. Zu allen anderen Endpunkten konnte keine Assoziation nachgewiesen werden. In der Cox-Regression (Einschluss), unter Berücksichtigung weiterer Kovariablen wurde das A-Allel als unabhängiger Prognosefaktor für einen Myokardinfarkt als erneutes kardiovaskuläres Event unter Patienten mit KHK bestätigt ($p=0,030$). Alle anderen Genotypkonstellationen und Allele des ANRIL rs3217992 waren in Hinblick auf die weiteren Endpunkte (kardiovaskulärer Tod, Tod durch Schlaganfall, Schlaganfall/TIA) nicht signifikant. Obwohl bei Yang und Kollegen ein anderes Studiendesign (Fall-Kontroll-Studie) im Vergleich zu dem Design der vorliegenden Studie (longitudinale Kohorten-Studie) vorliegt, werden unsere Ergebnisse durch diese Studie unterstützt. Sie zeigten unter männlichen chinesischen Probanden eine positive Assoziation des rs3217992 mit dem MI. Dabei hatten männliche Probanden mit den AA- oder AG-Genotypen ein erhöhtes MI-Risiko im Vergleich zu GG-Genotypträgern (Yang et al., 2009).

6 Zusammenfassung und Ausblick

Parodontitis und koronare Herzerkrankung sind beide inflammatorisch bedingte Erkrankungen mit einer ausgeprägten Prävalenz und Inzidenz in der Bevölkerung der Industrienationen. Der primäre ätiologische Faktor der Parodontitis ist die mikrobielle Plaque. Die körpereigene Immunabwehr kann die Entzündung nicht kontrollieren und verursacht den Abbau des Zahnhalteapparates durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Auch die Progression und Pathogenese der atherosklerotischen Plaques, die wiederum Verursacher einer KHK sind, werden durch das Immunsystem und dessen modulierende Effekte auf die Inflammation beeinflusst. Seit langem wird ein Zusammenhang zwischen parodontalen und kardiovaskulären Erkrankungen vermutet. Als Schnittstelle beider Erkrankungen werden u.a. gemeinsame genetische Risikofaktoren diskutiert. Der Einfluss des ANRIL-Gens auf den Glukosemetabolismus, die Inflammation und den Lipidstoffwechsel, welche wiederum Einfluss auf Parodontitis und kardiovaskuläre Erkrankungen haben, wurde bereits in mehreren Studien beschrieben (Ahmed et al., 2013; Bochenek et al., 2013; Hannou et al., 2015). Aufgrund dieser Studienlage war es unser Ziel unter stationären KHK-Patienten eine mögliche Assoziation der SNPs rs1333049 und rs3217992 des ANRIL-Gens zur Schwere der Parodontitis nachzuweisen.

Des Weiteren wurde untersucht, ob eine Assoziation der beiden SNPs zu klinischen und parodontologischen Parametern, zum Auftreten von parodontopathogenen Bakterien, zu serologischen Parametern, sowie zu bekannten Vorerkrankungen besteht. In einem 3-Jahres-Follow-Up sollte geprüft werden, ob diese SNPs als Prognosefaktoren für das Auftreten eines kombinierten Endpunktes (kEP) (kardiovaskulärer Tod, Tod durch Schlaganfall, Myokardinfarkt, Schlaganfall/TIA) herangezogen werden können. Ebenso wurde die Frage gestellt, ob die SNPs bei separater Betrachtung der Endpunkte (kardiovaskulärer Tod, Tod durch Schlaganfall, Myokardinfarkt, Schlaganfall/TIA) prognostisch von Bedeutung sind. Der SNP rs1333049 war nicht zur Schwere der PA aber zum Vorkommen von *E.c.* und *P.m.* assoziiert. Außerdem war der rs1333049 mit einem erhöhten CRP-Serumspiegel sowie verringerten HDL-Serumspiegel assoziiert. Eine Assoziation zum kardiovaskulären Follow-Up konnte nicht gezeigt werden. Somit wurde nicht nachgewiesen, dass der SNP rs1333049 ein gemeinsamer Risikofaktor für schwere Parodontitis und erneute kardiovaskuläre Ereignisse unter Patienten mit KHK ist. Der SNP scheint weder ein relevanter Risikofaktor für schwere Parodontitis, noch für neue kardiovaskuläre Events zu sein. Der rs3217992 war signifikant zur Schwere der PA, zum parodontalen Leitsymptom BOP und zum subgingivalen Keim *E.c.* assoziiert. In den Basisuntersuchen wurden Assoziationen auf bereits vorhandene Vorerkrankungen untersucht. Hierbei konnte eine Assoziation zum Schlaganfall gezeigt werden. Im 3-Jahres Follow-Up war der rs3217992 ein signifikanter Prognosefaktor für den kEP. Bei separater Betrachtung der Endpunkte konnte eine Assoziation zum Auftreten eines MI nachgewiesen werden. Der rs3217992 bildet daher möglicherweise einen gemeinsamen Risikofaktor für schwere Parodontitis und das kardiovaskuläre Outcome unter Patienten mit KHK.

Ausblick:

Patienten mit schwerer Parodontitis sollten über ihr möglicherweise erhöhtes Risiko für KHK aufgeklärt werden. Eine parallele Vorstellung beim Hausarzt oder beim Internisten/Kardiologen wäre hierbei sinnvoll. Auf der anderen Seite müssten Patienten mit manifesten atherosklerotischen Veränderungen beim Zahnarzt vorstellig werden, um über Parodontitis und Mundhygienemaßnahmen instruiert zu werden. Der Zahnarzt sollte den KHK-Patienten besonders intensiv parodontal untersuchen, in ein regelmäßiges Recall aufnehmen und bei Behandlungsbedarf explizit therapieren. Die gezeigten Assoziationen des rs3217992 zur PA/ kEP müssen in weiteren Studien repliziert werden. Möglicherweise ergibt sich dann zukünftig ein diagnostischer Nutzen für die Bestimmung des rs3217992.

7 Literaturverzeichnis

Aarabi G, Zeller T, Seedorf H, Reissmann D R, Heydecke G, Schaefer AS, Seedorf U (2017) Genetic Susceptibility Contributing to Periodontal and Cardiovascular Disease. *Journal of dental research* 96 (6), S. 610–617.

Ahmed W, Ali IS, Riaz M, Younas A, Sadeque A, Niazi AK, Niazi SH, Ali SH, Azam M, Qamar R (2013) Association of ANRIL polymorphism (rs1333049:C>G) with myocardial infarction and its pharmacogenomic role in hypercholesterolemia. *Gene*.515(2):416-20.

Ainamo J, Bay I (1975) Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*; 25:229–235.

Albandar JM, Brunelle JA, Kingman A (1999) Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol* 70:13-29.

Albandar JM (2002) Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontology* 2000 29:177–206.

Aparna MS, Yadav S (2008) Biofilms: Microbes and Disease. *Braz J Infect Dis.*;12(6):526-30.

Arbes SJ Jr, Slade GD, Beck JD (1999) Association between extent of periodontal attachment loss and self-reported history of heart attack: an analysis of NHANES III data. *J Dent Res*. 1999 Dec;78(12):1777-82.

Arbiol-Roca A, Padró-Miquel A, Hueso M, Navarro E, Alía-Ramos P, González-Álvarez MT, Rama I, Torras J, Grinyó JM, Cruzado JM, Lloberas N (2017) Association of ANRIL gene polymorphisms with major adverse cardiovascular events in hemodialysis patients. *Clin Chim Acta.*;466:61-67.

Armitage GC (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*; 4:1-6.

Bahekar AA, Singh S, Saha S, Molnar J, Arora R (2007) The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis. *Am. Heart J.*, 154, 830–837.

Bascones-Martínez A, Muñoz-Corcuera M, Bascones-Ilundain J (2015) Diabetes and periodontitis: A bidirectional relationship *Medicina Clinica*, 145(1), 31–5.

Bashan E, Harper R, Bi Y, Hodish I (2015) A novel approach to optimise glycaemic control in insulin users, *BMJ Case Reports*, 1–7.

Battaglia M (2014) Neutrophils and type 1 autoimmune diabetes. *Curr Opin Hematol*; 21(1): 8-15.

Bayoglu B, Yuksel H, Cakmak HA, Dirican A, Cengiz M (2016) Polymorphisms in the long non-coding RNA CDKN2B-AS1 may contribute to higher systolic blood pressure levels in hypertensive patients. *Clin Biochem.*:10-11:821-7.

Bergström J (2004) Influence of tobacco smoking on periodontal bone height. Long-term observations and a hypothesis. *J. Clin. Periodontol.*,31, 260–266.

Blake GJ, Ridker PM (2002) Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. *Journal of internal medicine* 252:283–294.

- Bochenek G, Häsler R, El Mokhtari NE, König IR, Loos BG, Jepsen S, Rosenstiel P, Schreiber S, Schaefer AS. (2013) The large non-coding RNA ANRIL which is associated with atherosclerosis periodontitis and several forms of cancer regulates ADIPOR1 VAMP3 and C11ORF10. *Hum Mol Genet* 22: 4516-27.
- Borrell LN, Papapanou PN (2005) Analytical epidemiology of periodontitis. *Journal of clinical periodontology* 32 Suppl 6, S. 132–158.
- Boyce BF, Xing L (2007) Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther.* 9 Suppl 1: S1.
- Camelo-Castillo AJ, Mira A, Pico A, Nibali L, Henderson B, Donos N, Tomas I (2015) Subgingival microbiota in health compared to periodontitis and the influence of smoking. *Frontiers in microbiology* 6:119.
- Carrillo-de-Albornoz A, Figuero E, Herrera D, Bascones-Martínez A (2010) Gingival changes during pregnancy: II. Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm. *Journal of Clinical Periodontology*, 37(3), 230–40.
- Chen LL, Wu YM, Yan J, Sun WL, Sun YZ, Ojcius D (2005) Association between coinfection of *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* and periodontal tissue destruction in chronic periodontitis. *Chin Med J* 118:915-921.
- Chiu B (1999) Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *Am Heart J.* 138(5 Pt 2):S534-6.
- Chiuve SE, McCullough ML, Sacks FM, Rimm EB (2006) Healthy lifestyle factors in the primary prevention of coronary heart disease among men: benefits among users and nonusers of lipid-lowering and antihypertensive medications. *Circulation* 114:160.
- Congrains A, Kamide K, Oguro R, Yasuda O, Miyata K, Yamamoto E, Kawai T, Kusunoki H, Yamamoto H, Takeya Y, Yamamoto K, Onishi M, Sugimoto K, Katsuya T, Awata N, Ikebe K, Gondo Y, Oike Y, Ohishi M, Rakugi H (2012) Genetic variants at the 9p21 locus contribute to atherosclerosis through modulation of ANRIL and CDKN2A/B. *Atherosclerosis* 220 (2), S. 449–455.
- Congrains A, Kamide K, Ohishi M, Rakugi H (2013) ANRIL: molecular mechanisms and implications in human health. *International journal of molecular sciences* 14 (1), S. 1278–1292.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*: 41: 435-64.
- Costerton JW (1999) Introduction to biofilm. *International J Antimicrob Agents*: 11: 237-9.
- Cugino D, Gianfagna F, Santimone I, de Gaetano G, Donati MB, Iacoviello L, Di Castelnuovo A (2012) Type 2 diabetes and polymorphisms on chromosome 9p21: a meta-analysis. In: *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD* 22 (8), S. 619–625.
- Cunnington MS, Santibanez KM, Mayosi BM, Burn J, Keavney B (2010) Chromosome 9p21 SNPs Associated with Multiple Disease Phenotypes. Correlate with ANRIL Expression. In: *PLoS genetics* 6 (4), e1000899.
- Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr (1991) Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*;251(4995):788-791.

Dahlöf B (2010) Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment. *Am J Cardiol.*105(1 Suppl):3A-9A.

Danesh J, Kaptoge S, Mann AG, Sarwar N, Wood A, Angleman SB, Wensley F, Higgins JP, Lennon L, Eiriksdottir G, Rumley A, Whincup PH, Lowe GD, Gudnason V (2008) Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review. *PLoS Med.*; 5: e78.

da Silva MK, de Carvalho ACG, Alves EHP, da Silva FRP, Pessoa LDS, Vasconcelos DFP (2017) Genetic Factors and the Risk of Periodontitis Development: Findings from a Systematic Review Composed of 13 Studies of Meta-Analysis with 71,531 Participants. *Int J Dent.*;2017:1914073.

Deschner J, Jepsen S, Jäger A (2011) Klinische Forschergruppe 208 »Ursachen und Folgen von Parodontopathien – genetische, zellbiologische und biomechanische Aspekte«, Spitzenforschung in der Zahnheilkunde – Innovationen und Auszeichnungen 2011, Reihe Lebendige Wissenschaft, Hrsg.: Alpha-Information-GmbH, Lampertheim: 66-86.

Deshpande RG, Khan MB, Genco CA (1998) Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 66: 5337–5343.

Desvarieux M, Schwahn C, Völzke H, Demmer RT, Lüdemann J, Kessler C, Jacobs DR Jr, John U, Kocher T (2004) Gender differences in the relationship between periodontal disease, tooth loss, and atherosclerosis. *Stroke.*;35(9):2029-35.

Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs DR Jr, Sacco RL, Papapanou PN (2005) Periodontal microbiota and carotid intima-media thickness: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *Circulation.*;111(5):576-82.

Divaris K, Monda KL, North KE, Olshan AF, Lange EM, Moss K, Barros SP, Beck JD, Offenbacher S (2012) Genome-wide association study of periodontal pathogen colonization. *Journal of dental research* 91 (7 Suppl), 21S–28S.

Eick S, Straube A, Guentsch A, Pfister W, Jentsch H (2011) Comparison of real-time polymerase chain reaction and DNA-strip technology in microbiological evaluation of periodontitis treatment. *Diagn Microbiol Infect Dis* 69:12-20.

Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ (2012) Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: 2009 and 2010 *J Dent Res.*;91(10):914-20.

Elamin AM, Skaug N, Ali RW, Bakken V, Albandar JM (2010) Ethnic disparities in the prevalence of periodontitis among high school students in Sudan. *Journal of Periodontology*; 81 (6): 891-896.

Emanuele E, Lista S, Ghidoni R, Binetti G, Cereda C, Benussi L, Maletta R, Bruni AC, Politi P (2011) Chromosome 9p21.3 genotype is associated with vascular dementia and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.*;32(7):1231-5.

Eriksen J, Sneftrup SB (2013) Anamnestic weight loss--Do patients remember correctly? *Eur J Clin Nutr.*67(6):607-9.

Ernst FD, Uhr K, Teumer A, Fanghänel J, Schulz S, Noack B, Gonzales J, Reichert S, Eickholz P, Holtfreter B, Meisel P, Linden GJ, Homuth G, Kocher T (2010) Replication of the association of chromosomal region 9p21.3 with generalized aggressive periodontitis (gAgP) using an independent case-control cohort. *BMC medical genetics* 11, S. 119.

- Frothingham C (1911) The relation between acute infectious diseases and arterial lesions. *Arch Intern Med* 8: 153–162.
- Geerts SO, Nys M, De MP, Charpentier J, Albert A, Legrand V, Rompen EH (2002) Systemic release of endotoxins induced by gentle mastication: association with periodontitis severity. *J Periodontol* 73:73-8.
- Genco RJ (1996) Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol*, 67, 1041-1049.
- Genco RJ (1998) Periodontal disease and risk for myocardial infarction and cardiovascular disease. *Cardiovasc Rev Rep* 19; 34-37.
- Ghanbari M, Franco OH, de Looper HW, Hofman A, Erkeland SJ, Dehghan A (2015) Genetic Variations in MicroRNA-Binding Sites Affect MicroRNA-Mediated Regulation of Several Genes Associated With Cardio-metabolic Phenotypes. *Circ Cardiovasc Genet.*3:473-86.
- Giacona MB, Papapanou PN, Lamster IB, Rong LL, D'Agati VD, Schmidt AM, Lalla E (2004) *Porphyromonas gingivalis* induces its uptake by human macrophages and promotes foam cell formation in vitro. *FEMS Microbiol Lett.*;241(1):95-101.
- Gilbert GH, Shelton BJ, Chavers LS, Bradford, Edward H Jr (2002) Predicting tooth loss during a population-based study: role of attachment level in the presence of other dental conditions. *Journal of Periodontology* 73:1427–1436.
- Gilley J, Fried M (2001) One INK4 gene and no ARF at the Fugu equivalent of the human INK4A/ARF/INK4B tumour suppressor locus. *Oncogene* 20 (50), S. 7447–7452.
- Glass CK, Witztum JL (2001) Atherosclerosis. the road ahead. *Cell.*;104(4):503-16.
- Graves DT, Cochran D (2003) The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*;74(3):391-401.
- Graves DT, Liu R, Alikhani M, Al-Mashat H, Trackman PC (2006) Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis--impact on periodontal pathology. *J Dent Res.*;85(1):15-21.
- Greenstein G, Lamster I (1997) Bacterial transmission in periodontal diseases: a critical review. *J Periodontol*, 68, 421-431.
- Grossi SG, Zambon J, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, Norderyd OM, Genco RJ (1994) Assessment of risk for periodontaldisease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 65, 260-267.
- Gullestad L, Ueland T, Kjekshus J, Nymo SH, Hulthe J, Muntendam P, Adourian A, Böhm M, van Veldhuisen DJ, Komajda M, Cleland JG, Wikstrand J, McMurray JJ, Aukrust P, CORONA Study Group (2012) Galectin-3 predicts response to statin therapy in the Controlled Rosuvastatin Multinational Trial in Heart Failure (CORONA). *Eur Heart J.*;33(18):2290-6.
- Haba D, Teslaru S, Ungureanu D, Hodorog D, Alecu C, Benghiac AG, Zetu L, Ancuța C, Ancuța E, Nemțoi A, Iordache C (2011) Evaluation of serum and gingival crevicular fluid C-reactive protein and IL-6 levels in patients with periodontitis and transient ischemic attacks. *Rom J Morphol Embryol.*;52(4):1243-7.
- Haffajee AD, Socransky SS (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000; 5: 78-111.

- Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L (2007) The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand*;65(1):1-13.
- Hannou SA, Wouters K, Paumelle R, Staels B (2015) Functional genomics of the CDKN2A/B locus in cardiovascular and metabolic disease: what have we learned from GWASs? *Trends Endocrinol Metab.*;26(4):176-84.
- Hansson GK, Jonasson L, Lojstjed B, Stemme S, Kocher O, Gabbiani G (1988) Localization of T lymphocytes and macrophages in fibrous and complicated human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*;72(2-3):135-141.
- Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ (2000) Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol.*;71(10):1554-60.
- Harismendy O, Notani D, Song X, Rahim NG, Tanasa B, Heintzman N, Ren B, Fu XD, Topol EJ, Rosenfeld MG, Frazer KA. (2011) 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon-gamma signalling response, *Nature* 470: 264-268.
- Harsunen MH, Puff R, D'Orlando O, Giannopoulou E, Lachmann L, Beyerlein A, von Meyer A, Ziegler AG (2013) Reduced blood leukocyte and neutrophil numbers in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Horm Metab Res*; 45(6): 467–470.
- Haver VG, Verweij N, Kjekshus J, Fox JC, Wedel H, Wikstrand J, van Gilst WH, de Boer RA, van Veldhuisen DJ, van der Harst P (2014) The impact of coronary artery disease risk loci on ischemic heart failure severity and prognosis: association analysis in the COntrolled ROsuvastatin multiNAtional trial in heart failure (CORONA). *BMC Med Genet.*;15:140.
- Helfand M, Buckley DI, Freeman M, Fu R, Rogers K, Fleming C, Humphrey LL (2009) Emerging risk factors for coronary heart disease: a summary of systematic reviews conducted for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2009; 7:496-507.
- Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdottir S, Blondal T, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Sigurdsson A, Baker A, Palsson A, Masson G, Gudbjartsson DF, Magnusson KP, Andersen K, Levey AI, Backman VM, Matthiasdottir S, Jonsdottir T, Palsson S, Einarsdottir H, Gunnarsdottir S, Gylfason A, Vaccarino V, Hooper WC, Reilly MP, Granger CB, Austin H, Rader DJ, Shah SH, Quyyumi AA, Gulcher JR, Thorgeirsson G, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. (2007) A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. In: *Science (New York, N.Y.)* 316 (5830), S. 1491–1493.
- Hellerbrand C, Mühlbauer M, Wallner S, Schuierer M, Behrmann I, Bataille F, Weiss T, Schölmerich J, Bosserhoff AK (2006) Promoter-hypermethylation is causing functional relevant downregulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in hepatocellular carcinoma. In: *Carcinogenesis* 27 (1), S. 64–72.
- Helmholtz Zentrum München (2013) KORA Herzinfarktregister Augsburg. Daten zu Herzinfarkten in der Region Augsburg (Mortalität, Morbidität, Letalität, Vorerkrankungen, medizinische Versorgung). www.gbebund.de (Stand: April 2014).
- Herzberg MC, Weyer MW (1998) Dental plaque, platelets, and cardiovascular diseases. *Ann Periodontol* 3: 151–160.
- Hinode D, Nakamura R, Grenier D, Mayrand D (1998) Cross-reactivity of specific antibodies directed to heat shock proteins from periodontopathogenic bacteria and of human origin (corrected). *Oral Microbiol Immunol.*;13(1):55-8.

- Holdt LM, Beutner F, Scholz M, Gielen S, Gäbel G, Bergert H, Schuler G, Thiery J, Teupser D (2010) ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30 (3), S. 620–627.
- Holdt LM, Teupser D (2013) From genotype to phenotype in human atherosclerosis: recent findings. *Curr Opin Lipidol.* 24(5):410–418.
- Hu WL, Li SJ, Liu DT, Wang Y, Niu SQ, Yang XC, Zhang Q, Yu SZ, Jin L, Wang XF (2009) Genetic variants on chromosome 9p21 and ischemic stroke in Chinese. *Brain Res Bull.* 14;79(6):431-5.
- Humphrey LL, Fu R, Buckley DI, Freeman M, Helfand M (2008) Periodontal disease and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. *J Gen Intern Med*;23(12):2079-2086.
- Ivanova A, Maksimov V, Orlov P, Ivanoshchuk D, Savchenko S, Voevoda M (2017) Association of the genetic markers for myocardial infarction with sudden cardiac death Indian Heart Journal, Volume 69, Supplement 1, pp. S8-S11.
- Janket SJ, Baird AE, Chuang SK, Jones JA (2003) Meta-analysis of periodontal disease and risk of coronary heart disease and stroke *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95(5):559-569.
- Johansson A (2011) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: a powerful tool with capacity to cause imbalance in the host inflammatory response. *Toxins (Basel)*; 3:242–59.
- Jordan R, Micheelis W (2016) Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie DMS V. Köln, Germany: Deutscher Ärzteverlag.
- Joshiyura KJ, Rimm EB, Douglass CW, Trichopoulos D, Ascherio A, Willett WC (1996) Poor oral health and coronary heart disease. *J Dent Res.*;75(9):1631-6.
- Kajiya M, Giro G, Taubman MA, Han X, Mayer MP, Kawai T (2010) Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. *J Oral Microbiol.*;2.
- Kanaparthi R, Kanaparthi A, Mahendra M (2012) C-reactive protein as a marker of periodontal disease. *Gen Dent*;60(1): e1-e5.
- Kaplan JB (2010) Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *Journal of Dental Research*: 89: 205–218.
- Karvanen J, Silander K, Kee F, Tiet L, Salomaa V, Kuulasmaa K, Wiklund PG, Virtamo J, Saarela O, Perret C, Perola M, Peltonen L, Cambien F, Erdmann J, Samani NJ, Schunkert H, Evans A; MORGAM Project (2009) The impact of newly identified loci on coronary heart disease, stroke and total mortality in the MORGAM prospective cohorts. *Genet Epidemiol.*;33(3):237-46.
- Katz J, Bhattacharyya I, Farkhondeh-Kish F, Perez FM, Caudle RM, Heft MW (2005) Expression of the receptor of advanced glycation end products in gingival tissues of type 2 diabetes patients with chronic periodontal disease: a study utilizing immunohistochemistry and RT-PCR. *J Clin Periodontol.*;32(1):40-4.

- Kebschull M, Demmer RT, Papapanou PN (2010) „Gum bug, leave my heart alone!“ Epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *J Dent Res* 89(9),879-902.
- Keijser B, Zaura E, Huse SM, van der Vossen, JMBM, Schuren, FHJ, Montijn RC, ten Cate JM, Crielaard W (2008) Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *Journal of dental research* 87:1016–1020.
- Kinane DF, Hart TC (2003) Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med.*;14(6):430-49.
- Kinane DF, Shiba H, Hart TC (2005) The genetic basic of periodontitis. *Periodontology*,39: 91-117.
- Kisley S (2016) No Metal Health without Oral Health *Can J Psychiatry.*;61(5):277-82.
- Könecke T, Primke D, Simon P (2016) Dropout und Therapietreue von Herzpatienten in Rehabilitationssportgruppen - eine Übersicht über einschlägige Studien. *Dtsch Z Sportmed.*; 67: 244-248.
- Kohnert M, Reichert S (2016) Assoziationen des T>A Polymorphismus (rs) im Promotor des RAGE-Gens zum Schweregrad der Parodontitis und Inzidenz neuer kardiovaskulärer Ereignisse (Dissertation). Halle: Universität Halle.
- Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S, Jakobovics NS (2010) Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance. *Nat Rev Micro:* 8: 471–480.
- Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TG Jr, Higginbottom FL, Duff GW (1997) The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.*;24(1):72-7.
- Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ (2013) Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine:* 3.
- Kozarov E (2012) Bacterial invasion of vascular cell types: vascular infectology and atherogenesis. *Future Cardiol* 8, 123-138.
- Krall EA (2001) The periodontal-systemic connection: implications for treatment of patients with osteoporosis and periodontal disease. *Ann Periodontol.*;6(1):209-13.
- Kumar R, Smeds J, Berggren P, Straume O, Rozell BL, Akslén LA, Hemminki K (2001) A single nucleotide polymorphism in the 3'untranslated region of the CDKN2A gene is common in sporadic primary melanomas but mutations in the CDKN2B, CDKN2C, CDK4 and p53 genes are rare. *Int J Cancer.*;95(6):388-93.
- Kurtis B, Tüter G, Serdar M, Akdemir P, Uygur C, Firatlı E, Bal B (2005) Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis. *J Periodontol*;76(11):1849-1855.
- Leibbrandt A, Penninger JM (2008) RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci*; 1143:123-150.

- Leira Y, Seoane J, Blanco M, Rodríguez-Yáñez M, Takkouche B, Blanco J, Castillo J (2017) Association between periodontitis and ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol.* 32(1):43-53.
- Lian J, Ba Y, Dai D, Chen Z, Lou Y, Jiang Q, Zhao R, Sun L, Huang X, Yang X, Ye M, Wang Y, Mao H, Guan H, Xu L, Guo J, Fang P, Li J, Ye H, Chen X, Peng P, Zhou J, Duan S (2014) A replication study and a meta-analysis of the association between the CDKN2A rs1333049 polymorphism and coronary heart disease. *J Atheroscler Thromb.*;11:1109-20.
- Libby P (2006) Inflammation and cardiovascular disease mechanisms 1,2,3. *Am J Clin Nutr.*;83(2):456S-460S.
- Liu YC, Lerner UH, Teng YT (2010) Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol 2000.*;52(1):163-206.
- Loe H, Theilade E, Jensen S (1965) Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.*36:177-87.
- Loesche WJ (1994) Periodontal disease as a risk factor for heart disease. *Compendium* 15, 976; 978-982.
- Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PM, van der Velden U (2000) Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol* 71, 1528-1534.
- Loos BG, John RP, Laine ML (2005) Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodont* 32:159-79.
- Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ (2006) Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 367, 1747-1757.
- Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U (1994) Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *The New England journal of medicine*; 330:1041-1046.
- Marsh PD, Bradshaw DJ (1999) Microbial community aspects of dental plaque. *BioLine*: 237–253.
- Marsh PD (2006) Dental plaque as a biofilm and a microbial community-implications for health and disease. *BMC Oral Health*:14.
- Mattila KJ, Nieminen MS, Valtonen VV, Rasi VP, Kesäniemi YA, Syrjälä SL, Jungell PS, Isoluoma M, Hietaniemi K, Jokinen MJ (1989) Association between dental health and acute myocardial infarction. *BMJ*;298(6676):779-781.
- Matuliene G, Pjetursson BE, Salvi GE, Schmidlin K, Brägger U, Zwahlen M, Lang NP (2008) Influence of residual pockets on progression of periodontitis and tooth loss: results after 11 years of maintenance. *J Clin Periodontol.*;35(8):685-95.
- McLaren JE, Ramji DP (2009) Interferon gamma: a master regulator of atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev*;20(2):125-135.
- McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, Hinds DA, Pennacchio LA, Tybjaerg-Hansen A, Folsom AR, Boerwinkle E, Hobbs HH, Cohen JC (2007) A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science*; 316: 1488–91.

- McPherson R (2013) From genome-wide association studies to functional genomics: new insights into cardiovascular disease. *The Canadian journal of cardiology* 29:23–29.
- Mealey BL (2006) Periodontal disease and diabetes. A two-way street. *J. Am. Dent. Assoc.*, 137 (Suppl. 26), S–31S.
- Mercado FB, Marshall RI, Bartold PM (2003) Inter-relationships between rheumatoid arthritis and periodontal disease. A review. *J. Clin.Periodontol.*, 30, 761–772.
- Michalowicz BS, Aeppli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL, Bouchard TJ Jr, Pihlstrom BL (1991) Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol.*;62(5):293-9.
- Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, Califano JV, Burmeister JA, Schenkein HA (2000) Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. In: *Journal of periodontology* 71 (11), S. 1699–1707.
- Micheelis W, Hoffmann T, Holtfreter B, Kocher T, Schroeder E (2008) Zur epidemiologischen Einschätzung der Parodontitislast in Deutschland– Versuch einer Bilanzierung. *Deutsche zahnärztliche Zeitschrift*.63(7): p. 464-472.
- Micheelis W (2011) Oral health in Germany: an oral epidemiological outline. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 54:1022–1026.
- Moore WE, Moore LV (1994) The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000; 5:66-77.
- Murray RZ, Kay JG, Sangermani DG, Stow JL. (2005) A role for the phagosome in cytokine secretion, *Science* 310: 1492-1495.
- Noack B, Genco RJ, Trevisan M, Grossi S, Zambon JJ, De Nardin E (2001) Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol*;72: 1221-7.
- Nonnenmacher C, Stelzel M, Susin C, Sattler AM, Schaefer JR, Maisch B, Mutters R, Flores-de-Jacoby L (2007) Periodontal microbiota in patients with coronary artery disease measured by real-time polymerase chain reaction: a case-control study. *J Periodontol*;78(9):1724-1730.
- Ohki T, Itabashi Y, Kohno T, Yoshizawa A, Nishikubo S, Watanabe S, Yamane G, Ishihara K (2012) Detection of periodontal bacteria in thrombi of patients with acute myocardial infarction by polymerase chain reaction. *Am Heart J*;163(2):164-167.
- Oliveira C, Watt R, Hamer M (2010) Toothbrushing, inflammation, and risk of cardiovascular disease: results from Scottish Health Survey. *BMJ (Clinical research ed.)* 340:2451.
- Page RC (1986) Gingivitis. *J Clin Periodontol*; 13:345-59.
- Page RC, Kornman KS (1997) The pathogenesis of human periodontitis: an introduction, *Periodontol* 2000.; 14: 9-11.
- Pakfetrat A, Falaki F, Delavarian Z, Dalirsani Z, Sanatkhani M, Zabihi Marani M (2015) Oral manifestations of human immunodeficiency virus-infected patients. *Iran J Otorhinolaryngol.*;27(78):43-54.
- Paraskevas S, Huizinga JD, Loos BG (2008) A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, 35, 277–290.

- Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW (2005) Periodontal diseases. *Lancet*, 366, 1809–1820.
- Pistorius A, Krahwinkel T, Willerhausen B, Boekstegen C (2002) Relationship between stress factors and periodontal disease. *Eur J Med Res.*;7(9):393-8.
- Poulton R, Caspi A, Milne BJ (2002) Association between children's experience of socioeconomic disadvantage and adult health: a life-course study. *Lancet*, Vol. 360, No.9346 pp. 1640-1645.
- Pussinen PJ, Jousilahti P, Alfthan G, Palosuo T, Asikainen S, Salomaa V (2003) Antibodies to periodontal pathogens are associated with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*23(7):1250-4.
- Raber-Durlacher JE, van Steenberghe TJ, Van der Velden U, de Graaff J, Abraham-Inpijn L (1994) Experimental gingivitis during pregnancy and post-partum: clinical, endocrinological, and microbiological aspects. *J Clin Periodontol.*;21(8):549-58.
- Rateitschak KH, Rateitschak EM, Wolf HF: *Farbatlant der Zahnmedizin 1 Parodontologie*. 3 Auflage. Thieme, Stuttgart, 2012a, S. 51.
- Rateitschak KH, Rateitschak EM, Wolf HF: *Farbatlant der Zahnmedizin 1 Parodontologie*. 3 Auflage. Thieme, Stuttgart, 2012b, S. 179-183.
- Rath SK, Mukherjee M, Kaushik R, Sen S, Kumar M (2014) Periodontal pathogens in atheromatous plaque. *Indian J Pathol Microbiol.*;57(2):259-64.
- Reichert S, Schulz S, Benten AC, Lutze A, Seifert T, Schlitt M, Werdan K, Hofmann B, Wienke A, Schaller HG, Schlitt A (2016) Periodontal conditions and incidence of new cardiovascular events among patients with coronary vascular disease. *J Clin Periodontol*. 2016 Nov;43(11):918-925.
- Rescala B, Rosalem W Jr, Teles RP, Fischer RG, Haffajee AD, Socransky SS, Gustafsson A, Figueredo CM (2010) Immunologic and microbiologic profiles of chronic and aggressive periodontitis subjects. *Journal of Periodontology*, 81(9), 1308–16.
- Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH (1997) Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med*, 336pp. 973-979.
- Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH (1998) Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation.*;98(8):731-3.
- Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH (2000a) Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men *Circulation*; 101:1767–1772.
- Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E (2000b) Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*;101(18):2149-2153.
- Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR (2002) Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *The New England journal of medicine* 347:1557–1565.

Robert Koch Institut (Hrsg) (2006) Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Heft 33. RKI, Berlin.

Roberts R, Stewart AFR (2012) 9p21 and the genetic revolution for coronary artery disease. In: *Clinical chemistry* 58 (1), S. 104–112.

Rosania AE, Low KG, McCormick CM, Rosania DA (2009) Stress, Depression, Cortisol, and Periodontal Disease. *J Periodontol* 80, 260-266.

Ross R (1995) Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol.*;57:791-804.

Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*;340(2):115-126.

Roth GA, Moser B, Roth-Walter F, Giacona MB, Harja E, Papapanou PN, Schmidt AM, Lalla E (2007) Infection with a periodontal pathogen increases mononuclear cell adhesion to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis.*;190(2):271-81.

Saito Y, Fujii R, Nakagawa K-I, Kuramitsu HK, Okuda K, Ishihara K (2008) Stimulation of *Fusobacterium nucleatum* biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*: 23: 1–6.

Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, Dixon RJ, Meitinger T, Braund P, Wichmann HE, Barrett JH, König IR, Stevens SE, Szymczak S, Tregouet DA, Iles MM, Pahlke F, Pollard H, Lieb W, Cambien F, Fischer M, Ouwehand W, Blankenberg S, Balmforth AJ, Baessler A, Ball SG, Strom TM, Braenne I, Gieger C, Deloukas P, Tobin MD, Ziegler A, Thompson JR, Schunkert H; WTCCC and the Cardiogenics Consortium (2007) Genomewide association analysis of coronary artery disease. In: *The New England journal of medicine* 357 (5), S. 443–453.

Sauer K, Cullen MC, Rickard AH, Zeef LAH, Davies DG, Gilbert P (2004) Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J Bacteriol.*;186:7312–7326.

Schaefer AS, Richter GM, Groessner-Schreiber B, Noack B, Nothnagel M, El Mokhtari NE, Loos BG, Jepsen S, Schreiber S (2009) Identification of a shared genetic susceptibility locus for coronary heart disease and periodontitis. *PLoS Genet.* 2009 Feb;5(2): e1000378.

Schaefer AS, Richter GM, Dommisch H, Reinartz M, Nothnagel M, Noack B, Laine ML, Folwaczny M, Groessner-Schreiber B, Loos BG, Jepsen S, Schreiber S (2011) CDKN2BAS is associated with periodontitis in different European populations and is activated by bacterial infection. In: *Journal of medical genetics* 48 (1), S. 38–47.

Schaefer AS, Bochenek G, Manke T, Nothnagel M, Graetz C, Thien A, Jockel-Schneider Y, Harks I, Staufienbiel I, Wijmenga C, Eberhard J, Guzeldemir-Akcakanat E, Cine N, Folwaczny M, Noack B, Meyle J, Eickholz P, Trombelli L, Scapoli C, Nohutcu R, Bruckmann C, Doerfer C, Jepsen S, Loos BG, Schreiber S (2013) Validation of reported genetic risk factors for periodontitis in a large-scale replication study. In: *Journal of clinical periodontology* 40 (6), S. 563–572.

Schaefer AS, Bochenek G, Jochens A, Ellinghaus D, Dommisch H, Guzeldemir-Akcakanat E, Graetz C, Harks I, Jockel-Schneider Y, Weinspach K, Meyle J, Eickholz P, Linden GJ, Cine N, Nohutcu R, Weiss E, Houry-Haddad Y, Iraqi F, Folwaczny M, Noack B, Strauch K, Gieger C, Waldenberger M, Peters A, Wijmenga C, Yilmaz E, Lieb W, Rosenstiel P, Doerfer C, Bruckmann C, Erdmann J, König I, Jepsen S, Loos BG, Schreiber S (2015) Genetic evidence for

PLASMINOGEN as a shared genetic risk factor of coronary artery disease and periodontitis, *Circ Cardiovasc Genet* 8: 159-167.

Schunkert H, Götz A, Braund P, McGinnis R, Tregouet DA, Mangino M, Linsel-Nitschke P, Cambien F, Hengstenberg C, Stark K, Blankenberg S, Tiret L, Ducimetiere P, Keniry A, Ghorri MJ, Schreiber S, El Mokhtari NE, Hall AS, Dixon RJ, Goodall AH, Liptau H, Pollard H, Schwarz DF, Hothorn LA, Wichmann HE, König IR, Fischer M, Meisinger C, Ouwehand W, Deloukas P, Thompson JR, Erdmann J, Ziegler A, Samani NJ; Cardiogenics Consortium (2008) Repeated replication and a prospective metaanalysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronaryartery disease. *Circulation*.117(13):1675-84.

Schwenk RW, Luiken JJ, Bonen A, Glatz JF. (2008) Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease, *Cardiovasc Res* 79: 249-258.

Sherborne AL, Hosking FJ, Prasad RB, Kumar R, Koehler R, Vijaykrishnan J, Papaemmanuil E, Bartram CR, Stanulla M, Schrappe M, Gast A, Dobbins SE, Ma Y, Sheridan E, Taylor M, Kinsey SE, Lightfoot T, Roman E, Irving JA, Allan JM, Moorman AV, Harrison CJ, Tomlinson IP, Richards S, Zimmermann M, Szalai C, Semsei AF, Erdelyi DJ, Krajcinovic M, Sinnott D, Healy J, Gonzalez Neira A, Kawamata N, Ogawa S, Koeffler HP, Hemminki K, Greaves M, Houlston RS (2010) Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. *Nat Genet.*;42(6):492-4.

Shiau HJ, Reynolds MA (2010) Sex differences in destructive periodontal disease: exploring the biologic basis. *Journal of periodontology* 81:1505–1517.

Silness J, Loe H (1964) Periodontal Disease in Pregnancy. II. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontologica Scandinavica*, 22, 121–35.

Socransky SS, Haffajee AD (1991) Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *J Periodontal Res.*;26(3 Pt 2):195-212.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* 25:134–144.

Stampfer MJ, Hu FB, Manson JE, Rimm EB, Willett WC (2000) Primary prevention of coronary heart disease in women through diet and lifestyle. *N Engl J Med.*; 343:16.

Sary H, Chandler A, Dinsmore R, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld M., Schwartz C, Wagner W, Wissler R (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995; 92: 1355-1374.

Strang F, Schunkert H (2014) C-reactive protein and coronary heart disease: all said-is not it? *Mediators of inflammation*:757123.

Takahashi Y, Davey M, Yumoto H, Gibson FC 3rd, Genco CA (2006) Fimbria-dependent activation of pro-inflammatory molecules in *Porphyromonas gingivalis* infected human aortic endothelial cells. *Cell Microbiol.* 8(5):738-57.

Taylor-Robinson D, Aduse-Opoku J, Sayed P, Slaney JM, Thomas BJ, Curtis MA (2002) Oro-dental bacteria in various atherosclerotic arteries. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*;21(10):755-7.

Teeuw W, Laine M, Bizzarro S, Loos B (2015) A Lead ANRIL Polymorphism Is Associated with Elevated CRP Levels in Periodontitis: A Pilot Case-Control Study. *PLoS One*.8;10(9): e0137335.

Teng YT (2006) Protective and destructive immunity in the periodontium: Part 1-innate and humoral immunity and the periodontium. *J Dent Res* 85:198-208.

The CARDIoGRAMplusC4D Consortium (2012) “Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease”. *Nat Genet.*;45(1):25-33.

Thomas T, Thomas TJ (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci.*;58(2):244-58.

Tonetti M S, Claffey N, European Workshop in Periodontology group C (2005) Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 32 Suppl 6(s6), 210–3.

Topol E J, Smith J, Plow EF, Wang QK (2006) Genetic susceptibility to myocardial infarction and coronary artery disease. *Hum Mol Genet.*;15 Spec No 2:R117-23.

Vaithilingam RD, Safii SH, Baharuddin NA, Ng CC, Cheong SC, Bartold PM, Schaefer AS, Loos BG (2014) Moving into a new era of periodontal genetic studies: relevance of large case-control samples using severe phenotypes for genome-wide association studies. *Journal of periodontal research* 49 (6), S. 683–695.

Valle A, Giamporcaro GM, Scavini M, Stabilini A, Grogan P, Bianconi E, Sebastiani G, Masini M, Maugeri N, Porretti L, Bonfanti R, Meschi F, De Pellegrin M, Lesma A, Rossini S, Piemonti L, Marchetti P, Dotta F, Bosi E, Battaglia M (2013) Reduction of circulating neutrophils precedes and accompanies type 1 diabetes. *Diabetes*; 62(6): 2072–2077.

Van Dyke TE, Sheilesh D (2005) Risk Factors for Periodontitis. *J Int Acad Periodontol.* 2005 Jan;7(1):3-7.

Vieira AR, Albandar JM (2014) Role of genetic factors in the pathogenesis of aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000.;65(1):92-106.

Wu T, Trevisan M, Genco RJ, Falkner KL, Dorn JP, Sempos CT (2000) Examination of the relation between periodontal health status and cardiovascular risk factors: serum total and high density lipoprotein cholesterol, C-reactive protein, and plasma fibrinogen. *Am. J. Epidemiol.*,151, 273–282.

Xu S, Song M, Xiong Y, Liu X, He Y, Qin Z (2017) The association between periodontal disease and the risk of myocardial infarction : a pooled analysis of observational studies. *BMC Cardiovasc Disord.*;17(1):50.

Yamazaki K, Ohsawa Y, Yoshie H (2001) Elevated proportion of natural killer T cells in periodontitis lesions: a common feature of chronic inflammatory diseases. *Am J Pathol.*158(4):1391-8.

Yan H, Yuan W, Velculescu VE, Vogelstein B, Kinzler KW (2002) Allelic variation in human gene expression. *Science*;297(5584):1143.

Yan R, Li W, Yin L, Wang Y, Bo J; PURE-China Investigators (2017) Cardiovascular Diseases and Risk-Factor Burden in Urban and Rural Communities in High-, Middle-, and Low-Income Regions of China: A Large Community-Based Epidemiological Study. *J Am Heart Assoc.*;6(2).
Yang XC, Zhang Q, Chen ML, Li Q, Yang ZS, Li L, Cao FF, Chen XD, Liu WJ, Jin L, Wang XF (2009) MTAP and CDKN2B genes are associated with myocardial infarction in Chinese Hans. *Clin Biochem.*;42(10-11):1071-5.

- Yap KL, Li S, Muñoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, Gil J, Walsh MJ, Zhou MM (2010) Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell.*;38(5):662-74.
- Ylä-Herttuala S, Luoma J, Kallionpää H, Laukkanen M, Lehtolainen P, Viita H (1996) Pathogenesis of atherosclerosis. *Maturitas.*;23 Suppl: S47-9.
- Yoon U, Kwok LL, Magkidis A (2013) Efficacy of lifestyle interventions in reducing diabetes incidence in patients with impaired glucose tolerance: a systematic review of randomized controlled trials. *Metabolism.* 2013 Feb;62(2):303-14.
- Yoshie H, Kobayashi T, Tai H, Galicia JC (2007) The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontology 2000* 43, S. 102–132.
- Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L; INTERHEART Study Investigators (2004) Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.*;364(9438):937-52.
- Zabaneh D, Balding DJ (2010) A genome-wide association study of the metabolic syndrome in Indian Asian men. *PLoS One.*5(8): e11961.
- Zeller T, Blankenberg S, Diemert P (2012) Genomewide association studies in cardiovascular disease--an update 2011. *Clinical chemistry* 58 (1), S. 92–103.
- Zhang YH, Heulsmann A, Tondravi MM, Mukherjee A, Abu-Amer Y (2001) Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J Biol Chem.*;276(1):563-8.
- Zhao B, Grimes SN, Li S, Hu X, Ivashkiv LB (2012) TNF-induced osteoclastogenesis and inflammatory bone resorption are inhibited by transcription factor RBP-J. *J Exp Med*;209(2):319-334.
- Zhao J, Wu X, Nie S, Gao X, Sun J, Li K, Zhang T, Huang Y (2017) Association of CDKN2B-AS1 rs1333049 with Brain Diseases: A Case-control Study and a Meta-analysis. *Clin Psychopharmacol Neurosci.*;15(1):53-58.
- Zigmond SH (1974) Mechanisms of sensing chemical gradients by polymorphonuclear leukocytes. *Nature.*; 249:450–2.

8 Thesen

1. Parodontitis könnte ein Risikofaktor für die Entstehung der koronaren Herzerkrankung sein. Der Zusammenhang zwischen beiden Erkrankungen könnte u.a. durch die Existenz gemeinsamer genetischer Risikofaktoren erklärt werden.
- 2.. In der vorliegenden Teilstudie des Gesamtprojektes „Parodontale Erkrankungen und ihre mikrobiologischen Erreger als Risikofaktoren für kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit Koronarer Herzerkrankung“ (ClinicalTrials.gov; *identifier*: NCT01045070) sollte die Bedeutung der beiden ANRIL SNPs rs1333049 und rs3217992 für die Prävalenz einer schweren Parodontitis unter KHK-Patienten untersucht werden. Außerdem sollte die prognostische Relevanz dieser SNPs für das erneute Auftreten von kardiovaskulären Folgeereignissen analysiert werden.
3. 1002 stationäre Patienten mit angiografisch nachgewiesener koronarer Herzerkrankung wurden parodontal und hinsichtlich der Prävalenz beider ANRIL SNPs untersucht. Nach drei Jahren wurde die Inzidenz neuer kardiovaskulärer Ereignisse (kombinierter Endpunkt: kardiovaskulärer Tod, Tod durch Schlaganfall, Myokardinfarkt, Schlaganfall oder transitorische ischämische Attacke) untersucht.
4. In der Kohorte der KHK Patienten waren Träger des AG-Genotyps des rs3217992 signifikant häufiger an einer schweren Parodontitis erkrankt, als GG- und AA-Genotypträger ($p=0,022$; Odds Ratio= 1,367; 95% Konfidenzintervall: 1,054-1,772). Der AG-Genotyp wurde auch in der multivariaten Analyse nach Adjustierung für weitere Kovariablen (Alter, Geschlecht, Rauchen, BMI, Plaqueindex) als unabhängiger parodontaler Risikoindikator bestätigt ($p=0,034$; Odds Ratio= 1,366; 95% Konfidenzintervall: 1,024-1,821). Es konnte keine Assoziation des ANRIL SNPs rs1333049 zum Auftreten einer schweren Parodontitis nachgewiesen werden.
5. Obwohl keine signifikanten Assoziationen des ANRIL SNPs rs1333049 zu den zahnärztlich-parodontologischen Parametern gezeigt wurden, waren Träger des CG+GG-Genotyps signifikant häufiger von einer subgingivalen Besiedelung mit *E.corrodens*. (univariat: $p=0,037$; multivariat: $p= 0,024$) und CC-Genotypträger mit *P.micros* betroffen (univariat: $p= 0,047$; multivariat: $p=0,040$).
Beim rs3217992 wiesen Träger des G-Allels oder der Genotypen AG+GG signifikant höhere Werte für Sondierblutung (BOP) in der univariaten Auswertung auf (G-Allel: $p= 0,009$; AG+GG-Genotypen: $p=0,039$). Multivariat wurde nur das G-Allel als unabhängiger Risikofaktor bestätigt ($p=0,016$). Darüber hinaus waren AG-Genotypträger mit einer höheren prozentualen Besiedelung von *E.corrodens* assoziiert (univariat: $p= 0,009$; multivariat: $p=0,011$).
6. Systemisch erhöhte Level von Akute-Phase-Proteinen wie CRP und auch Veränderungen im Lipidstoffwechsel sind mit dem Auftreten von Parodontitis und KHK assoziiert und werden unter

anderem genetisch reguliert. In der vorliegenden Studie wiesen CC-Genotypträger des rs1333049 im Vergleich zu CG+GG-Trägern einen signifikant erhöhten CRP-Spiegel (univariat: $p=0,025$; multivariat: $p=0,038$) und einen signifikant erniedrigten HDL-Spiegel (univariat: $p=0,012$; multivariat: $p=0,020$) auf. Für den SNP rs3217992 wurden keine Assoziationen nachgewiesen.

7. Bereits bekannte Vorerkrankungen wie Schlaganfall/TIA, Diabetes mellitus, Myokardinfarkt, Periphere Verschlusskrankheit, Bluthochdruck, Dyslipoproteinämie und rheumatoide Arthritis, spielen in der Ätiologie von Parodontitiden und KHK eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Studie wurde für den ANRIL SNP rs1333049 keine Assoziation zu diesen Erkrankungen gezeigt. Nur Träger der Genotypen AA + GG des rs3217992 wiesen signifikant häufiger einen Schlaganfall in ihrer Anamnese auf (univariat & multivariat: $p=0,048$).

8. Im 3-Jahres Follow-Up trat bei 143 Patienten (= 16,1%) ein kardiovaskuläres Ereignis im Sinne des kombinierten Endpunktes ein. Hierbei hatten AA-Genotypträger des rs3217992 ein signifikant erhöhtes Risiko einen kombinierten Endpunkt (Tod durch Myokardinfarkt, Tod durch Schlaganfall, Myokardinfarkt, Schlaganfall/TIA) zu erleiden (Log-Rank Test: $p=0,035$). Neben bekannten Prognosefaktoren wie Alter, Geschlecht, BMI, Rauchen oder Diabetes wurde der AA-Genotyp multivariat als unabhängiger koronarer Prognosefaktor bestätigt ($p=0,014$; Hazard Ratio= 1,63; 95% Konfidenzintervall: 1,1-2,4). Der rs1333049 war kein Prognosefaktor für zukünftige Ereignisse.

9. Bei separater Betrachtung der einzelnen Endpunkte erwies sich der rs3217992 (A-Allel) als Prognosefaktor für das Erleiden eines Myokardinfarktes (Log-Rank Test: $p=0,026$). Unter Berücksichtigung weiterer Kovariablen wie Alter, Geschlecht, Rauchen, Diabetes und BMI wurde dies bestätigt ($p=0,030$; Hazard Ratio=1,740; 95% Konfidenzintervall: 1,054-2,872). Für weitere Endpunkte war das A-Allel des rs3217992 kein Prognosefaktor und auch zum rs1333049 konnte keine Assoziation gezeigt werden.

10. Der rs3217992 erwies sich in der vorliegenden Studie als parodontaler Risikofaktor mit prognostischer Relevanz für ein zukünftiges kardiovaskuläres Ereignis bei KHK-Patienten. In zukünftigen Studien sollten die gezeigten Assoziationen des rs3217992 zur Parodontitis und zum kombinierten Endpunkt repliziert werden. Werden die hier gezeigten Assoziationen bestätigt, dann könnte sich ein diagnostischer Nutzen für die Bestimmung des rs3217992 ergeben.

9 Anhang: Follow-Up Fragebogen

Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie

Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III

Nr.: Name: Geburtstag: Studieneinschluss:

1. Trat nach der ersten Befragung durch uns O NEIN O JA, am ____
amerstmalig oder erneut ein Herzinfarkt auf?

2. Trat nach der ersten Befragung durch uns O NEIN O JA, am ____
erstmalig oder erneut ein Schlaganfall auf?

3. Traten nach der ersten Befragung durch uns erstmalig O NEIN O JA, am ____
oder erneut Symptome eines Schlaganfalls (TIA) wie
halbseitige Lähmung, Sehstörungen, Sprachstörungen
auf die nicht länger als 24 Stunden anhielten?

Vielen Dank für Ihre Mitarbeit!

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Auenwald, den 12.06.2018

Linda Seitter

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre weiterhin, dass frühere Promotionsversuche mit der gleichen oder einer anderen Dissertation nicht erfolgt sind. Die vorliegende Arbeit wird erstmalig und nur an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg eingereicht.

Auenwald, den 12.06.2018

Linda Seitter

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Linda Seitter
Geburtsdatum: 24.04.1991
Geburtsort: Backnang
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Eltern: Hans Seitter
Heide Schauer-Seitter
Geschwister: Jens Seitter
E-Mail: lindaseitter@web.de

Schulbildung

1997-2001 Grundschule Lippoldweiler
2001-2010 Gymnasium Bildungszentrum Weissacher Tal

Hochschulausbildung:

10/2010-11/2016 Studium der Zahnmedizin an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
11/2016 Staatsexamen Zahnmedizin
12/2016 Approbation als Zahnärztin

Beruflicher Werdegang

03/2017-09/2017 Vorbereitungsassistentin in der Zahnarztpraxis
Dr. Thomas Nessler (Freiberg am Neckar)
Seit 03/2018 Vorbereitungsassistentin in der Zahnarztpraxis
Dr. Axel Volker Kühn (Backnang)

Hinweis auf erfolgte Teilnahme an einem wissenschaftlichen Wettbewerb

-1. Platz des 12. Symposium für Nachwuchswissenschaftler „Young Scientists in Dentistry“ am 03.06.2016 mit dem Thema „Polymorphismen im Gen der nicht-codierenden RNA ANRIL als parodontale und kardiovaskuläre Risikomarker (Longitudinale Kohortenstudie)“.

Danksagung

Mein herzlichster Dank geht an Frau PD Dr. rer. nat., rer. medic. habil. Susanne Schulz für die Überlassung des Themas, sowie der wertvollen Betreuung des statistischen und des molekulargenetischen Teils. Mit fortwährender, herausragend freundlicher Geduld waren ihre fachlichen Hinweise und Ratschläge eine wichtige Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn apl. Prof. Dr. med. dent. Stefan Reichert für die kritische und konstruktive Durchsicht des Manuskripts. Mit Hilfe seiner fachlichen Unterstützung gelang es auch bei schwierigen Fragestellungen Lösungen zu finden. Ich bedanke mich für die wohlwollende Förderung und die gute Zusammenarbeit.

An dieser Stelle möchte ich mich beim Direktor der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie Halle (Saale) Herrn Univ.-Prof. Dr. med. dent. Hans-Günter Schaller für die Möglichkeit der Promotion bedanken.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meinem Bruder Jens. Sie waren während der aufwendigen Erstellung meiner Dissertation immer eine moralische Unterstützung.