

**Aus der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie  
des Universitätsklinikums Halle (Saale)**  
(Direktor: Prof. Dr. med. dent. Hans-Günter Schaller)

**Assoziationen des -374T>A Polymorphismus (rs1800624) im Promotor des RAGE-Gens  
zum Schweregrad der Parodontitis und Inzidenz neuer kardiovaskulärer  
Ereignisse unter stationären Patienten mit koronarer Herzerkrankung**

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 Martin Kohnert  
geboren am 22.12.1988 in Nordhausen

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

Gutachter:

1. apl. Prof. Dr. med. dent. Stefan Reichert (Universität Halle-Wittenberg)
2. Prof. Dr. med. Thomas Hoffmann (Universität Dresden)
3. PD Dr. med. habil. Britt Hofmann, MSc (Universität Halle-Wittenberg)

17.07.2016

30.11.2016

**Meinen Eltern gewidmet**

## Referat

Koronare Herzerkrankung (KHK) und Parodontitis sind entzündlich bedingte Erkrankungen mit hoher Prävalenz und Inzidenz in der Bevölkerung der Industrienationen. Die Hauptursache der Parodontitis ist eine pathogene, in einem mikrobiellen Biofilm organisierte Plaque im subgingivalen Kompartiment. Das körpereigene Immunsystem führt neben der Erregerabwehr auch zum Abbau von Zahnhalteapparat und wird unter anderem durch genetische Risikofaktoren beeinflusst. Die KHK ist in den meisten Fällen Folge atherosklerotischer Gefäßveränderungen. Eine von genetischen Faktoren abhängige endotheliale Dysfunktion der arteriellen Zellwände führt zur zunehmenden Einengung des Gefäßlumens und einhergehender Minderperfusion des Myokards. Die Parodontitis selbst gilt als KHK-Risikofaktor. Ein für Parodontitis und KHK gemeinsamer genetischer Risikofaktor könnte der in der vorliegenden Arbeit untersuchte -374T>A Polymorphismus (rs1800624) im Promotor des RAGE-Gens sein. RAGE steht am Anfang einer weit reichenden Signalkaskade, die meist über NF- $\kappa$ B die Aktivierung von Genen des Immunsystems triggert.

Da der -374T>A Polymorphismus im RAGE-Gen indikativ für Parodontitis und KHK sein könnte, sollte als Hauptziel überprüft werden, ob der -374T>A Polymorphismus zur schweren Parodontitis unter Patienten mit KHK assoziiert ist. Weiterhin galt es zu untersuchen, ob innerhalb eines Jahres Follow-Up der -374T>A Polymorphismus oder eine schwere Parodontitis die adjustierte Hazard-Ratio für kardiovaskuläre Folgeereignisse (Myokardinfarkt, transitorisch ischämische Attacke, kardialer Tod) bei stationären KHK-Patienten beeinflussen.

Dazu wurden 1002 Probanden mit einer angiographisch festgestellten, mindestens 50%-igen Stenose einer dominanten Herzkranzarterie in die vorliegende Studie eingeschlossen, die in der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg stationär behandelt wurden. Die genomische Untersuchung erfolgte per Restriktions-Fragment-Längen-Analyse (RFLP). Die molekularbiologische Bestimmung von elf parodontopathogenen Bakterienpezies führte HAIN Lifescience, Nehren (Deutschland) durch. Der -374T>A Polymorphismus stellte sich als signifikant assoziiert zur schweren Parodontitis innerhalb der Querschnittsuntersuchungen dar. Für den TT-Genotyp wurde eine Odds-Ratio von 1,63 für die Ausbildung einer schweren Parodontitis ermittelt ( $p=0,001$ ). Innerhalb eines Jahres Follow-Up stellte sich weder der untersuchte -374T>A Polymorphismus noch eine schwere Parodontitis als signifikanter Risikoindikator für kardiovaskuläre Folgeereignisse dar. Tendenziell waren unter den Patienten, bei denen ein kardiovaskuläres Folgeereignis eingetreten ist, mehr TT-Träger (49,3% vs. 45,5%;  $p=0,545$  nach  $\chi^2$ -Test mit Yates-Korrektur).

Kohnert, Martin: Assoziationen des -374T>A Polymorphismus (rs1800624) im Promotor des RAGE-Gens zum Schweregrad der Parodontitis und Inzidenz neuer kardiovaskulärer Ereignisse unter stationären Patienten mit koronarer Herzerkrankung  
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2016

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b><u>Einleitung</u></b>	1
1.1	Einführung	
1.2	Parodontitis	2
1.2.1	Ätiologie und Pathogenese	3
1.2.2	Körpereigene Abwehrreaktion	6
1.2.3	Einfluss der Genetik	7
1.3	Koronare Herzerkrankung	9
1.3.1	Definition und Epidemiologie	9
1.3.2	Pathogenese	9
1.3.3	Risikofaktoren und Einfluss der Genetik auf KHK	10
1.4	Parodontitis als Risikofaktor für die KHK	11
1.4.1	Assoziationsstudien zwischen Parodontitis und KHK	11
1.4.2	Biologische Mechanismen für die Beziehung zwischen Parodontitis und KHK	13
1.4.3	Gemeinsame genetische Risikofaktoren	14
1.5	Der Rezeptor für <i>advanced glycation endproducts</i> (RAGE)	15
1.5.1	Nomenklatur und Vorkommen	15
1.5.2	Struktur	16
1.5.3	RAGE Liganden	17
1.5.4	Signaltransduktionsweg	18
1.5.5	RAGE-Gen und Gen-Polymorphismen	19
1.5.6	Einfluss von RAGE auf Parodontitis	20
1.5.7	Einfluss von RAGE auf Atherosklerose	21
<b>2.</b>	<b><u>Zielstellung</u></b>	22
<b>3.</b>	<b><u>Material und Methoden</u></b>	24
3.1	Studienkollektiv	24
3.1.1	Auswahl der Patienten	24
3.1.2	Ein- und Ausschlusskriterien	24
3.1.3	Erhebung der klinischen Daten	24
3.1.4	Erhebung der biochemischen Daten	25
3.1.5	Erhebung der Follow-Up-Daten	26
3.2	Genomische Untersuchungen	26
3.2.1	Blutentnahme und DNA-Isolation	26
3.2.2	DNA-Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	26

3.2.3	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) und Darstellung in der Agarose-Gelelektrophorese	28
3.3	Chemikalien für die genomische Untersuchung	30
3.4	Geräte	30
3.5	Mikrobiologische Diagnostik	31
3.6	Statistische Auswertungen	31
<b>4.</b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	<b>32</b>
4.1	Statistische Untersuchungen der Studienteilnehmer	32
4.1.1	Auswertung der demografischen Daten der Probanden in Abhängigkeit des parodontalen Befundes	32
4.1.2	Anamnestisch erhobene Vorerkrankungen in Assoziation zur parodontalen Diagnose	32
4.1.3	Mittelwerte biochemischer Parameter in Bezug zur parodontalen Erkrankung	33
4.1.4	Klinisch-parodontale Parameter in Abhängigkeit von der parodontalen Diagnose	34
4.1.5	Nachweis der DNA parodontopathogener Bakterien in subgingivalen Plaueproben in Bezug zur parodontalen Diagnose	35
4.2	Untersuchungen zum -374T>A Polymorphisms im Promotor des RAGE-Gens	35
4.2.1	Einfluss des -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens auf den Schweregrad der Parodontitis	35
4.2.2	Statistische Untersuchungen zur Beziehung des -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens zum Nachweis subgingivaler Bakterien	37
4.2.3	Statistische Untersuchungen zum Einfluss des -374-RAGE-Polymorphismus auf biochemische Parameter	38
4.2.4	Statistische Untersuchungen zum Einfluss des -374-RAGE-Polymorphismus auf anamnestisch bekannte Vorerkrankungen	39
4.3	Auswertungen der Follow-Up Ergebnisse	39
4.3.1	Assoziation der individuellen Genotyp/Allel-Konstellation zur Häufigkeit des kombinierten Endpunkts innerhalb eines Jahres Follow-Up	39
4.3.2	Univariate Überlebenszeitanalyse zur Inzidenz des kombinierten Endpunktes in Abhängigkeit von der individuellen Genotypkonstellation	41
4.3.3	Assoziation der Parodontitisiagnose zur Inzidenz des kombinierten Endpunkts	41

4.3.4	Univariate Überlebenszeitanalyse zur Auswertung des Eintretens des kombinierten Endpunktes in Abhängigkeit der Parodontitisdiagnose	42
4.3.5	Multivariate Überlebenszeitanalyse zur Berechnung der adjustierten Hazard-Ratio des RAGE-Polymorphismus -347T>A auf die Inzidenz des kombinierten Endpunktes	42
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	43
<b>5.</b>	<b><u>Diskussion</u></b>	44
5.1	Patientenauswahl und Probandenuntersuchungen	44
5.2	Auswertung der Querschnittsuntersuchungen in Bezug zur parodontalen Diagnose	45
5.2.1	Demografische Daten der Studienteilnehmer	45
5.2.2	Assoziation anamnestisch erhobener Vorerkrankungen zur parodontalen Diagnose	47
5.2.3	Biochemische Daten	48
5.2.4	Klinische Daten	48
5.2.5	Parodontopathogene Bakterien	49
5.3	Untersuchungen zum -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens in den Querschnittsuntersuchungen	50
5.3.1	Assoziation des -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens zur Parodontitis	50
5.3.2	Ergebnisse anderer Assoziationsmodelle des -374T>A Polymorphismus	51
5.3.3	Biologische Plausibilität der Assoziation des -374T>A SNP zur schweren Parodontitis	52
5.3.4	Assoziation des -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens zum Auftreten von <i>P. intermedia</i>	54
5.3.5	Assoziation des -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens zu biochemischen Parametern und anamnestisch bekannten Vorerkrankungen	54
5.4	Assoziation des untersuchten -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens zum Auftreten neuer kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten mit KHK	55
5.5	Risikofaktor Parodontitis für das Auftreten neuer kardiovaskulärer Folgeereignisse	56
5.6	Schlussfolgerung und Ausblick	57

<b>6.</b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	58
<b>7.</b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	60
<b>8.</b>	<b><u>Anhang</u></b>	78
<b>9.</b>	<b><u>Thesen</u></b>	79

**Lebenslauf**

**Eidesstattliche Erklärung**

**Hinweis auf erfolgte Teilnahme an einem wissenschaftlichen Wettbewerb**

**Danksagung**

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

<i>A. a.</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
<i>A. actinomyce-</i> <i>temcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Abb.	Abbildung
AGEs	“Advanced glycation endproducts”
AIDS	“Acquired immune deficiency syndrome”
Apo	Apolipoprotein
AS	Aminosäure
BMI	“Body mass index”
BOP	“Bleeding on probing” (Sondierblutung)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CABG	“coronary artery bypass graft“ (Bypass d. Koronararterien)
CAL	“clinical attachment loss” (klinischer Attachmentverlust)
CLR	C-Typ Lektin-Rezeptoren
CML-HSA	N-carboxymethyllysine human serum albumin
<i>C. rectus</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
CRP	C-reaktives Protein
DAMPs	“damage-associated molecular patterns”
DMF	“decayed-missing-filled”
DNA	“desoxyribonucleic acid” (Desoxyribonukleinsäure)
dnRAGE	dominant negativer Rezeptor für advanced glycation endproducts
<i>E. corrodens</i>	<i>Eikenella corrodens</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELAM-1	endotheliales Leukozyten-Adhäsionsmolekül-1
<i>E. nodatum</i>	<i>Eubacterium nodatum</i>
ERK1/2	“extracellular-signal-regulated kinases” (Extrazellulärsignal-regulierte Kinase)
esRAGE	“endogenously-secreted” Rezeptor für advanced glycation endproducts
fIRAGE	“full” (kompletter) Rezeptor für advanced glycation endproducts
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
g	Gramm
HbA1c	Hämoglobin A1c
HCL	Chlorwasserstoff
HDL	„high-density-lipoprotein“ (Lipoproteine mit hoher Dichte)
HMGB-1	“high-mobility-group-protein B1” (Amphoterin)



HR	Hazard-Ratio
HSP60	“heat-shock-protein 60” (Hitzeschockprotein 60)
ICAM-1	“intercellular adhesion molecule 1“ (interzelluläres Adhäsionsmolekül 1)
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig	Immunglobulin
I $\kappa$ B $\alpha$	Inhibitor-Molekül des Kernfaktors $\kappa$ B
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
JNK	Jun-N-terminal Kinase
Kap.	Kapitel
k	kilo-
Da	Dalton
KHK	Koronare Herzerkrankung
LDL	„low-density-lipoprotein“ (Lipoproteine mit geringer Dichte)
LMWH	“low molecular weight heparin“ (niedermolekulares Heparin)
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli-
$\mu$	mikro-
M	Mol
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MCP-1	Makrophagen-Chemoattraktorprotein 1
MG-HSA	methylglyoxal-modified human serum albumin
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MW	Mittelwert
NADPH	“nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat“
NF- $\kappa$ B	„nuclear factor $\kappa$ B“ (Kernfaktor $\kappa$ B)
ntRAGE	“n-truncated“ (ohne V-Domäne) Rezeptor für advanced glycation endproducts
OPG	Osteoprotegerin
OR	Odds-Ratio
PAMPs	“pathogen-associated molecular patterns“
PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	„polymerase chain reaktion“
PD	“probing depth“ (Sondiertiefe)
PGE2	Prostaglandin E2
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>

<i>P. micros</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
RAGE	Rezeptor für advanced glycation endproducts
RANK	Rezeptor-Aktivator des nukleären Faktors $\kappa$ B
RANKL	Ligand des Rezeptor-Aktivator des nukleären Faktors $\kappa$ B
re-PTCA	erneute perkutane transluminale Coronarangioplastie
RFLP	“restriction fragment length polymorphism” (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus)
rpm	“rounds per minute” (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
SD	“Standard deviation“ (Standardabweichung)
sRAGE	“soluble” (löslicher) Rezeptor für advanced glycation endproducts
SNP	„single nucleotide polymorphism“ (Polymorphismus)
spp.	“species pluralis“ (mehrere Arten)
SRP	“scaling and root planing” (Kürettage und Wurzelglättung)
STAT	“signal transducer and activator of transcription”
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
<i>T. denticola</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>T. forsythia</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
TGF- $\beta$ 1	“Transforming growth factor”
THP-1	Zelllinie einer akuten Monozytenleukämie
TIA	transitorisch ischämische Attacke
TIMP	MMP-Inhibitor 1
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
u.a.	unter anderem
V	Volt
VCAM-1	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1
vs.	versus

## 1. Einleitung

### 1.1 Einführung

Sowohl die Parodontitis als auch die koronare Herzerkrankung (KHK) gelten als inflammatorische, multifaktoriell bedingte Erkrankungen, die eine hohe Prävalenz in der Bevölkerung aufweisen.

Hauptursache der Parodontitis ist die Besiedlung der subgingivalen Zahnoberfläche durch pathogene Bakterien, die sich in einem Biofilm organisieren. Durch Aktivierung des körpereigenen Immunsystems kommt es neben der Erregerabwehr zum Abbau des Zahnhalteapparates. Dies kann über anschließende Zahnlockerung zum Zahnverlust führen. Genetische Einflüsse auf das Immunsystem stehen neben der Untersuchung des oralen Mikrobioms im Mittelpunkt der Forschung der Pathogenese der Parodontitis.

Hauptursache der KHK sind atherosklerotische Veränderungen der Herzkranzgefäße. Eine Atherosklerose entsteht durch eine endotheliale Dysfunktion mit Eindringen von *low density lipoprotein* (LDL) und Einwanderung von Makrophagen und T-Lymphozyten in subendotheliale Kompartimente. Die folgende Entzündungsreaktion und oxidative Veränderungen führen zur Bildung eines lipidreichen Kerns mit einer fibrinösen Kappe in der Gefäßwand. Dies kann zur chronischen oder akuten Einengung des Gefäßlumens führen. Das Immunsystem hat einen wesentlichen Einfluss auf die Entstehung der Atherosklerose und damit auch auf die KHK.

Seit der Identifikation des Rezeptors für *advanced glycation endproducts* (RAGE) 1992 erfolgten zahlreiche Untersuchungen zu seiner Funktionsweise und Auswirkungen auf den menschlichen Organismus. Dabei wurden viele Erkenntnisse über den Einfluss von RAGE auf physiologische und pathologische Vorgänge entdeckt. Dennoch bleiben bis heute wesentliche Aspekte seiner Expression und Funktion unbeantwortet. RAGE ist ein Rezeptor der Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie und ist involviert in zahlreiche Vorgänge der körpereigenen Immunabwehr. Er kann Liganden unterschiedlicher Strukturen binden und löst daraufhin verschiedene komplexe Signalkaskaden aus. Die dadurch aktivierten Transkriptionsfaktoren wirken im Zellkern auf die Expression von Zielgenen, die proinflammatorisch wirken können und mitunter entscheidend für die Funktion des Immunsystems sind.

Im Promotor des codierenden RAGE-Gens wurden Polymorphismen (so genannte *single nucleotide polymorphisms*, SNP) entdeckt, welche zu einer veränderten Genexpression führen. Dies äußert sich in der Beeinflussung der Anzahl der gebildeten RAGE-Rezeptoren. Mittlerweile wurden signifikante Zusammenhänge zwischen diesen SNPs und Diabetes mellitus, diabetischen Spätfolgen wie Neuropathie und Nephropathie, makrovaskulären Erkrankungen und chronischen Entzündungen entdeckt (Bierhaus et al., 2005). Dabei stellten

sich einige Polymorphismen als besonders relevant heraus. Einer davon ist der in dieser Studie untersuchte -374T>A SNP (rs1800624) im Promotor des RAGE-Gens. Dazu konnten bereits Assoziationen zum Auftreten des Diabetes mellitus (Aydogan et al., 2012; Kawai et al., 2013), eines Myokardinfarktes (Boiocchi et al., 2011) und des Lupus erythematoses (Martens et al., 2012) gefunden werden.

Bislang existiert eine Studie, die den Zusammenhang zwischen dem untersuchten -374T>A SNP im RAGE-Gen und dem Auftreten oder erhöhtem Schweregrad einer Parodontitis beschreibt. Dort konnte nachgewiesen werden, dass das T-Allel die adjustierte Odds-Ratio für eine aggressive Parodontitis erhöht (Stosberg et al., 2011).

Bisher gibt es keine eindeutigen Erkenntnisse, welche individuelle Allel-Konstellation des untersuchten Polymorphismus als krankheitsauslösend gilt. So prognostizieren Baragetti et al. 2013 einen protektiven Effekt des -374-T-Allels auf die Nierenfunktion und im Gegensatz dazu einen schützenden Effekt des A-Allels auf kardiovaskuläre Erkrankungen.

Aufgrund der Involvierung von RAGE in Prozesse des Immunsystems hatte die vorliegende Studie das Ziel zu untersuchen, ob eine Assoziation zwischen dem -374T>A SNP im Promotor des RAGE-Gens und dem Auftreten einer schweren Parodontitis unter stationären Patienten mit KHK besteht.

Da der -374T>A Polymorphismus im RAGE-Gen indikativ für eine Parodontitis und eine KHK sein könnte, sollte zudem überprüft werden, ob der -374T>A SNP und eine schwere Parodontitis die adjustierte Hazard-Ratio für kardiovaskuläre Folgeereignisse bei stationären Patienten mit KHK innerhalb eines Jahres Follow-Up beeinflussen. Dazu wurden folgende Endpunkte definiert und nach einem Jahr Beobachtungszeitraum evaluiert: Myokardinfarkt, Schlaganfall bzw. transitorisch ischämische Attacke (TIA) und kardialer Tod.

## **1.2 Parodontitis**

Parodontitis ist eine durch einen mikrobiellen Biofilm ausgelöste entzündliche Erkrankung multikausaler Genese. Die körpereigene Immunabwehr ist ab einem bestimmten Zeitpunkt nicht mehr in der Lage pathogene Mikroorganismen abzuwehren. Stattdessen verursacht die Immunabwehr durch Freisetzung von Entzündungsmediatoren und proteolytischen Enzymen einen Abbau von Zahnhalteapparat. Zusätzlich kann eine Verteilung der Erreger über die Blutbahn auch zu systemischen Einflüssen führen.

Als primärer ätiologischer Faktor gilt unumstritten die Kolonisation durch Bakterien, die sich in subgingivalen Bereichen akkumulieren. In den meisten Fällen ist das alleinige Vorhandensein pathogener Bakterien nicht ausreichend, um eine Parodontitis auszulösen (Taba jr. et al., 2012). Die Vermutung, dass das Risiko für Ausbildung und Progression einer chronischen Parodontitis bis zu 50% auf genetische Faktoren zurückzuführen ist (Laine et al., 2010), lässt

Forschergruppen vor allem nach Polymorphismen und epigenetischen Einflüssen in Genen des Immunsystems suchen (Gomez et al., 2009). Darüber hinaus werden auch zunächst hypothesefreie, genomweite Assoziationsstudien durchgeführt (Schäfer et al. 2010; Offenbacher et al., 2016).

Die Prävalenz der Parodontitis ist altersabhängig. Die häufigste Form, die chronische Parodontitis, beginnt um das 40. Lebensjahr. Daneben gibt es früher beginnende aggressive Formen. Jeder Parodontitis geht eine reversible Gingivitis voraus, die aber nicht zwangsläufig in eine Parodontitis übergehen muss. Eine über den physiologischen Attachmentverlust von 0,1mm pro Jahr (Loe et al., 1978) hinausgehende Destruktion des Desmodonts einschließlich des Alveolarknochens führt unbehandelt über eine zunehmende Zahnlockerung schließlich zum Zahnverlust.

### 1.2.1 Ätiologie und Pathogenese

Page und Kornman haben 1997 ein Ätiologie- und Pathogenesemodell der Parodontitis aufgestellt (Abb. 1). Neben dem unabdingbaren Faktor der bakteriellen Besiedlung wirken genetische, wie auch nichtgenetische Faktoren modulierend auf die Pathogenese der Parodontitis. Im Mittelpunkt steht die entzündliche Immunantwort, die den Metabolismus von Bindegewebe und Alveolarknochen derart beeinflusst, dass die Gewebshomöostase zwischen Gewebeaufbau und Gewebeabbau in Richtung Destruktion verschoben wird.

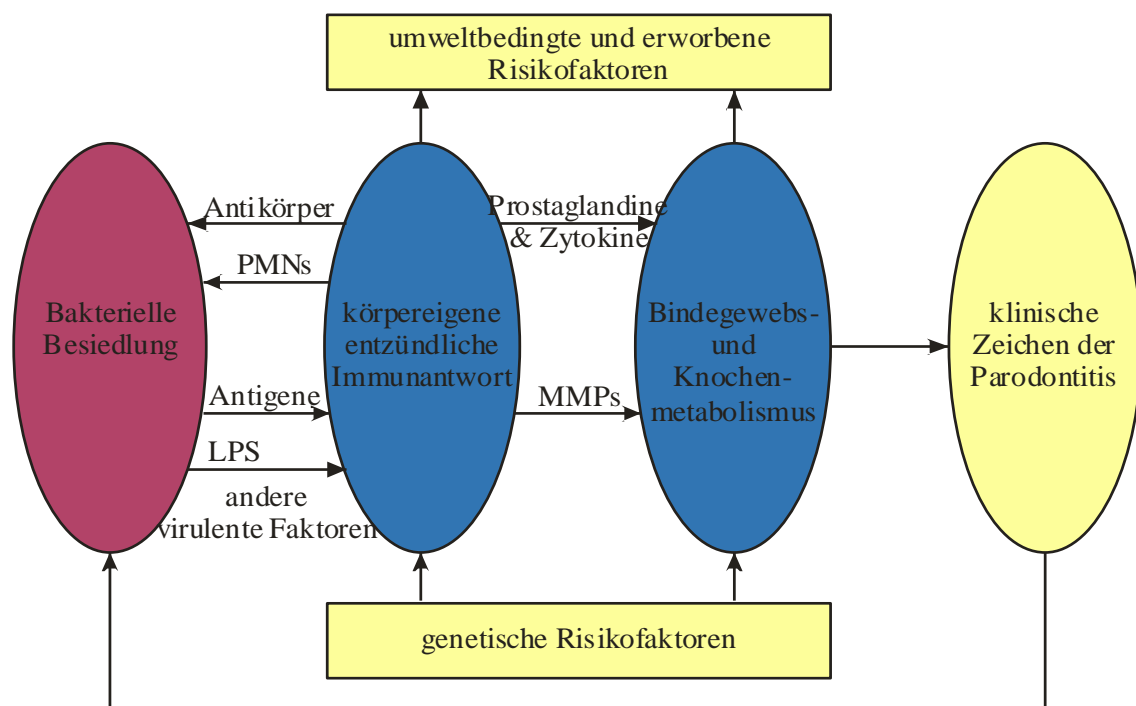


Abb. 1: Pathogenese der Parodontitis. PMNs: Polymorphkernige neutrophile Granulozyten; LPS: Lipopolysaccharide; MMPs: Matrixmetalloproteinasen. Adaptiert nach Page und Kornman, 1997.

## Bakterielle Besiedlung

Neuere Schätzungen über die orale bakterielle Besiedlung gehen von etwa 19.000 Phylotypen aus (Keijser et al., 2008), von denen jedoch nur ein Teil pathogen ist (Socransky und Haffajee, 1994). Ein Biofilm ist definiert als eine in einer Matrix eingebettete Kolonie aus verschiedensten Bakterienarten, die sich untereinander vernetzen. Befindet sich dieser Biofilm auf der Zahnoberfläche oder dem Schleimhautepithel, spricht man von einer Plaque (Whittaker et al., 1996).

Die Entstehung der Plaque beginnt mit der Bildung der Pellikelschicht wenige Sekunden nach Reinigung des Zahnes. Speichelproteine mit einer hohen Affinität für Hydroxylapatit haften durch Adhäsion auf der Zahnoberfläche. Darauf folgt eine weitere Dickenzunahme der Pellikel durch Protein-Protein-Bindungen. Die Pellikel mit ihren mehr als 100 verschiedenen Proteinen fungiert als Bindeglied zwischen Zahn und mikrobieller Besiedlung (Siqueira et al., 2012). Über Pellikelrezeptoren (saure, prolinreiche Proteine;  $\alpha$ -Amylase) haften bakterielle Erstbesiedler (*Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces viscosus*) auf dem entstandenen Schmelzoberhäutchen (Whittaker et al., 1996). Durch bakterielle Vermehrung entstehen Mikrokolonien. Bakterielle extrazelluläre Polysaccharide führen zu einer Stabilisierung und Vernetzung der Mikroorganismen untereinander. Insgesamt führt die Organisation in einem Biofilm zu besseren Ernährungs- und Wachstumsbedingungen der darin lebenden Organismen, erschwerter mechanischer Entfernbarekeit und geringerer Antibiotikapenetration. Während eines Reifevorganges können sich bestimmte Arten innerhalb des Biofilms etablieren. Dabei treten sukzessiv gram-negative Anaerobier in den Vordergrund, die in den sauerstoffarmen Regionen des immer tiefer werdenden Sulkus gute Lebensbedingungen finden.

Socransky et al. teilten die parodontopathogenen Bakterien in Gruppen ein. Ausgehend von Bakterien des blauen und gelben Komplexes entwickeln sich über den orangenen Komplex die besonders pathogenen Bakterien des roten Komplexes wie *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola*. Ein zweiter Weg führt über den grünen Komplex, wodurch es zur Etablierung des *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Serotyp *b* kommen kann (Socransky et al., 1998).

Die Taschenökologie hat einen wesentlichen Einfluss auf das Verhalten der kolonisierenden Mikroorganismen. So steigert die Abwesenheit von Sauerstoff die Leukotoxinfreisetzung von *A. actinomycetemcomitans* um das dreifache. Die Menge an verfügbarem Eisen bestimmt die Exprimierung bestimmter Membranproteine von *P. gingivalis* (Müller, 2012).

Die Produktion von bakteriellen proteolytischen Enzymen, vor allem Peptidasen, führt zum Abbau von Kollagen und Elastin parodontaler Strukturen (Socransky und Haffajee, 1994). Gram-positive Bakterien wie Streptokokken und Actinomyceten wirken vor allem durch die Zellwandkomponenten Lipoteichonsäure und Peptidoglykane virulent (Okumura und Nizet, 2014). Virulenzfaktoren wie das auf der Zelloberfläche gram-negativer Bakterien befindliche

Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) führen zur Freisetzung inflammatorischer Substanzen wie Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF $\alpha$ ) und Prostaglandine (besonders PGE<sub>2</sub>). Diese regen Fibroblasten und Makrophagen dazu an, MMPs und weitere Prostaglandine zu bilden (Page, 1991). Die Aktivierung des Abwehrsystems ist somit für einen Großteil der parodontalen Destruktion und die klinischen Symptome der Parodontitis verantwortlich (Preshaw, 2008).

### Risikofaktoren der Parodontitis

Wie Page 1997 aufzeigte, wird Parodontitis nicht nur von pathogener Plaque und genetischer Disposition beeinflusst.

Ein weiterer wichtiger Risikofaktor ist der Nikotinabusus. Dabei stehen histologische Gefäßveränderungen und eine veränderte zelluläre und humorale Immunabwehr im Vordergrund (Palmer et al., 2005).

Ein bedeutender Risikofaktor ist das Vorhandensein der Stoffwechselstörung Diabetes mellitus. Ein schlecht eingestellter Diabetes (sowohl Typ I als auch Typ II) ist oft verbunden mit einer erhöhten Prävalenz von Gingivitis und Parodontitis (Mealey und Oates, 2006). Gründe dafür sind in einer abgeschwächten Immunabwehr, einem veränderten Kollagenmetabolismus und im parodontalen Gewebe bestehenden Mikroangiopathien zu suchen (Albandar, 2002). Dies kann durch eine vermehrte Bildung von *advanced glycation endproducts* (AGEs) durch eine beim Diabetes mellitus bestehende Hyperglykämie verursacht sein. Binden diese an ihren Rezeptor (RAGE) auf Entzündungszellen, werden verstärkt Sauerstoffradikale, Zytokine und MMPs freigesetzt (Dukic-Stefanovic et al., 2003; Nah et al., 2007). AGEs können auch zur gesteigerten Vernetzung von Kollagen beitragen, was in einer geringeren Kollagen-Umsatzrate resultiert, wodurch der Umbau des parodontalen Gewebes erschwert wird (Zieman und Kass, 2004). Zusätzlich führen AGEs zur vermehrten Apoptose von Fibroblasten und Osteoblasten (Graves et al., 2007). Des Weiteren könnte in der vermehrten Freisetzung von Adipokinen bei Diabetes mellitus ein Pathomechanismus zu suchen sein. Adipokine wie Leptin, Adiponectin, Resistin und Visfatin regulieren unter anderem für die Pathogenese einer Parodontitis entscheidende Immunvorgänge. Dies betrifft beispielsweise die Stimulation endothelialer Zellen zur Produktion von Adhäsionsmolekülen, die Funktion von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNs) und Monozyten sowie die Produktion von Zytokinen durch T-Lymphozyten und Monozyten (Preshaw et al., 2007).

Weitere Risikofaktoren sind das männliche Geschlecht und die ethnische Zugehörigkeit. Dies kann u.a. durch genetische Unterschiede und andere Umweltbedingungen erklärt werden (Albandar, 2002). Darüber hinaus sind Osteoporose, Hyperparathyreoidismus und eingeschränkte Immunabwehr bei Krankheiten wie AIDS, Leukämie oder Agranulozytose Risikofaktoren für Ausbildung und Progression einer parodontalen Erkrankung.

Auch das psychische Wohlbefinden kann zur Progression der Parodontitis beitragen. Depressionen oder lang andauernder Stress können durch Unterbrechen eines komplexen Gleichgewichtes aus neuronalen Verknüpfungen und dem endokrinen System zu einer verminderten Immunantwort führen (Rozlog et al., 1999).

### **1.2.2 Körper eigene Abwehrreaktion**

Der Körper stellt sich den pathogenen Erregern mit drei Barrieren entgegen. Der mechanische Abwehrverbund wird durch ein dichtes verhorntes orales Gingivaepithel und einem sich ständig erneuernden nicht verhornten Saume epithel gebildet, wobei die alternden Zellen nach außen wandern und abgeschilfert werden. Zusätzlich besteht ein auswärts gerichteter Strom eines Sulkusfluids. Im Speichel befindliche antimikrobielle Stoffe wie Lysozym, Lactoferrin und das Immunglobulin A (IgA) bilden eine zweite, chemische Abwehrbarriere.

Die Entzündungsreaktion, als dritte Säule des Abwehrmechanismus, basiert auf Leistungen des unspezifischen und spezifischen Immunsystems. Ausgelöst durch körperfremde Stoffe der mikrobiellen Plaque wie z.B. LPS, Lipopeptide und bakterielle DNA (Mahanonda und Pichyangkul, 2007) erkennen Zellen des angeborenen Immunsystems über unspezifische Rezeptoren pathogene Strukturen der Mikroorganismen und unterscheiden so zwischen körpereigenen und körperfremden. Durch die Rekrutierung dieser Zellen kommt es bereits jetzt zur Phagozytose und außerdem zur Produktion proinflammatorischer und regulatorischer Zytokine (Teng, 2006). Weiterhin wird das Komplementsystem aktiviert, welches pathogene Strukturen opsoniert und Bakterienzellwände lysiert (Socransky und Haffajee, 1991).

Durch chemotaktische Locomotion und der ausgelösten Gefäßreaktion, gekennzeichnet durch Vasodilatation und erhöhter Gefäßpermeabilität, migrieren nun vermehrt PMNs und Makrophagen zum Entzündungsort und in den Sulkus. PMNs und Makrophagen bedienen sich dazu Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche, die den chemischen Gradienten der Zytokine detektieren und ihm folgen. Die Leukodiapedese wird über das interzelluläre Adhäsionsmolekül (ICAM-1) und das endotheliale Leukozyten-Adhäsionsmolekül (ELAM-1) vermittelt (Moughal et al., 1992). PMNs sezernieren u.a. Entzündungsmediatoren wie Leukotriene und Prostaglandine (z.B. PGE<sub>2</sub>, mitverantwortlich für Knochenresorption) und töten außerdem durch Ausschüttung (Degranulation) von antimikrobiellen Enzymen Bakterien ab.

Makrophagen setzen, u. a. über den *nuclear factor κB* (NF-κB) gesteuert, Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNFα frei. Außerdem sorgen sie über die Sezernierung von MMPs, die auch Zytokinvermittelt von gingivalen Fibroblasten, PMNs oder Endothelzellen ausgeschüttet werden, für einen proteolytischen Abbau von Kollagen und Fibronectin (Birkedal-Hansen, 1993). Dabei spielt das Gleichgewicht mit dem MMP-Gegenspieler TIMP eine wichtige Rolle (Verstappen und Von den Hoff, 2006). Zusätzlich ist der Knochenabbau ein entscheidender Bestandteil der Parodontitis (Garlet, 2010). Nach Aktivierung durch TNFα, IL-1 oder IL-6 sind der Rezeptor-



Activator des NF- $\kappa$ B (RANK), sein Ligand (RANKL) und sein Gegenspieler Osteoprotegerin (OPG) entscheidende Faktoren der Osteoklastenfunktion (Gillespie, 2007).

### **1.2.3 Einfluss der Genetik**

Zahlreiche Forschungsarbeiten zeigen einen wesentlichen Einfluss der Genetik auf die Pathogenese der Parodontitis. Die Immunabwehr dient nicht nur der Neutralisierung von gefährlichen Pathogenen, sondern auch der Auflockerung von Bindegewebsfasern, sodass es Makrophagen ermöglicht wird an den Ort der Entzündung vorzudringen. Weiterhin dient die Bildung tieferer parodontaler Taschen der Isolierung der infizierten Zahnoberfläche vom Körper. Das wirtseigene Immunsystem ist somit zum Teil selbst für die Progression der Parodontitis verantwortlich, sodass individuelle genetische Unterschiede die Schwere des Krankheitsverlaufes maßgeblich beeinflussen können.

Um den genetischen Faktor in der Pathogenese der Parodontitis abschätzen zu können, führte Michalowicz Anfang der 1990er Jahre eine Studie mit amerikanischen Zwillingen (Durchschnittsalter 40,3 Jahre) durch. Dabei verglich er Krankheitszeichen von homozygoten und dizygoten Zwillingspaaren untereinander. Monozygote Zwillingspaare wiesen hinsichtlich der gemessenen Werte (Sondiertiefe, Attachmentverlust und Plaqueindex (nach Silness und Loe, 1964)) ähnlichere Ergebnisse auf als dizygoten Zwillinge. Die führte er auf genetische Einflüsse zurück (Michalowicz et al., 1991). Heute geht man nach der Durchführung einer Meta-Analyse über genetische Einflüsse auf die chronische Parodontitis davon aus, dass die Genetik etwa 50% des Gesamtrisikos bedingt (Laine et al., 2010).

Aufgrund der scheinbaren Resistenz mancher Menschen vor einer schweren Parodontitis gehen Forscher sogar von der körpereigenen Immunantwort auf die mikrobielle Plaque als bestimmende Determinante in der Pathogenese der Parodontitis aus (Yoshie et al., 2007). Die individuellen Unterschiede beruhen auf genetischen Varianten proinflammatorischer Zytokine, im angeborenen und erworbenen Immunsystem sowie in Bindegewebsstrukturen (Kinane et al., 2005). Auch die Zusammensetzung des Biofilms könnte genetischen Einflüssen unterliegen. Durch genomweite Assoziationsstudien wurden außerdem Gene identifiziert, die den Glukose- und Fettstoffwechsel beeinflussen und im Zusammenhang mit Parodontitis und KHK stehen (Bochenek et al., 2013).

Polymorphismen können u.a. zu geringen und subtilen Veränderungen in der Expression von Genen führen, die sich letztendlich auf die Funktion des komplexen Zusammenspiels des Immunsystems modifizierend auswirken können. Es liegt also eine modulierende Rolle zahlreicher Gene vor. Viele dieser funktionellen Varianten treten in hoher Frequenz in der Bevölkerung auf.

Viel untersucht sind Polymorphismen in Genen die für IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  kodieren. Bei kaukasischen Nichtraucherern konnte eine Assoziation zwischen einem IL-1-Genotyp zur

Schwere der Parodontitis gefunden werden, wobei Genotyp-positive Probanden verstärkt unter einer schweren Parodontitis litten (Allel 2 des IL-1 $\alpha$ -889 Polymorphismus + Allel 2 des IL-1 $\beta$ +3953 Polymorphismus) (Kornman et al., 1997). Papapanou et al. stellten für zwei Genotypen (IL-1 $\alpha$ : +4845 und IL-1 $\beta$ : +3953) eine Assoziation zur Schwere des Attachmentverlustes her. Außerdem hatten Genotyp-positive Probanden geringere Immunglobulin-G-Werte (IgG) gegenüber ausgewählten Bakterien (Papapanou et al., 2001). Insgesamt waren bestimmte IL-1-Genotypen vermehrt mit chronischer Parodontitis bei Kaukasiern assoziiert (Yoshie et al., 2007).

Eine brasilianische Forschergruppe fand an Kaukasiern eine Assoziation des IL-6-174 SNP zu chronischer Parodontitis (Trevilatto et al., 2003), wogegen dies in einer tschechischen Studie nicht bestätigt werden konnte. Diese entdeckten dagegen einen möglicherweise protektiven Faktor des IL-6-572-G/C SNP für eine chronische Parodontitis (Holla et al., 2004). Eine indische Forschergruppe fand einen Zusammenhang zwischen dem IL-6-174-GG Genotyp und einem vermehrten Auftreten von *A. actinomycetemcomitans* und *Capnocytophaga sputigena*. Bei den weiteren überprüften parodontalen Leitkeimen konnten für die untersuchten IL-6-Polymorphismen -174, -572, -1363, -6106 und -1480 keine Unterschiede zwischen Gesunden und an Parodontitis erkrankten Probanden gefunden werden (Nibali et al., 2011).

Für TNF $\alpha$  existieren kontroverse Ergebnisse. In einer kleinen kaukasischen Probandengruppe war der -308G>A Polymorphismus zur Schwere einer Parodontitis assoziiert (Galbraith et al., 1999). In einer japanischen Studie wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen Polymorphismen (-1081/-863 und -857) im TNF $\alpha$ -Gen und chronischer Parodontitis beschrieben (Soga et al., 2003).

Weiterhin wurden Assoziationen zwischen Polymorphismen in Genen, die für Fc-Rezeptoren codieren und dem Schweregrad chronischer Parodontitis bei Kaukasiern gefunden (Meisel et al., 2001; Loos et al., 2003).

Darüberhinaus gibt es für IL-2, IL-10, TGF- $\beta$ 1 und IFN $\gamma$ -Polymorphismen signifikante Assoziationen zur Parodontitis bei kaukasischen Probanden (Yoshie et al., 2007).

Neben genetischen Einflüssen wird auch über einen eventuellen Einfluss der Epigenetik diskutiert. Epigenetische Veränderungen können über chemische Modifikationen der DNA wie Hyper- und Hypomethylierung sowie ihrer assoziierten Proteine eine Aktivierung oder Deaktivierung von Genen bewirken. In Bezug zur Parodontitis betrifft dies im besonderen Gene, die für Zytokine codieren (Gomez et al., 2009; Schulz et al., 2016).

Hinsichtlich des Einflusses genetischer Risikofaktoren besteht ein genereller Unterschied zwischen aggressiver und chronischer Parodontitis. Für einen hohen genetischen Anteil bei der aggressiven Parodontitis können ein früher Beginn der Erkrankung, wodurch Umwelteinflüsse wenig Wirkzeit haben, sowie eine familiäre Häufung sprechen. Außerdem ist die aggressive

Form gekennzeichnet durch einen rapiden Attachmentverlust bei oft nicht adäquater Plaqueansammlung. Auch das symmetrische Auftreten der parodontalen Defekte bei der lokalisierten Form (beidseitig mittlere Inzisivi und erste Molaren betroffen) kann auf einen genetischen Hintergrund hindeuten.

Langsamer Attachment- und Knochenverlust bei erhöhter Plaqueansammlung und Krankheitsbeginn im Erwachsenenalter sind Zeichen einer chronischen Parodontitis, bei der Umwelteinflüsse lange Zeit einwirken können. Jedoch werden auch hier genetische Hintergründe diskutiert, die vor allem auf Zwillingsstudien erwachsener Menschen basieren (Yoshie et al., 2007).

### **1.3 Koronare Herzerkrankung**

#### **1.3.1 Definition und Epidemiologie**

Die KHK, einschließlich des Myokardinfarktes als deren schwerste Komplikation, ist die führende Todesursache in den Industriestaaten. Dabei kommt es meist durch atherosklerotische Veränderungen der Herzkranzgefäße zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf im Herzmuskel. Die Hauptursache Atherosklerose ist eine Erkrankung, in der eine Reihe spezifischer zellulärer und molekularer Mechanismen involviert sind (Soga et al., 2003).

Weitere Ursachen der KHK können Koronarspasmen, Herzhypertrophie oder Tumoren mit folgender Gefäßeinengung oder eine Hypoxämie sein, die das Risiko für eine KHK besonders in Kombination mit der Atherosklerose steigern. Auch ein erhöhter Sauerstoffbedarf, wie zum Beispiel bei körperlicher Aktivität, kann bei Vorliegen einer entsprechenden Vorbelastung eine KHK bedingen.

In einer amerikanischen Untersuchung an Herzspendern ohne bekannte KHK mit einem durchschnittlichen Alter von 33 Jahren wurde eine Prävalenz atherosklerotischer Veränderungen von 17% bei Patienten unter 20 Jahren und 85% bei Probanden über 50 Jahren festgestellt. Insgesamt konnten bei 51,9% aller untersuchten Personen atherosklerotische Veränderungen festgestellt werden. Dabei wurde eine Intima-Dicke von 0,5mm als Grenze zwischen gesunden und atherosklerotisch veränderten Arealen definiert. Die durchschnittliche Dicke der Intima war bei Männern größer als bei Frauen (Tuzcu et al., 2001). Männer haben laut einer ebenfalls amerikanischen Studie einen im Durchschnitt 9% größeren Koronargefäßdurchmesser als Frauen ( $\pm 8\%$ ;  $p < 0,001$ ) (Dodge jr. et al., 1992).

#### **1.3.2 Pathogenese**

Der inflammatorische Prozess der Atherosklerose spielt die zentrale Rolle der KHK-Entstehung und ist gekennzeichnet durch eine endotheliale Dysfunktion, einhergehend mit einer

Akkumulation von Lipiden und fibrösen Stoffen in den arteriellen Zellwänden (Ross, 1999). Zellen des Immunsystems haben einen maßgeblichen Anteil an der Pathogenese, weshalb auch genetische Faktoren Einfluss haben können.

Das Endothel stellt eine selektive permeable Barriere zwischen Blut und Gewebe dar. An einer Kurve oder Verzweigung eines Gefäßes fließt das Blut nicht mehr laminar. Diese gestörte Strömung führt zu Scherkräften, denen eine Schlüsselrolle in morphologischen Gefäßveränderungen nachgesagt wird (Tardy et al., 1997). Dadurch kommt es zu einer gesteigerten Durchlässigkeit für Lipoproteine (besonders LDL) (Lusis, 2000). Unter anderem durch oxidativ veränderte Lipoproteine werden über NF- $\kappa$ B Zelladhäsionsmoleküle (z.B. *vascular cell adhesion moleküle* (VCAM-1)) exprimiert, was zu einer Einwanderung von Monozyten und T-Lymphozyten in die Gefäßintima führt. Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  unterstützen diesen Vorgang. Die Monozyten differenzieren sich zu Makrophagen und nehmen über Scavenger-Rezeptoren oxidierte Lipoproteine auf (Yla-Herttuala et al., 1996), die als Cholesterinester gespeichert werden. Anfänglich ist dieser Vorgang ein Schutzeffekt des Immunsystems um zytotoxische und proinflammatorische oxidativ veränderte Lipoproteine zu eliminieren (Glass und Witztum, 2001). Die im weiteren Verlauf entstehenden „Schaumzellen“ führen durch deren Anhäufung zu so genannten *fatty streaks* (Libby, 2006).

Der weitere Prozess der Entstehung einer atherosklerotischen Plaque ist gekennzeichnet durch die Aktivierung von T-Lymphozyten und das Einwandern von glatten Muskelzellen in die Intima oder den subendothelialen Raum (Ross, 1999; Glass und Witztum, 2001).

Durch weitere Makrophagenakkumulation und deren Nekrose entstehen Ansammlungen extrazellulärer Lipide, so genannte „gruels“. Von Makrophagen und T-Zellen exprimierte Zytokine und Wachstumsfaktoren sorgen für die Produktion extrazellulärer Matrix durch glatte Muskelzellen (Lusis, 2000). Darüber hinaus konnten verschiedene von Makrophagen sezernierte MMPs detektiert werden, die zur Degradation von Extrazellulärmatrix führen (Galis et al., 1994). Durch langandauernde, chronische Progredienz entsteht ein lipidreicher Kern, der von einer fibrösen Kappe bedeckt ist.

Neben der Möglichkeit der Einengung des Gefäßes besteht die Gefahr der akuten Verlegung des Kanallumens. Durch MMPs wird die immer dünner werdende fibröse Kappe destabilisiert, sodass es folgend zur Ruptur kommen kann (Libby, 2006). Der Kontakt des exponierten Fibrins zu Gerinnungskomponenten des Blutes führt zur Initiation der Koagulation, zur Rekrutierung von Blutplättchen und letztlich zur Entstehung eines Thrombus (Glass und Witztum, 2001).

### **1.3.3 Risikofaktoren und Einfluss der Genetik auf KHK**

Wie Parodontitis ist auch die KHK eine multifaktorielle Erkrankung. Verschiedene Risikofaktoren steigern die Anfälligkeit für die Ausbildung einer Atherosklerose und damit die

Gefahr, eine KHK zu entwickeln. Zu den unabhängigen Hauptrisikofaktoren zählen Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, erhöhte Serum-Cholesterinwerte (einschließlich LDL), erniedrigte Serum-HDL-Werte („high-density-lipoprotein“), Diabetes mellitus, das männliche Geschlecht und ein fortgeschrittenes Alter. Weitere Risikofaktoren sind Adipositas, Bewegungsmangel, eine positive Familienanamnese, psychische Faktoren und einige andere biochemische Faktoren (Grundy et al., 1999).

Traditionelle Risiken wie Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Hypertonie oder Dyslipoproteinämien können jedoch nur etwa zwei Drittel aller KHK-Events erklären (Wang et al., 2012a). Daher ist von einem großen Einfluss genetischer Komponenten auszugehen. Dieser wird ähnlich wie bei einer Parodontitis auf bis zu 50% geschätzt (Roberts, 2008). In Experimenten an Mäusen wurden über 100 potentielle Gene identifiziert, die die Ausbildung einer Atherosklerose bedingen können. Diese genetischen Faktoren üben einen Einfluss auf Zellen des Gefäß- und Immunsystems sowie auf Zellen des Blutes aus (Lusis et al., 2004).

Eine Studie hat dargestellt, dass das elterliche Auftreten einer KHK ein Prädiktor für ein zukünftiges Event bei Erwachsenen im mittleren Alter ist (Lloyd-Jones et al., 2004). Eine schwedische Studie an Zwillingen hat den Einfluss genetischer Komponenten sowohl bei Männern als auch bei Frauen gezeigt. So hat ein männlicher, monozygoter Zwilling ein 8,1-fach erhöhtes Risiko an einer KHK zu versterben, wenn dies seinem Zwillingsbruder bis zu einem Alter von 55 Jahren widerfahren ist. Bei dizygoten Zwillingen war das Risiko 3,8-fach. Bei Frauen wurden ähnliche Ergebnisse festgestellt. Starb ein monozygoter Zwilling vor 65 Lebensjahren an einer KHK, hatte der noch lebende Zwilling ein 15-faches Risiko ebenfalls an einer KHK zu sterben. Bei dizygoten Schwestern zeigte sich ein 2,6-fach erhöhtes Risiko (Marenberg et al., 1994).

Genomweite Assoziationsstudien fanden 33 genetische Varianten, die das Risiko für eine KHK erhöhen. 23 Varianten wirken über bisher unbekannte Mechanismen und nur zehn sind mit Hypertonie oder Lipidregulation assoziiert (Roberts et al., 2012). Während nur ein kleiner Teil dieser Genvarianten in codierenden Bereichen liegen, befindet sich der größte Teil in nicht transkribierten Bezirken, was auf multiple Signalwege mit variablen Effekten schließen lässt. Bekannte Assoziationen existieren zu Genen die für LDL, HDL, Triglyceriden, Endothelfunktion und –Regeneration, IFN $\gamma$  und IL-6 kodieren (McPherson, 2013).

## **1.4 Parodontitis als Risikofaktor für KHK**

### **1.4.1 Assoziationsstudien zwischen Parodontitis und KHK**

Sowohl Parodontitis als auch kardiovaskuläre Erkrankungen, zu denen die KHK zählt, stellen multifaktorielle, entzündliche Erkrankungen dar. Dies legt nahe, dass es zwischen Ätiologie und Pathogenese beider Erkrankungen Gemeinsamkeiten gibt. So geriet die orale Gesundheit bei der

Ursachensuche der KHK in den letzten Jahrzehnten immer mehr in den Fokus des Interesses. In Bezug auf orale Erkrankungen stellte sich besonders die Parodontitis als einflussreicher Faktor für die Entwicklung weiterer chronisch-entzündlicher Erkrankungen dar. Das relative Risiko für die Entwicklung einer KHK bei Vorliegen einer Parodontitis wird in einer Meta-Analyse mit 1,24 (95%-Konfidenzintervall 1,01-1,51) bis 1,34 (95%-Konfidenzintervall 1,01-1,51) angegeben (Humphrey et al., 2008). Zahlreiche Analysen bestätigten den beschriebenen Zusammenhang. Aufgrund der Multifaktorialität beider Erkrankungen ist davon auszugehen, dass die Assoziation nicht auf einem einzigen biologischen Mechanismus basiert, sondern verschiedene Zusammenhänge eine Rolle spielen.

Erste Assoziationen konnten finnische Forscher 1989 herstellen. In einer Fall-Kontroll-Studie wurden 100 Patienten mit akutem Myokardinfarkt und 102 zufällig ausgewählte Kontrollprobanden untersucht. Dabei stellte sich der Mundgesundheitszustand (Index erstellt aus Parodontitis, Karies, apikalen und perikoronaren Läsionen) als signifikant schlechter bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt dar. Dieser Zusammenhang war auch nach Adjustierung für Alter, sozioökonomischem Status, Nikotinabusus, Serumlipidkonzentration und Diabetes mellitus signifikant (Mattila et al., 1989).

Eine amerikanische Studie untersuchte 9760 Frauen und Männer zwischen 25 und 74 Jahren in der Zeit von 1971 bis 1987 und stellte ein um 25% erhöhtes Risiko für eine KHK bei gleichzeitigem Vorhandensein einer Parodontitis fest. Das bestätigte sich auch nach Adjustierung für 13 bekannte Risikofaktoren der KHK (DeStefano et al., 1993).

In einer Longitudinalstudie wurde festgestellt, dass Probanden mit erhöhter Sondiertiefe (>3mm) im Gegensatz zu parodontal gesunden Studienteilnehmern ein um 3,1-fach höhere adjustiertes Hazard-Ratio besaßen, eine KHK zu entwickeln. Dazu wurden in den Jahren 1968 bis 1971 1.147 männliche Probanden untersucht (Beck et al., 1996).

2003 konnte in einer Meta-Analyse ein um 19% erhöhtes Risiko für eine kardiovaskuläre Erkrankung bei Patienten mit Parodontitis festgestellt werden. Dieser Zusammenhang wurde noch deutlicher bei alleiniger Betrachtung der Probanden unter 65 Jahren (Janket et al., 2003).

Weiterhin fand eine Forschergruppe um Dietrich eine von der Schwere der Parodontitis abhängige Inzidenz einer KHK bei Männern jünger als 60 Jahren (Dietrich et al., 2008).

Auch ein Zusammenhang zwischen schlechter Mundhygiene und einem erhöhten Risiko einer KHK konnte gezeigt werden. Dazu wurden 11.869 Männer und Frauen mit einem Durchschnittsalter von 50 Jahren in Schottland untersucht (Oliveira et al., 2010).

2014 wurde in einer Studie mit 8.124 Japanern zwischen 30 und 75 Lebensjahren eine signifikante Beziehung zwischen entzündlich bedingtem Zahnverlust und der arteriellen Steifigkeit (als Indikativ der Atherosklerose) präsentiert (Asai et al., 2014).

#### **1.4.2 Biologische Mechanismen für die Beziehung zwischen Parodontitis und KHK**

Bisher ist kein direkter, ursächlicher Zusammenhang zwischen Parodontitis und KHK bekannt und somit ist bisher nicht eindeutig anerkannt, ob die Beziehung kausaler oder nichtkausaler Natur ist. Mögliche Schnittpunkte werden zahlreich diskutiert und basieren zum einen auf dem erhöhten Level der systemischen Entzündung und zum anderen auf einer massiv erhöhten Bakterienlast bei Patienten mit Parodontitis (Friedewald et al., 2009).

Ein für die Parodontitis anerkannter Entzündungsmarker ist das C-reaktive Protein (CRP). In einer Meta-Analyse konnten erhöhte CRP-Werte bei Vorhandensein einer Parodontitis im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden (Paraskevas et al., 2008). Diese erhöhten CRP-Werte sind assoziiert mit einer höheren Inzidenz akuter thrombotischer Ereignisse einschließlich Myokardinfarkt und Schlaganfall. Zudem wurde eine erhöhte chronische Koagulierungsneigung bei gesunden Probanden mit höherem Langzeitrisiko für eine KHK festgestellt (Ridker et al., 2002; Blake und Ridker, 2002). Die Erklärung dafür könnte eine CRP-getriggerte Komplementaktivierung und die darauf folgende verstärkte Fibrinogen-Verklumpung sein (Genco et al., 2002). Weiterhin ist festzustellen, dass die Behandlung von moderaten und schweren Parodontitiden zur Verringerung der systemischen Entzündungsmediatoren führt (Seinost et al., 2005; Koppolu et al., 2013).

Die Assoziation zwischen Parodontitis und kardiovaskulären Erkrankungen könnte aber auch über parodontopathogene Mikroorganismen und deren Bestandteile erklärt werden. In einer Tasche um einen unbehandelten, an Parodontitis erkrankten Zahn wurden  $10^8$  bis  $10^{12}$  gram-negative Bakterien gefunden, die dort in direkter Nachbarschaft zum gingivalen Gewebe standen (Friedewald et al., 2009). Es wurde gezeigt, dass bakterielle Endotoxine aus dem parodontalen Kompartiment in den Blutstrom übergehen und damit zu atherosklerotischen Veränderungen beitragen können. Diese Ausschwemmung von bakteriellen Stoffwechselprodukten tritt bereits bei mäßigem Kauen auf und ist von der Schwere einer Parodontitis abhängig (Geerts et al., 2002). In atherosklerotischen Plaques wiederum ist DNA parodontalpathogener Bakterien wie *P. intermedia* nachweisbar (Fiehn et al., 2005). In einer Studie an zwölf Patienten mit chronischer Parodontitis und Obliteration der Bifurkation der Arteria carotis oder einer Arterie der unteren Gliedmaßen gelang ein Nachweis vitaler Bakterien in atherosklerotischer Plaque. In einem Kulturverfahren konnte bei zwei Patienten der parodontopathogene *A. actinomycetemcomitans* nicht nur aus dem parodontalen Kompartiment angezüchtet werden, sondern es war auch möglich, dieses Bakterium aus der atherosklerotischen Plaque zu kultivieren (Padilla et al., 2006). In einem In-vitro-Modell konnte gezeigt werden, dass Makrophagen in Anwesenheit von LDL *P. gingivalis* aufnehmen und dies die Bildung von Schaumzellen verstärkt. Damit hat der als parodontopathogen geltende *P. gingivalis* ein atherogenes Potential und spielt möglicherweise eine Rolle in der Entwicklung der Atherosklerose (Giacona et al., 2004). Weiterhin kann es durch Mikroorganismen aus

dentaler Plaque zur Aktivierung des Blutgerinnungssystems kommen, wodurch ein weiterer Zusammenhang zu kardiovaskulären Erkrankungen gegeben sein könnte (Herzberg und Weyer, 1998; Imamura et al., 2003).

Auch Autoimmunreaktionen können eine Atherosklerose fördern. Im Rahmen einer Kreuzreaktivität greifen Antikörper, die eigentlich gegen bakterielle Lipopolysaccharide gerichtet sind, auch körpereigene endotheliale Komponenten an und verstärken somit den atherosklerotischen Prozess (Jeftha und Holmes, 2013). Diese Epitopgemeinschaft besteht beispielsweise zwischen dem bakteriellen Chaperonin GroEL und dem funktionell homologen humanen Hitzeschockprotein 60 (HSP60) (Ford et al., 2006).

Darüber hinaus stellen gemeinsame Risikofaktoren einen indirekten Zusammenhang zwischen Parodontitis und kardiovaskulären Erkrankungen dar. Von großer Bedeutung ist neben gemeinsamen genetischen Faktoren der Nikotinabusus, wodurch es vor allem zu histologischen Gefäßveränderungen und einer veränderten zellulären und humoralen Immunabwehr kommt (Palmer et al., 2005). Weiterhin können Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Dyslipoproteinämie und Adipositas als gemeinsame Risikofaktoren ein mögliches Bindeglied zwischen den beiden Erkrankungen darstellen. Zusätzlich können auch Depressionen, physische Inaktivität, das Alter und das männliche Geschlecht als Risikofaktoren von Bedeutung sein (Friedewald et al., 2009).

#### **1.4.3 Gemeinsame genetische Risikofaktoren**

Neben den oben genannten gemeinsamen Risikofaktoren könnten auch genetische Faktoren einen Einfluss sowohl auf die Parodontitis als auch auf die KHK darstellen. Ein schwieriger Umstand in der Ursachensuche von Krankheiten multikausaler Genese ist, dass ein genetischer Faktor nicht allein, wohl aber im Zusammenspiel, also in einer Gen-zu-Gen oder in einer Gen-zu-Umwelt-Interaktion, zur Entstehung solcher Erkrankungen führen kann.

Von besonderem Interesse sind dabei Gene, die in Beziehung zum Immunsystem stehen. Der in dieser Arbeit untersuchte Rezeptor für *advanced glycation endproducts* könnte dabei ein Stellglied für die Entwicklung beider Erkrankungen sein. Dabei existieren bereits Untersuchungen zum Einfluss des -374T>A SNP im RAGE-Gen auf die Atherosklerose (siehe Kapitel 1.5.7). In einer Fallkontrollstudie konnte das T-Allel des untersuchten Polymorphismus als möglicher Risikofaktor für die Entwicklung einer aggressiven Parodontitis identifiziert werden (Stosberg et al., 2011).

Auch dem in der parodontalen Sulkusflüssigkeit vorkommenden TNF $\alpha$  wird eine Einflussnahme zugeschrieben. Dort stimuliert TNF $\alpha$  nicht nur die Produktion weiterer inflammatorisch wirksamer Zytokine wie IL-1 $\beta$  und IL-6, sondern fördert auch die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen (Garlet, 2010). Dies triggert die Migration weiterer immunkompetenter Zellen, wodurch ein Einfluss sowohl auf die Parodontitis als auch auf die



Atherosklerose gegeben sein könnte. Weiterhin kann TNF $\alpha$  die Aktivierung von MMP's induzieren, die sowohl eine Rolle im Abbau parodontaler Strukturen wie auch in der Degradation von Gefäßwandbestandteilen spielen (Sato und Seiki, 1993; Galis et al., 1994).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Evidenz für die Existenz gemeinsamer genetischer Risikofaktoren für Parodontitis und KHK noch gering ist.

## **1.5 Der Rezeptor für *advanced glycation endproducts***

### **1.5.1 Nomenklatur und Vorkommen**

Der zur Superfamilie der Immunglobuline gehörende Rezeptor für *advanced glycation endproducts* (AGEs) kommt in zahlreichen Zelltypen des menschlichen Körpers vor. Neben Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Skelettmuskelzellen und Neuronen, liegt RAGE auch an der Oberfläche von T-Lymphozyten (Imani et al., 1993) und mononukleären Phagozyten vor (Brett et al., 1993; Schmidt et al., 2001; Sorci et al., 2004). Abbass und Kollegen stellten bei männlichen, afrikanischen Nichtraucher fest, dass sich RAGE besonders häufig in gingivalen Zellen von Diabetikern, gefolgt von Patienten mit schwerer Parodontitis befindet (Abbass et al., 2012). In einer anderen Studie konnte immunhistochemisch kein Unterschied des RAGE-Vorkommens zwischen entzündeter Gingiva von Typ-II-Diabetikern und Nichtdiabetikern gefunden werden. Nach Durchführung einer PCR („*polymerase chain reaktion*“) konnte dagegen jedoch eine um 50% höhere RAGE-Konzentration in der Diabetikergruppe gezeigt werden (Katz et al., 2005).

RAGE, oder auch AGER genannt, verdankt seinen Namen den ersten bekannten Liganden, den AGEs. AGEs kommen typischerweise im Blutplasma von Diabetikern, in alternden Gefäßwänden (Neeper et al., 1992), bei Nierenversagen und in Fällen von Entzündungen (Bucciarelli et al., 2002) in erhöhtem Maße vor. Weiterhin wird ihnen eine Rolle bei Alzheimer nachgesagt. Ursprünglich umfasste der Begriff AGE Stoffe mit einer gelb-braun fluoreszierenden Farbe und der Fähigkeit, sich untereinander zu vernetzen (Vlassara et al., 1984). Mittlerweile wird unter AGEs ein breites Spektrum an fortgeschrittenen Endprodukten des Glykierungsprozesses (so genannte Maillard-Reaktion) verstanden. Bei dieser nicht-enzymatischen, zeitabhängigen, chemischen Reaktion reagieren Zuckermoleküle mit Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren (Takeuchi und Makita, 2001; Bierhaus et al., 2005). Während die Reaktion früher Endprodukte noch reversibel ist, ist die Bildung von AGEs praktisch nicht umkehrbar (Schmidt et al., 1999).

RAGE wird eine besondere Rolle im Rahmen von verschiedenen chronischen Erkrankungen und Entzündungen beigemessen. In Tiermodellen konnte jedoch gezeigt werden, dass RAGE auch bei gesunden Tieren in einem niedrigen Maß auf Zelloberflächen exprimiert wird. Bei Auftreten pathologischer Prozesse steigt die Expressionsrate von RAGE an und kann über

mehrere Jahre anhalten. Während andere Teile des Immunsystems einer negativen Rückkopplung unterworfen sind, welche die zelluläre Aktivierung begrenzt, existiert bei RAGE im Falle einer Aktivierung eine positive Rückkopplung, die in einem *circulus vitiosus* endet. So konnte gezeigt werden, dass die Bindung von AGEs oder Amyloid- $\beta$  an RAGE zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt (Schmidt et al., 1999). NF- $\kappa$ B wiederum induziert im Zellkern die Expression von über 200 verschiedenen Zielgenen, welche u. a. für RAGE selbst codieren (Bierhaus et al., 2005). Weiterhin kann die Aktivierung von RAGE zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen führen, welche die Sauerstoff-sensitive Produktion von NF- $\kappa$ B auslösen kann (Dou et al., 2012). Veränderungen im Promotor des RAGE-Gens, wie der in dieser Studie untersuchte -374T>A Polymorphismus, könnten somit durch Änderung der Quantität der Expression des untersuchten Rezeptors über die veränderte Bildung von NF- $\kappa$ B Störungen im Gleichgewicht des sensiblen Immunsystems und der Gewebshomöostase bewirken. Dies könnte unter anderem durch die NF- $\kappa$ B-abhängige Aktivierung von TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, von Matrixmetalloproteinasen (Nah et al., 2007) und der Osteoklastenaktivität (Leibbrandt und Penninger, 2008) erklärt werden.

### 1.5.2 Struktur

RAGE ist ein transmembranärer Multiliganden-Rezeptor, bei dem es sich um ein 35kDa großes Polypeptid mit einer terminalen NH<sub>2</sub>-Gruppe handelt (Schmidt et al., 1992). RAGE besteht aus einer 332 Aminosäuren (AS) langen extrazellulären Region, einer hydrophoben 19AS-Transmembrandomäne und einer kurzen zytosolischen Domäne (43AS). Die extrazelluläre Region ist unterteilbar in eine V- sowie zwei C-Domänen (C1 und C2). Die V-Domäne weist zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen auf, welche mit für die Bindung von Liganden verantwortlich sind (Neeper et al., 1992; Srikrishna et al., 2002). Während diese Ligandenbindung extrazellulär stattfindet, sorgt die intrazelluläre Domäne für die Weitergabe des Signals. Allerdings besitzt diese Domäne keine bisher bekannten Phosphorylierungsstellen, G-Protein-Bindungsstellen oder Kinase-Bindungsstellen. Dennoch ist sie essentiell für den intrazellulären Signalweg notwendig (Ding und Keller, 2005a).

Entgegen älteren Untersuchungen geht man heute davon aus, dass V- und C1-Domäne funktionell miteinander verbunden sind, während die C2-Domäne separat über einen flexiblen Linker an die V-C1-Untereinheit gebunden ist. Die Interaktion zwischen RAGE und seinen Liganden kann sowohl über die V/C1-Domäne, als auch über die C1/C2-Domäne erfolgen (Dattilo et al., 2007; Leclerc et al., 2007).

Neben der beschriebenen full-RAGE-Variante (fRAGE) existieren noch weitere Unterformen. Der löslichen Form *soluble* RAGE (sRAGE) fehlt die transmembranäre und cytosolische Domäne durch proteolytisches Schneiden nach Einbau in die Zellmembran. Das ebenfalls nicht

membranständige *endogenously-secreted* RAGE (esRAGE) entsteht durch alternatives Spleißen. Allerdings kann zirkulierendes sRAGE oder esRAGE Liganden binden und so die Aktivierung des membranständigen RAGE verhindern (Malherbe et al., 1999; Ding und Keller, 2005a; Falcone et al., 2005). Die dominant negative Form (dnRAGE) ist bis auf das Fehlen der intrazellulären Domäne identisch zum flRAGE. Damit fehlt dieser Isoform die Möglichkeit Signale in das Innere der Zelle zu leiten. Im Gegensatz dazu fehlt dem n-truncated RAGE (ntRAGE) die V-Domäne, wodurch es dieser Variante wahrscheinlich nicht möglich ist, Liganden zu binden. Dennoch wurde ein schwaches, nach intrazellulär geleitetes Signal festgestellt, was auf einen weiteren Signalweg deutet (Yonekura et al., 2003). Zusätzlich wurden weitere Unterformen im menschlichen Gehirn festgestellt, die sowohl auf Herausschneiden von Exons als auch auf dem Belassen von Introns basieren. Dies betrifft flRAGE, sRAGE und dnRAGE (Ding und Keller, 2005a). Im weiteren Verlauf der Arbeit wird die membranständige Form flRAGE als RAGE bezeichnet (Abb. 2).

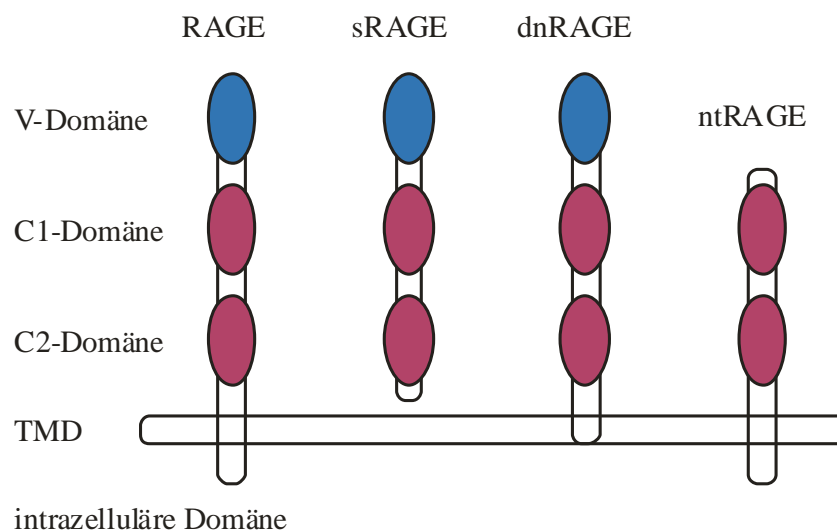


Abb. 2: Schematische Darstellung der vier RAGE-Isoformen RAGE (entspricht flRAGE), sRAGE, dnRAGE und ntRAGE (adaptiert nach Tan et al., 2007). TMD: transmembranäre Domäne.

### 1.5.3 RAGE Liganden

Die namensgebenden Liganden AGEs bilden eine sehr heterogene Gruppe. Sie entstehen hauptsächlich im hyperglykämischen Milieu, aber auch bei oxidativem Stress und unter Einfluss von Inflammation, der bei Parodontitis und KHK gegeben ist (Del Turco und Basta, 2012). Da die involvierten chemischen Reaktionen durch hohe Komplexität und Heterogenität gekennzeichnet sind, konnten bislang nur wenige AGEs charakterisiert werden. Dazu gehören unter anderem *N-carboxymethyllysine human serum albumin* (CML-HSA), *methylglyoxal-modified human serum albumin* (MG-HSA), Pentosidine und Pyrraline. Je nach

Entstehungsweg können sie in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt werden (AGE 1 – 5) (Takeuchi und Makita, 2001; Grossin et al., 2009).

An den Multiligandenrezeptor RAGE binden neben AGEs noch diverse andere, strukturell verschiedene Liganden. Dazu gehören u.a. das DNA-bindende HMGB-1 (Amphoterin), welches verstärkt bei Zellnekrose freigesetzt wird (Hori et al., 1995), Amyloid- $\beta$  (Yan et al., 1996) oder Amyloid A (Yan et al., 2000). Weitere Liganden von RAGE sind S100-Proteine, wobei es sich um calciumbindende Polypeptide handelt, die bei chronischer Entzündung extrazellulär akkumulieren (Hofmann et al., 1999). Neben diesen körpereigenen Liganden bindet RAGE auch Oberflächenmoleküle von Bakterien (LPS) (Yamamoto et al., 2011) und Prionen (Sasaki et al., 2002). Aufgrund dieser großen Ligandenvielfalt wird RAGE auch als *pattern recognition receptor* beschrieben. Diese Rezeptoren gehören zum angeborenen Immunsystem und dienen der Identifikation von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), die mit zellulärem Stress oder bakteriellen Pathogenen assoziiert sind und *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), welche bei Zellschäden freigesetzt werden. Moleküle wie HMGB-1 und S100-Proteine gehören zu den DAMPs.

#### 1.5.4 Signaltransduktionsweg

Basierend auf den zahlreichen RAGE Isoformen, zusätzlichen *splice*-Varianten und verschiedenen Polymorphismen im codierenden Gen, geht man in einer wachsenden Zahl von Untersuchungen davon aus, dass die Signaltransduktion nicht durch die alleinige Interaktion einer einzelnen RAGE-Isoform stattfindet. Vielmehr ist die Summation der Effekte der verschiedenen RAGE-Isoformen Grundlage für die Signalweiterleitung (Ding und Keller, 2005b).

Die Interaktion von RAGE mit seinen Liganden kann verschiedene Signalkaskaden auslösen, welche meistens zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen. Ungeklärt ist bisher, welche Funktion die *n-truncated* RAGE-Variante ohne ligandenbindende V-Domäne hat und auf welchem Mechanismus eine Signaltransduktion basiert. (Huttunen et al., 1999; Bierhaus et al., 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass eine RAGE-Ligation die Aktivierung der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Kaskade induziert. Diese wiederum aktiviert ihrerseits die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und p21 (Lander et al., 1997). Später konnten auch die MAPK-Untergruppen p38 (Yeh et al., 2001; Sorci et al., 2004) und die SAPK/JNK-MAP-Kinasen (Taguchi et al., 2000) als RAGE-assoziierte Signalkaskaden beobachtet werden. Weiterhin wurden die RHO-GTPasen Rac-1 und Cdc42 (Sorci et al., 2004) und die JAK/STAT-Signalkaskade (Huang et al., 2001) als Ergebnis einer RAGE-Aktivierung identifiziert. Außerdem kann es durch die Interaktion von RAGE mit seinen Liganden zur direkten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch die NADPH-Oxidase kommen (Wautier et al., 2001).

Vor dem Hintergrund, dass keine bekannten Phosphorylierungsstellen, G-Protein-Bindungsstellen oder Kinase-Bindungsstellen in der cytosolischen Domäne bestehen, stellt sich die Frage, wie es zur Aktivierung der Signalkaskaden kommt. Einen möglichen Weg zeigten Ishihara et al. 2003 mit *extracellular signal-regulated kinases* (ERK1/2) als einen direkten cytosolischen RAGE-Bindungspartner.

Der 1986 entdeckte Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (Sen und Baltimore, 1986), welcher eine Schlüsselrolle in der Regulation des Immunsystems besitzt und dessen Regulation auch durch RAGE stimuliert wird, liegt im Zytoplasma meist in inaktiver Form vor. Dies wird durch Bindung an das Inhibitor-Molekül I $\kappa$ B $\alpha$  gewährleistet. Die Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung und Abbau des Inhibitor-Moleküls und folgender NF- $\kappa$ B-Freisetzung (Baldwin jr., 1996). Dieser induziert daraufhin im Zellkern eine Expression von über 200 verschiedenen Zielgenen, welche z.B. für proinflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle, das Inhibitor-Molekül I $\kappa$ B $\alpha$  und für RAGE selbst codieren. Das zeigt, dass durch Aktivierung von RAGE ein positiver Feedback-Mechanismus ausgelöst wird (Bierhaus et al., 2005).

Die Vielfalt an Signalkaskaden lässt vermuten, dass verschiedene RAGE-Liganden auch unterschiedliche Signalwege auslösen. Zudem ist eine Abhängigkeit vom Zelltyp, in welchem RAGE exprimiert wird, denkbar. Dies erhöht nochmals die Komplexität des RAGE-Netzwerkes. Sind Mechanismen gestört, die für negative Rückkopplungen in Richtung des homöostatischen Gleichgewichtes einer Zelle verantwortlich sind, kann dies zu einer ansteigenden Zellaktivierung führen (Bierhaus et al., 2005).

### **1.5.5 RAGE-Gen und Gen-Polymorphismen**

Das RAGE-Gen ist lokalisiert auf dem kurzen Arm von Chromosom sechs an Position 6p21.3. Dies ist die Region des *major histocompatibility complex* (MHC-Komplex) Klasse 3, in der verschiedene Gene der Immunantwort, TNF $\alpha$  und Faktoren des Komplementsystems lokalisiert sind (Laki et al., 2007). Die Länge beträgt ca. 1700 Basenpaare und es beinhaltet 11 Exons (Sugaya et al., 1994).

Im Gegensatz zu Mutationen, die ein spezifisches Krankheitsbild bewirken, kommen Polymorphismen in hoher Frequenz in der Bevölkerung vor und könnten somit auch eine modifizierende Funktion auf Parodontitis und KHK ausüben. Erst wenn in über 1% einer Population eine solche Mutation vorliegt, spricht man von einem Polymorphismus. Die einfachste Variante ist der *single nucleotide polymorphism* (SNP), bei dem es zu einem Austausch einer einzigen Base kommt (Tabajarian et al., 2012). Ein Polymorphismus muss nicht zwangsläufig auch ein verändertes Genprodukt zur Folge haben. Bei einem Basenaustausch in einem Intron kommt es nicht zu funktionellen Auswirkungen, sodass man von einer stillen

Mutation spricht. Befindet er sich im Bereich eines Exons, kann dies eine veränderte Aminosäuren-Struktur und eingeschränkte Funktion des Proteins zur Folge haben. Im Falle eines Promotorpolymorphismus wird eher die Quantität des Genprodukts beeinflusst.

Der in der vorliegenden Studie untersuchte -374T>A SNP im Promotor des RAGE-Gens wurde zuerst von Hudson beschrieben. Dort wurde eine durch das A-Allel gesteigerte Promotoraktivität vermutet (Hudson et al., 2001). Weitere Studien fanden kontroverse Ergebnisse (Martens et al., 2012), sodass nicht eindeutig geklärt ist, ob der Polymorphismus zu einer Hoch- oder Runterregulation der Promotoraktivität führt.

### **1.5.6 Einfluss von RAGE auf Parodontitis**

Durch eine Stimulation von RAGE kommt es zu einer proinflammatorischen Reaktion. Speziell in Makrophagen ist dieser Effekt unter anderem in einer erhöhten Expression von TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 und Stickstoffmonoxid (NO) erklärbar, wobei NF- $\kappa$ B eine Vermittlerrolle spielt. Durch Inhibieren von RAGE und NF- $\kappa$ B durch Antikörper kann eine Hochregulation von TNF $\alpha$ , IL-6 und NO verhindert werden (Holla et al., 2001; Dukic-Stefanovic et al., 2003). Weiterhin führt NF- $\kappa$ B zu einem Anstieg von MMPs der Formen MMP-1, MMP-3 und MMP-13 (Nah et al., 2007). Auch an humanen Fibroblasten konnte ein AGE-RAGE-stimulierter MMP-1-Anstieg verzeichnet werden (Yu et al., 2012). In kultivierten humanen Zellen des parodontalen Ligaments stellten japanische Forscher einen Anstieg von IL-1 und IL-6 durch HMGB-1-Stimulation unter anderem über RAGE fest (Hasegawa, 2008). Darüber hinaus ist NF- $\kappa$ B ein bedeutender Regulator der Osteoklastenaktivität (Leibbrandt und Penninger, 2008). Durch MMPs und Osteoklasten kommt es zur fortschreitenden Progression der parodontalen Desktruktion. Die Interaktion zwischen RAGE mit AGEs in Endothelzellen führt zu deren Hyperpermeabilität und erhöhter Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 (Holla et al., 2001). Weiterhin wird in Endothelzellen über die Achse HMBG-1-RAGE-NF- $\kappa$ B auch das chemotaktische IL-8 vermehrt produziert (Sun et al., 2013), wodurch es zur Mobilisierung und Degranulation neutrophiler Granulozyten kommen kann.

Studien zum Einfluss von RAGE-Polymorphismen auf Parodontitis sind bisher rar. Eine Forschergruppe um Holla fand 2001 bei Kaukasiern eine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem Polymorphismus 1704G/T ( $p=0,020$ ) und chronischer Parodontitis. Bei den anderen untersuchten Genvarianten 2184A/G und einem Aminosäureaustausch an Position 82 (G82S) stellten sie keine Differenzen zur Kontrollgruppe fest (Holla et al., 2001). Für den untersuchten -374T>A SNP im RAGE-Gen existiert eine Studie, in der das T-Allel als möglicher Risikofaktor für eine aggressive Parodontitis identifiziert wurde (Stosberg et al., 2011). In der vorliegenden Studie wird zum ersten Mal untersucht, ob der -374T>A-RAGE SNP

zum Schweregrad der Parodontitis bei stationären KHK-Patienten und/oder weiteren kardialen Ereignissen assoziiert ist.

### **1.5.7 Einfluss von RAGE auf Atherosklerose**

In neueren Studien gehen Forscher davon aus, dass die Interaktion von RAGE mit seinen Liganden an der Entstehung von atherosklerotischer Plaque beteiligt ist. In Apo-E  $-/-$  Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass es mit steigendem Lebensalter, besonders in Endothelzellen aber auch in glatten Muskelzellen der Gefäßmedia, einen signifikanten Anstieg von RAGE gibt (Harja et al., 2008).

Das metabolische und biochemische Milieu, generiert durch den Eintritt von Lipoproteinen in die Gefäßwand, fördert die Produktion von AGEs, S100/Calgranulin-Proteinen und HMGB-1 (Harja et al., 2008). Dabei stellte man mit steigender Evidenz fest, dass die Ligierung mit RAGE die Erhöhung der NADPH-Oxidase, MAPK und NF- $\kappa$ B triggert, gefolgt von einer exzessiven Generation von Sauerstoffradikalen und der Hochregulation von VCAM-1, ICAM-1 und dem Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1 (MCP-1). Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies mit einhergehender erhöhter sauerstoffsensitiver NF- $\kappa$ B-Transkription kann wiederum die Expressionsrate von RAGE im Sinne einer positiven Rückkopplung erhöhen. Weiterhin ist RAGE bekannt als Initiator der Produktion proinflammatorischer Zytokine, die einen maßgeblichen Einfluss auf die Progression der Atherosklerose haben (Dou et al., 2012).

Um den Einfluss von RAGE zu bestätigen, wurden zahlreiche Versuche durchgeführt. Diabetische RAGE  $-/-$  Mäuse zeigten dabei signifikant geringere atherosklerotische Areale als deren RAGE-positive Pendanten (Soro-Paavonen et al., 2008). Gleichsam wiesen ApoE  $-/-$  Mäuse geringere atherosklerotisch veränderte Bezirke auf, deren RAGE-Signalweg durch sRAGE blockiert wurde (Wendt et al., 2006). In einer amerikanischen Humanstudie mit 1201 Patienten wurde nach einer Follow-Up-Zeit von durchschnittlich 18 Jahren festgestellt, dass niedrige sRAGE-Level mit einer KHK assoziiert sind (HR=1,82, 95%-CI=1,17-2,84). Dies spricht für einen schützenden Effekt des zirkulierenden sRAGE (Selvin et al., 2013).

Studienergebnisse, die den Einfluss von RAGE-Polymorphismen auf KHK beschreiben, sind sehr widersprüchlich. In einer Ende 2012 veröffentlichten Metaanalyse wurden die Auswirkungen der Polymorphismen -374T>A, -429T>C und G82S untersucht. Dabei konnte für keine der drei Genvarianten ein statistisch signifikanter Zusammenhang zur KHK gefunden werden (Wang et al., 2012a). Allerdings besteht eine große Heterogenität in den Studiendesigns und die Studien unterscheiden sich in den Variablen Endpunkt (teilweise nur Myokardinfarkt aufgenommen), Aufnahmekriterien, ethnische Zugehörigkeit der Probanden, Aufnahme oder Ausschluss von Probanden mit zusätzlichen Allgemeinerkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus.

## 2. Zielstellung

Die KHK einschließlich des Myokardinfarkts als schwerste Komplikation zählt zu den führenden Todesursachen in den Industrienationen. Ursache dafür sind in der Regel atherosklerotische Gefäßveränderungen. Bei dieser inflammatorisch bedingten Gefäßerkrankung kommt es durch eine chronische oder akute Minderperfusion zur Überschreitung des Sauerstoffbedarfs über das Sauerstoffangebot des Myokards. Zur Mortalitätssenkung bedarf es neben der Entwicklung neuer Therapiestrategien ebenso einem besseren Verständnis von Ätiologie und Pathogenese der KHK, um über die Beeinflussung von Risikofaktoren die KHK-Ereignisrate zu senken.

Ende der 1980er-Jahre rückte ein möglicher Risikofaktor der KHK, die Parodontitis, immer näher in den Mittelpunkt der Forschung. Die Parodontitis, eine ebenfalls entzündlich bedingte Erkrankung multikausaler Genese, führt zu einer Destruktion des Zahnhalteapparates und kann unbehandelt zu Zahnlockerung und Zahnverlust führen. Der primäre ätiologische Faktor der Parodontitis ist die mikrobielle Plaque auf mineralisierten Zahnoberflächen. Zudem wirken genetische und nichtgenetische Faktoren modulierend. Im Mittelpunkt der Erkrankung steht neben der Untersuchung des oralen Mikrobioms die inflammatorische Immunantwort, die einerseits der bakteriellen Abwehr dient, andererseits aber zum parodontalen Abbau beiträgt.

Zum jetzigen Zeitpunkt geht man von einem bis zu 50%-igen Einfluss von genetischen Faktoren sowohl auf KHK als auch auf Parodontitis aus (Lusis et al., 2004; Laine et al., 2010). Einen möglichen Ansatzpunkt in der Entwicklung beider Erkrankungen könnten Polymorphismen im Gen für den Rezeptor für *advanced glycation endproducts* (RAGE) darstellen. Der in dieser Arbeit untersuchte Rezeptor befindet sich u.a. auf der Oberfläche von Zellen des Immunsystems und Endothelzellen. Die genauen Auswirkungen auf die Promotoraktivität konnten bislang nicht eindeutig geklärt werden. Es existieren Studien in denen beschrieben wird, dass das -374-A-Allel vermutlich zu einer verringerten RAGE-Expression führt (Falcone et al., 2008; Martens et al., 2012). In einer anderen Veröffentlichung wird dagegen von einer durch das A-Allel gesteigerten Promotoraktivität ausgegangen (Hudson et al., 2001).

Der -374T>A Polymorphismus wurde bereits, mit teils widersprüchlichen Ergebnissen, in Bezug auf eine KHK untersucht. Bei Patienten mit mindestens 50%-iger Koronarstenose konnte ein schützender Effekt des -374-AA-Genotyps festgestellt werden (Pettersson-Fernholm et al., 2003). Im Gegensatz dazu stellte man in einer türkischen Studie fest, dass das A-Allel ein unabhängiger Risikofaktor für eine KHK bei Patienten mit Diabetes mellitus ist (Kucukhuseyin et al., 2009). In einer Meta-Analyse konnte kein signifikanter Einfluss des -374T>A Polymorphismus auf die KHK festgestellt werden (Wang et al., 2012a). In Bezug zur Parodontitis existiert eine Studie, in der das T-Allel des -374T>A SNP als möglicher Risikofaktor für eine aggressive Parodontitis identifiziert wurde (Stosberg et al., 2011).



Mit Hinblick auf die genannten Erkenntnisse wurden für die vorliegende Studie folgende Arbeitshypothesen formuliert:

1. Da genetische Risikofaktoren die Pathogenese der Parodontitis beeinflussen, ist eine Assoziation zwischen dem untersuchten -374T>A Polymorphismus im RAGE-Gen zum Schweregrad einer Parodontitis zu vermuten.
2. Wir vermuten außerdem, dass sowohl der -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens als auch Parodontitis zu kardiovaskulären Folgeereignissen bei stationären Patienten mit diagnostizierter KHK assoziiert ist.
3. RAGE spielt eine zentrale Rolle in der Immunantwort. Daher ist anzunehmen, dass RAGE mit biochemischen Entzündungsparametern assoziiert ist.
4. Neben der Entzündungsreaktion könnte RAGE auch die Zusammensetzung des subgingivalen Biofilms beeinflussen. Deshalb vermuten wir eine Assoziation des -374T>A Polymorphismus zum Auftreten parodontopathogener Mikroorganismen.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit wurde folgendermaßen formuliert:

Ist der -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens assoziiert zur schweren Parodontitis unter stationären Patienten mit diagnostizierter KHK und in der Konsequenz auch im Rahmen einer Longitudinaluntersuchung in Kombination mit schwerer Parodontitis assoziiert zu kardiovaskulären Folgeereignissen?

Weiterhin wurden folgende Nebenziele definiert:

Gibt es eine Assoziation zwischen untersuchtem RAGE-SNP und den gemessenen Entzündungswerten (IL-6 und CRP) und Cholesterinwerten? Zudem sollte der Einfluss des -374T>A Polymorphismus auf das Auftreten subgingivaler parodontopathogener Bakterien untersucht werden. Weiterhin galt es zu überprüfen, ob es einen Einfluss des Polymorphismus zu anamnestisch bekannten Vorerkrankungen gibt.

Aufgrund der angeführten Gemeinsamkeiten von KHK und Parodontitis ist ein Zusammenhang zwischen beiden Erkrankungen zu vermuten. Ein gemeinsames genetisches Bindeglied könnte der hier untersuchte -374T>A Polymorphismus im RAGE-Gen sein, da dieser am Anfang einer verzweigten Signalkaskade des Immunsystems steht. Sollte sich ein solcher Zusammenhang bestätigen, könnte durch eine Analyse der individuellen Allel/Genotyp-Konstellation das Risiko für das Auftreten erneuter kardiovaskulärer Ereignisse eruiert werden. So würde ein Patient mit erhöhtem Risiko in ein engmaschiges Recall-Netzwerk der Kardiologie und der Parodontologie eingebunden werden, um ein weiteres Fortschreiten der Erkrankungen zu verlangsamen. Des Weiteren könnte das Antagonisieren von RAGE oder das Abfangen oder Reduzieren von RAGE-Aktivatoren ein Therapieansatz sein.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Studienkollektiv**

##### **3.1.1 Auswahl der Patienten**

Nach Durchführung einer Fallzahlplanung durch das Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik wurde die Anzahl der Studienprobanden auf 960 festgelegt. Die Ethikkommission der Martin-Luther-Universität gab ihr positives Votum zur Durchführung der Studie. Jeder Patient wurde vor Teilnahme an der Studie schriftlich und mündlich aufgeklärt und hat eine Einwilligungserklärung zur Nutzung seiner anonymisierten Daten unterschrieben. Dabei wurde er über das Ziel der Studie und die Erhebung der Daten informiert.

##### **3.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien**

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte in der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Für die Teilnahme an der Studie musste eine per Herzkatheteruntersuchung angiographisch festgestellte mindestens 50%-ige Stenose mindestens einer dominanten Herzkranzarterie vorliegen. Weitere Voraussetzung für einen Studieneinschluss war ein Mindestalter von 18 Jahren von ausschließlich kaukasischen nicht miteinander verwandten Teilnehmern und das Vorliegen einer schriftlichen Einwilligungserklärung. Zudem wurde die Mindestanzahl der Zähne auf vier festgelegt.

Ein Ausschluss aus der Studie erfolgte bei Krankheiten oder Funktionsstörungen, die eine Teilnahme nicht erlaubten und einer anderen nicht mehr als 30 Tage zurückliegenden klinischen Prüfung des Patienten. Weitere Ausschlusskriterien waren eine Antibiotikaeinnahme in den letzten drei Monaten, eine Einnahme von Medikamenten, die zu Gingivahyperplasien führen können (Hydantoin, Nifedipin, Cyclosporin A, etc.) und parodontale Therapien (subgingivales Scaling, Kürettagen, Lappenoperationen) innerhalb der letzten sechs Monate. Schwangere Patientinnen wurden nicht in die Studie aufgenommen.

##### **3.1.3 Erhebung der klinischen Daten**

Die Aufnahme von Patienten mit stabiler oder instabiler KHK zur Herzkatheteruntersuchung stellt die Grundlage für die Studienteilnahme dar.

Am ersten Tag nach Aufnahme kam es zum Patienteneinschluss inklusive Einholung der Einverständniserklärung. Dabei wurden die routinemäßigen Untersuchungen wie Langzeit-EKG, Labordiagnostik und Echokardiographie durchgeführt.

Am nächsten Tag erfolgte die Erhebung des Zahn- und Parodontalstatus inklusive der Probenentnahme zur Bestimmung des mikrobiologischen Befundes von Markerkeimen der

Parodontitis (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga ssp.*).

Im Rahmen der parodontalen Anamnese wurden die Patienten nach Häufigkeit des Zähneputzens pro Tag, Häufigkeit des Zahnarztbesuches pro Jahr und Raucherstatus befragt. Auch eine parodontale Familienanamnese wurde erhoben.

Der zahnärztliche Befund umfasste den DMF-Index zur Erhebung der Anzahl kariöser (decayed), fehlender (missing) und gefüllter (filled) Zähne. Weiterhin erfolgte die Erfassung des Plaque-Indexes nach Silness und Loe durch optische Beurteilung ohne Anfärben mithilfe einer Sonde. Die Bewertungsgrade reichen von 0 (keine Plaque durch Inspektion oder Sondierung erkennbar) bis 3 (deutlich den Approximalraum ausfüllende Plaque) (Silness und Loe, 1964).

Zur Bestimmung der Prävalenz und Ausprägung der Parodontitis wurde eine 6-Punkt-Sondiertiefenmessung (probing depth: PD, Distanz marginale Gingiva bis apikaler Stopp bei 0,25N Sondierdruck) vorgenommen. Dabei wurde mit einer druckkalibrierten Messsonde (DB764R Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Germany) der höchste Wert nach sechs Messungen (distobukkal, bukkal, mesiobukkal, mesiooral, oral und distooral) pro Zahn erhoben und in die Mittelwertberechnung aller Zähne einbezogen. Genauso wurde mit dem Attachmentverlust (clinical attachment loss: CAL, Distanz Schmelz-Zementgrenze bis apikaler Stopp der Messsonde) verfahren. Daraufhin erfolgte eine Einteilung der Probanden nach Kriterien von Tonetti und Claffey in die Gruppe mit schwerer Parodontitis, wenn die Präsenz des approximalen CAL bei mindestens 30% der Zähne größer gleich 5mm war (Tonetti und Claffey, 2005).

Weiterhin wurde die Sondierblutung (BOP) ca. 30 Sekunden nach Sondiertiefenmessung mit einer dichotomen (Ja/Nein) Entscheidung beurteilt. Die messpositiven Stellen wurden ins Verhältnis zur Gesamtzahl der Messstellen gesetzt (Ainamo und Bay, 1975).

Schließlich wurde eine Blutentnahme zur Analyse der Genpolymorphismen vorgenommen.

### **3.1.4 Erhebung der biochemischen Daten**

Neben der allgemeinen Labordiagnostik für die Akuttherapie der Koronarstenose wurden zusätzliche Blutparameter bestimmt. Dies sind die Entzündungsparameter CRP, Leukozytenzahl und IL-6. Weiterhin wurden Kreatinin, Gesamtcholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin sowie die Triglyceride bestimmt.

### **3.1.5 Erhebung der Follow-Up-Daten**

Die Evaluierung des Follow-Up erfolgte ein Jahr nach Erstaufnahme des Patienten. Alle Probanden wurden postalisch angeschrieben, mit der Bitte, den beiliegenden Fragebogen auszufüllen (siehe Anhang). Nicht auf dem Postweg erreichbare Patienten wurden telefonisch kontaktiert und befragt. Außerdem wurden bei verstorbenen Patienten der Hausarzt und die Gesundheitsämter zur Todesursache befragt.

## **3.2. Genomische Untersuchungen**

### **3.2.1 Blutentnahme und DNA-Isolation**

Die Entnahme von 9ml venösen Blutes erfolgte im Universitätsklinikum Kröllwitz mit EDTA-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Diese wurden bis zur DNA-Isolation kühl gelagert.

Die DNA-Isolation wurde im Labor der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie durchgeführt. Dabei wurden die Zellmembranen enzymatisch lysiert und die freigewordene DNA durch ein Filtermembransystem isoliert.

Dazu diente das QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden (Deutschland)). Im ersten Schritt wurden 20µl Proteinase K, 200µl Blut und 200µl Puffer AL in ein 1,5ml Tube pipettiert. Nach kurzem vortexen, schüttelnder Inkubation (15min, 56°C) und zentrifugieren, wurden 200µl Ethanol dazu pipettiert, nochmals gevortext und ein weiteres Mal zentrifugiert. Dieser Ansatz wurde daraufhin auf die Mitte eines Säulchens pipettiert und für eine Minute bei 8000rpm zentrifugiert. Danach wurde dieses Säulchen auf ein neues Sammeltube gesetzt, erst mit 500µl Puffer AW1, anschließend mit 500µl Puffer AW2 gewaschen und drei Minuten bei 13000rpm zentrifugiert. Die DNA im nun trockenen Säulchen wurde mit 200µl Aqua dest. fünf Minuten inkubiert und darauf folgend durch einminütige Zentrifugation bei 13000rpm von der Säule eluiert. Die Lagerung der DNA erfolgt bei -20°C.

### **3.2.2 DNA-Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der Vervielfältigung (=Amplifizierung) von spezifischen DNA-Sequenzen. Dabei kommt es nach Denaturierung des DNA-Doppelstranges zur Anlagerung von Primern an die entstandene Einzelstrang-DNA. Anschließend erfolgt die DNA-Synthese, bei der die Primer am freien 3'-OH-Ende mit Hilfe der Polymerase verlängert werden. Der Ablauf einer PCR umfasst 20-40 Zyklen und findet in einem Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) statt, der nach Programmierung die verschiedenen Schritte automatisch nacheinander ausführt.

PCR zur Amplifizierung des Promotorbereiches des untersuchten -374T>A SNP im RAGE-Gen

Als Grundlage der Genotypisierung wurde die Sequenz NW\_001838980 herangezogen. Für die Amplifizierung des 345 Basenpaare langen DNA-Fragmentes (siehe Abb. 3) wurden pro Patient 12,5µl Master Mix (Promega), 0,5µl Primer 1 (5'- GGG GGC AGT TCT CTC CTC -3'), 0,5µl Primer 2 (5'- TCA GAG CCC CCG ATC CTA TTT -3'), 10,5µl Aqua dest. und 1µl der zu untersuchenden genomischen DNA in 0,5ml Tubes pipettiert. Zusätzlich erfolgt bei jeder PCR auch das Ansetzen einer Nullkontrolle ohne Patienten-DNA. Die daran anschließende, 40 Zyklen umfassende PCR, ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

GGGGGCAGTT	CTCTCCTCAC	TTGTAAACTT	GTGTAGTTTC	ACAGAAAAAA
AACAAAATGC	AGTTTTAAAT	AAAGAAATTT	CTTTTTTCCC	TGGGTTTAGT
TGAGAATTTT	TTTCAAAAAA	CATGAGAAAC	CCCAGAAAAA	AAATGATTTT
CTTTCACGAA	GCTCCAAACA	GGTTTCTCTC	CTGTTCCCCA	GCCTTGCCTT
CATGATGCAG	GCCCAA <b>T</b> TGC	ACCCTTGCA	ACAACAGTCT	GGCCTGAACC
CTATTGATGC	AACTTTGCGC	AATCAAGATG	GGGCTCCAGT	GGGTCACCAG
GCAGCCCTGA	TGGACTGATG	GAAT <b>AAATAG</b>	<b>GATCGGGGGC</b>	<b>TCTGA</b>

Abb. 3: Gensequenz des Promotors des RAGE-Gens (in 5' – 3' – Richtung). Primeranlagerungsstellen rot dargestellt, TSP5091 Erkennungssequenz grün dargestellt, -374T>A SNP blau dargestellt und dick gedruckt.

Tab. 1: Zusammenfassung des PCR-Programmes zur Bestimmung der Genpolymorphismen

<b>Denaturierung</b>	2min, 94°C	
<b>Denaturierung</b>	40s, 92°C	
<b>Annealing</b>	40s, 54°C	} 1. Zyklus; 15 Abfolgen
<b>Elongation</b>	1min, 72°C	
<b>Delay</b>	1s	
<b>Denaturierung</b>	40s, 92°C	
<b>Annealing</b>	40s, 49°C	} 2. Zyklus; 55 Abfolgen
<b>Elongation</b>	1min, 72°C	
<b>Delay</b>	1s	
<b>Elongation</b>	5min, 72°C	
<b>Hold</b>	4°C	

### **3.2.3 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) und Darstellung in der Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auswertung des Polymorphismus -374T>A im RAGE-Gen basiert auf dem Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP). Dabei wird ausgenutzt, dass ein bestimmtes Restriktionsenzym nur bei einer bestimmten Sequenz schneidet. Der zu untersuchende Polymorphismus muss innerhalb dieser Erkennungssequenz liegen. Ist ein Basenaustausch eingetreten, erkennt das Restriktionsenzym die Sequenz nicht und wird nicht aktiv. Daraus ergibt sich eine unterschiedliche Anzahl von DNA-Fragmenten mit bestimmter Länge, welche in einer Agarose-Gelelektrophorese dargestellt werden kann. Dieses Aufspalten der amplifizierten DNA erfolgte mittels des Restriktionsenzym TSP509I. Dazu wurden 0,6µl des Enzyms und 2,5µl NEB-Puffer 3 zum PCR-Ansatz hinzugefügt. Das Schneiden der DNA erfolgte acht Stunden bei 65°C im PCR-Gerät.

Für die Auftrennung wurde ein 2%-iges Gel aus 1,6g Sekam-Agarose, 80ml 0,5xTBE-Puffer und 500ng/ml Ethidiumbromid hergestellt. In jede Geltasche wurden 10µl des Verdau und 1µl Auftragepuffer pipettiert. Nach Anlegen einer Spannung von 180V erfolgte die Auftrennung in einer Zeit von 20min. Da die DNA durch je eine Phosphatgruppe pro Nukleotid negativ geladen ist, wurden die DNA-Abschnitte von der positiv geladenen Anode angezogen. Kürzere Fragmente bewegten sich dabei schneller als längere Fragmente. Das im Gel vorhandene Ethidiumbromid lagerte sich in die DNA ein und erlaubte die Betrachtung der unter einem UV-Transilluminator fluoreszierenden Banden. Die mitgeführte Nullkontrolle bestätigte das Nichtvorhandensein von Fremd-DNA (Abb. 5).

#### Genotypisierung des Polymorphismus -374T>A im RAGE-Gen

Das Enzym TSP509I schneidet immer bei Vorhandensein der Erkennungssequenz AATT. Der Polymorphismus -374T>A hat je nach Ausprägung des Genotyps ein Adenin oder ein Thymin an Stelle -374. In Abbildung 4 ist dies blau dargestellt. Das bedeutet, dass bei Vorhandensein von Thymin die DNA an dieser Stelle geschnitten wird, bei Adenin nicht. Zur Kontrolle dienen zwei weitere Abfolgen von AATT (in Abb. 4 rot dargestellt) amplifizierten Fragmentes.

Es resultiert je nach Genotyp ein Ergebnis mit vier (homozygot TT, drei Schnittstellen, folglich 4 Fragmente (29, 79, 110 und 127 bp)) oder drei (homozygot AA, zwei Schnittstellen, folglich 3 Fragmente (29, 79 und 237 bp)) unterschiedlich langen DNA-Fragmenten. Außerdem erhält man fünf verschiedene DNA-Fragmente bei einem heterozygoten Genotyp (29, 79, 110, 127 und 237 bp) (Abb. 4).

Zu beachten ist, dass die 29 bp lange DNA im Agarosegel nicht sichtbar ist. Die schwache Bande in Abbildung 5 am unteren Bildrand kommt durch die PCR-Primer zustande.

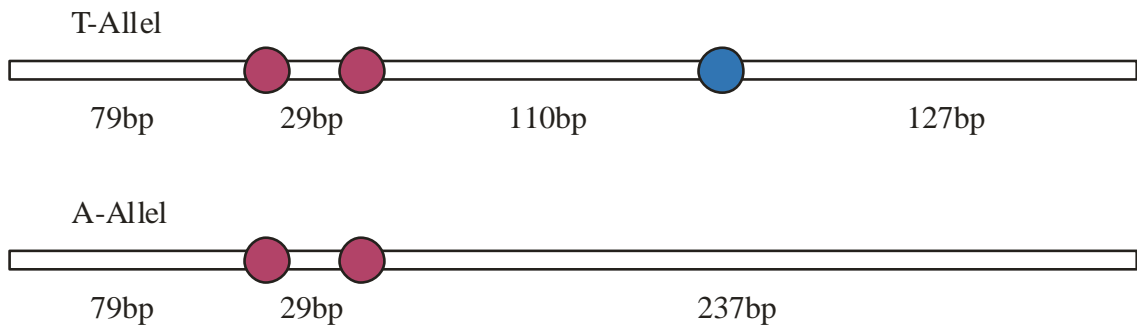


Abb. 4: Schema zur Spaltung durch TSP509I  
AATT-Erkennungssequenz rot dargestellt, Stelle des Polymorphismus blau dargestellt

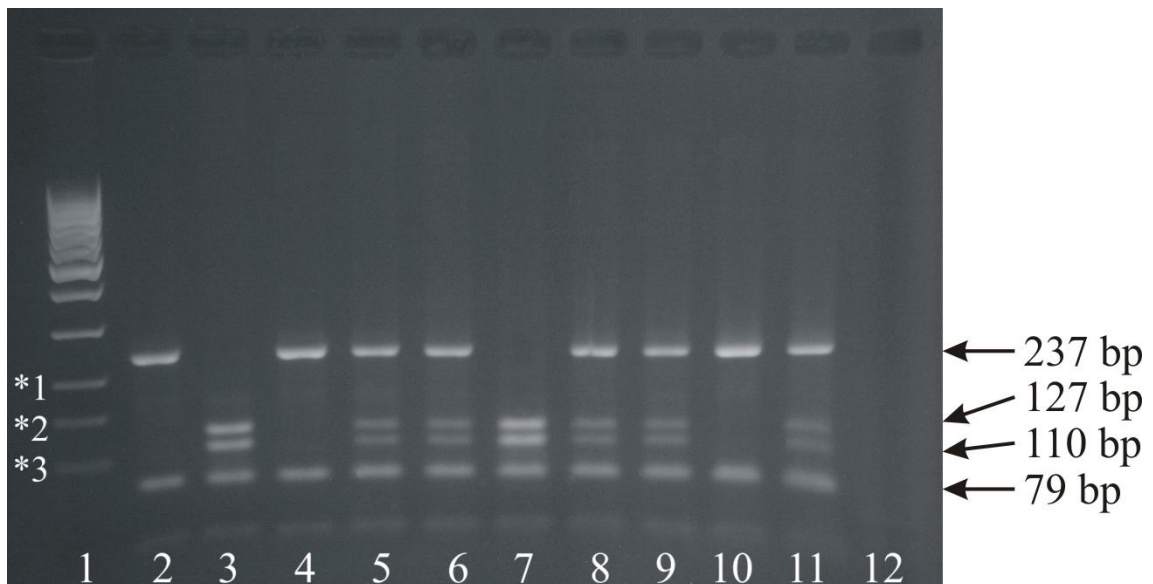


Abb. 5: Gelelektrophorese: Geltaschen am oberen Bildrand zu erkennen.  
Bande 1: DNA-Leiter (\*1: 200bp, \*2: 150bp, \*3: 100bp)  
Bande 2, 4, 10: homozygot AA  
Bande 3, 7: homozygot TT  
Bande 5, 6, 8, 9, 11: heterozygot AT  
Bande 12: Nullkontrolle

### **3.3 Chemikalien für die genomische Untersuchung**

#### **a) DNA-Isolation**

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

#### **b) Polymerase-Ketten-Reaktion**

- 2x Master Mix (50units/ml Taq Polymerase in Reaktionspuffer ph 8,5, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>) Promega, Mannheim (Deutschland)
- Aqua dest.
- Primer für -374T>A SNP im RAGE-Gen
- Primer 1: 5'- GGG GGC AGT TCT CTC CTC -3' Operon, Köln (Deutschland)
- Primer 2: 5'- TCA GAG CCC CCG ATC CTA TTT -3' Operon, Köln (Deutschland)

#### **c) Restriktionsspaltung**

- Restriktionsendonuklease Tsp5091 New England Biolabs, Frankfurt (D)
- NE Buffer 3 New England Biolabs, Frankfurt (D)

#### **d) Gelelektrophorese**

- Sekam-Agarose Biozym Scientific, Hess. Oldendorf (D)
- 100bp-Leiter
- 0,5xTBE-Puffer (45 nM Tris-HCL, 45 nM Borsäure, 0,5mM EDTA, ph 8,3)
- Ethidiumbromid
- Auftragepuffer (50% Glycerin, 0,05% Bromphenolblau, 0,5x TBE-Puffer)

### **3.4 Geräte**

- Vortex Genie 2 Bender & Hobein AG, Bruchsal (Deutschland)
- Mini Centrifuge C-1200 National Labnet Co, Woodbridge (New Jersey)
- Mastercycler gradient Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
- Gelelektrophoresekammer EasyCast Peqlab, Erlangen (Deutschland)
- Gelelektrophoresekammer BIOplex Strehlau&Kruse GmbH, Freiburg (Deutschland)
- Blue Power 500 Stromversorger Serva, Heidelberg (Deutschland)
- UV-Transilluminator N-90M Benda, Wiesloch (Deutschland)



### **3.5 Mikrobiologische Diagnostik**

Die Bestimmung der subgingivalen Keimbesiedlung erfolgte mittels des micro-IDent®-plus Tests (HAIN Lifescience, Nehren, Deutschland). Dieser gibt qualitative und semiquantitative Auskunft über elf verschiedene parodontopathogene Keime.

Nach Probenentnahme mittels steriler Papierspitzen für 20 Sekunden in der jeweils tiefsten Tasche pro Quadrant, folgte die Isolierung der bakteriellen DNA, die von HAIN Lifescience, Nehren (Deutschland) durchgeführt wurde. Diese wird per PCR selektiv amplifiziert und chemisch denaturiert, sodass dann mittels hochspezifischer DNA-Sonden die Hybridisierung der Nukleinsäuren erfolgen kann. Während dieser Reaktion wird das Amplifikat mit dem Enzym alkalische Phosphatase markiert und anschließend in einer Farbreaktion dargestellt, wodurch die Existenz bakterieller DNA nachgewiesen wurde. Ein Ergebnis unter der Nachweisgrenze liegt bei fehlendem oder zu geringem Vorkommen von bakterieller DNA vor. Da es sich hierbei um ein semiquantitatives Verfahren handelt, erhält man die fünf Ergebniskategorien „unter Nachweisgrenze“, „an Nachweisgrenze“, „erhöht“, „stark erhöht“ und „sehr stark erhöht“.

### **3.6 Statistische Auswertungen**

Für die statistische Auswertung wurde SPSS (IBM, Armonk, USA) in der Version 19.0 benutzt. Aus der Anamnese hervorgehende Erkrankungen oder Angaben des Patienten über seine Lebensgewohnheiten wurden für die statistische Untersuchung codiert. Soweit nicht anders angegeben, unterlagen Diabetes mellitus, Gicht, Hyperlipoproteinämie, Hypertonie, Myokardinfarkt, KHK, Raucherstatus, rheumatoide Arthritis und Schlaganfall/TIA einer dichotomen ja/nein-Entscheidung.

Alle metrischen Werte wurden per Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung untersucht und per Levene-Test auf Varianzhomogenität getestet. Bei Vorliegen einer Normalverteilung fand der T-Test nach Student Anwendung. Bei nicht normal verteilten Werten wurde der U-Test nach Mann-Whitney verwendet. Zur Auswertung kategorialer Daten wurden Chi<sup>2</sup>-Tests durchgeführt und die Werte durch eine Yates-Korrektur korrigiert. Mittels Regressionsanalysen wurde der Einfluss mehrerer Faktoren (Confounders) auf eine dichotome (binäre logistische Regression) oder auf eine metrische Variable (lineare Regression) geprüft.

Zur Auswertung von Überlebenszeiten wurden Kaplan-Meier-Kurven und Log-Rank-Tests berechnet. In Cox-Regressionen wurde wiederum auch die Wirkung zusätzlicher Risikofaktoren betrachtet.

Bei einem P-Wert  $\leq 0,05$  wurde von einer statistischen Signifikanz ausgegangen.

Die Hardy-Weinberg-Verteilung der untersuchten Genotypen wurde mittels Microsoft®-Excel berechnet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Statistische Untersuchungen der Studienteilnehmer

#### **4.1.1 Auswertung der demografischen Daten der Probanden in Abhängigkeit des parodontalen Befundes**

Von den 1002 in der vorliegenden Studie aufgenommenen Patienten war es bei 938 Probanden möglich eine Genotypisierung vorzunehmen. Von diesen litten 449 an einer schweren Parodontitis und 489 Probanden hatten keine oder eine leichte Parodontitis. Die 449 KHK-Patienten mit schwerer Parodontitis waren signifikant häufiger Männer und aktive Raucher. Die Mittelwerte für Alter und BMI unterschieden sich dagegen nicht signifikant voneinander (Tab. 2).

Tab. 2: Demografische Daten der Studienteilnehmer in Abhängigkeit der parodontalen Diagnose

	<b>Gesamt- gruppe (n=938)</b>	<b>keine oder leichte Parodontitis (n=489)</b>	<b>schwere Parodontitis (n=449)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Alter (Jahre) Mittelwert <math>\pm</math> SD</b>	66.88 $\pm$ 10.96	66,42 $\pm$ 11,1	67,37 $\pm$ 10,8	0,477*
<b>Männliches Geschlecht (%)</b>	74,0	69,7	78,6	0,002**
<b>aktive Raucher (%)</b>	12,4	9,0	16,0	0,002**
<b>Body-Mass-Index Mittelwert <math>\pm</math> SD</b>	28.32 $\pm$ 4.44	28,36 $\pm$ 4,3	28,27 $\pm$ 4,6	0,969*

SD: Standardabweichung; \*Mann-Whitney-U-Test; \*\*Chi<sup>2</sup>-Test mit Yates Korrektur

#### **4.1.2 Anamnestisch erhobene Vorerkrankungen in Assoziation zur parodontalen Diagnose**

Patienten mit schwerer Parodontitis gaben im Vergleich zu Probanden mit milder oder fehlender Parodontitis signifikant häufiger an, schon an einer KHK zu leiden bzw. einen Myokardinfarkt erlitten zu haben. Zusätzlich gaben Patienten mit schwerer Parodontitis tendenziell häufiger an, bereits einen Schlaganfall bzw. eine TIA erlebt zu haben (p=0,062). Die Diagnose schwere Parodontitis war unter den Patienten mit KHK nicht mit dem gleichzeitigen Auftreten eines Diabetes mellitus, einer Hypertonie, Hyperlipoproteinämie, rheumatoider Arthritis und Gicht assoziiert (Tab. 3).

Tab. 3: Anamnestisch erhobene Vorerkrankungen in Assoziation zur parodontalen Diagnose

	<b>Gesamtgruppe</b> (n=938) [%]	<b>keine oder leichte Parodontitis</b> (n=489) [%]	<b>schwere Parodontitis</b> (n=449) [%]	<b>p-Wert</b>
<b>Schlaganfall/TIA</b>	13,1	11,0	15,4	0,062*
<b>Diabetes</b>	34,1	31,5	37,0	0,089*
<b>Hypertonie</b>	87,6	88,3	86,9	0,555*
<b>Hyperlipoproteinämie</b>	58,7	61,3	55,9	0,104*
<b>rheumatoide Arthritis</b>	5,0	4,5	5,6	0,549*
<b>Gicht</b>	10,8	9,4	12,2	0,194*
<b>Myokardinfarkt</b>	<b>38,5</b>	<b>35,0</b>	<b>42,3</b>	<b>0,025*</b>
<b>bekannte KHK</b>	<b>74,3</b>	<b>71,4</b>	<b>77,5</b>	<b>0,038*</b>

TIA: transitorisch ischämische Attacke; \*Chi<sup>2</sup>-Test mit Yates Korrektur

#### 4.1.3 Mittelwerte biochemischer Parameter in Bezug zur parodontalen Erkrankung

Die Entzündungsparameter CRP und IL-6 waren in der Gesamtgruppe im Vergleich zu den vom Zentrallabor der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität herausgegebenen Referenzwerten für gesunde Individuen erhöht. Patienten mit schwerer Parodontitis hatten im Vergleich zur Gruppe der Probanden ohne oder mit leichter Parodontitis signifikant erhöhte CRP-, IL-6- und Kreatininserumwerte (Tab. 4).

Tab. 4: Biochemische Parameter in Bezug zur parodontalen Diagnose

	<b>Gesamtgruppe</b> (n=938) Median (25%/75% IQR)	<b>keine oder leichte Parodontitis</b> (n=489) Median (25%/75%IQR)	<b>schwere Parodontitis</b> (n=449) Median (25%/75% IQR)	<b>p- Wert</b>
<b>C-reaktives Protein (mg/dl)</b>	<b>9,0 (3,7/32,15)</b>	<b>7,5 (3,1/27,5)</b>	<b>10,2 (5,0/38,0)</b>	<b>0,007*</b>
<b>Interleukin-6 (pg/ml)</b>	<b>7,4 (3,7/15,7)</b>	<b>6,7 (3,4/13,8)</b>	<b>8,1 (4,2/18,0)</b>	<b>0,003*</b>
<b>Leukozyten (Gpt/l)</b>	7,9 (6,4/9,7)	7,7 (6,4/9,7)	8,0 (6,4/9,7)	0,540*
<b>Kreatinin (µmol/l)</b>	<b>87,0 (72,0/107)</b>	<b>85,0 (72,0/104)</b>	<b>88,0 (73,0/112)</b>	<b>0,031*</b>
<b>Gesamtcholesterin (mmol/l)</b>	4,3 (3,7/5,3)	4,4 (3,7/5,4)	4,3 (3,7/5,2)	0,283*
<b>HDL-Cholesterin (mmol/l)</b>	1,0 (0,8/1,2)	1,0 (0,8/1,2)	1,0 (0,8/1,2)	0,527*
<b>LDL-Cholesterin (mmol/l)</b>	2,6 (2,0/3,3)	2,6 (2,1/3,4)	2,6 (2,0/3,3)	0,334*
<b>Triglyceride (mmol/l)</b>	1,6 (1,2/2,3)	1,6 (1,2/2,3)	1,6 (1,2/2,3)	0,552*

HDL-Cholesterin: high density lipoprotein; LDL-Cholesterin: low density lipoprotein; \*Mann-Whitney-U-Test

Referenzbereiche (laut Zentrallabor Universitätsklinikum Halle):

C-reaktives Protein (mg/dl): < 5

Interleukin-6 (pg/ml): < 6,4

Leukozyten (Gpt/l): 3,8 – 9,8 (> 15 Jahre)

Kreatinin (µmol/l): männlich < 102; weiblich < 88

Gesamtcholesterin (mmol/l): < 6,2 (> 41 Jahre)

HDL-Cholesterin (mmol/l): > 1,5 niedriges Risiko; < 1,0 hohes Risiko

LDL-Cholesterin (mmol/l): < 2,6; 2,6 – 3,3 optimal

Triglyceride (mmol/l): < 2,3 (> 16 Jahre)

#### 4.1.4 Klinisch-parodontale Parameter in Abhängigkeit von der parodontalen Diagnose

Die Indizes für Mundhygiene und Sondierblutung, sowie die Mittelwerte für PD und CAL waren in der Gruppe mit schwerer Parodontitis signifikant erhöht. Weiterhin hatten Probanden mit schwerer Parodontitis signifikant mehr fehlende und kariöse Zähne. Die Anzahl der Zähne mit Füllungen war dagegen niedriger. Dies wirkte sich auf den DMF-T-Index aus, der in der Gruppe mit schwerer Parodontitis signifikant höher ausfiel (Tab. 5).

Tab. 5: Klinische Daten in Abhängigkeit von der parodontalen Diagnose

	<b>Gesamtgruppe (n=938) [Mittelwert ± SD]</b>	<b>keine oder leichte Parodontitis (n=489) [Mittelwert ± SD]</b>	<b>schwere Parodontitis (n=449) [Mittelwert ± SD]</b>	<b>p-Wert</b>
<b>PI (%)</b>	1,06 ± 0,78	0,75 ± 0,58	1,40 ± 0,83	<0,001*
<b>BOP (%)</b>	9,71 ± 13,96	7,28 ± 12,48	12,37 ± 14,98	<0,001*
<b>PD (mm)</b>	3,56 ± 0,92	3,05 ± 0,65	4,1 ± 0,84	<0,001*
<b>CAL (mm)</b>	4,33 ± 1,52	3,30 ± 0,72	5,47 ± 1,33	<0,001*
<b>PD (mm) an mikrob. Entnahmestellen</b>	4,28 ± 1,10	3,78 ± 0,9	4,81 ± 1,05	<0,001*
<b>CAL (mm) an mikrob. Entnahmestellen</b>	4,98 ± 1,56	3,98 ± 0,98	6,07 ± 1,34	<0,001*
<b>fehlende Zähne</b>	11,62 ± 7,54	8,95 ± 6,8	14,53 ± 7,2	<0,001*
<b>Anzahl kariöser Zähne</b>	0,29 ± 0,91	0,20 ± 0,67	0,39 ± 1,11	0,003*
<b>Anzahl gefüllter Zähne</b>	5,64 ± 4,11	7,0 ± 4,06	4,17 ± 3,64	<0,001*
<b>DMF-T Index</b>	17,53 ± 6,72	16,09 ± 6,73	19,09 ± 6,36	<0,001*

SD: Standardabweichung, PI: Plaqueindex nach Silness und Loe, BOP: Sondierblutung nach Ainamo und Bay, PD: Sondiertiefe, CAL: klinischer Attachmentverlust; fehlende Zähne: außer Weißheitszähnen; \*Mann-Whitney-U-Test

#### 4.1.5 Nachweis der DNA parodontopathogener Bakterien in subgingivalen Plaqueproben in Bezug zur parodontalen Diagnose

Die parodontalen Markerbakterien *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter rectus* und *Eubacterium nodatum* konnten signifikant häufiger bei Patienten mit schwerer Parodontitis nachgewiesen werden. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der parodontalen Diagnose und den anderen parodontopathogenen Bakterien konnte nicht gezeigt werden (Abb. 6).

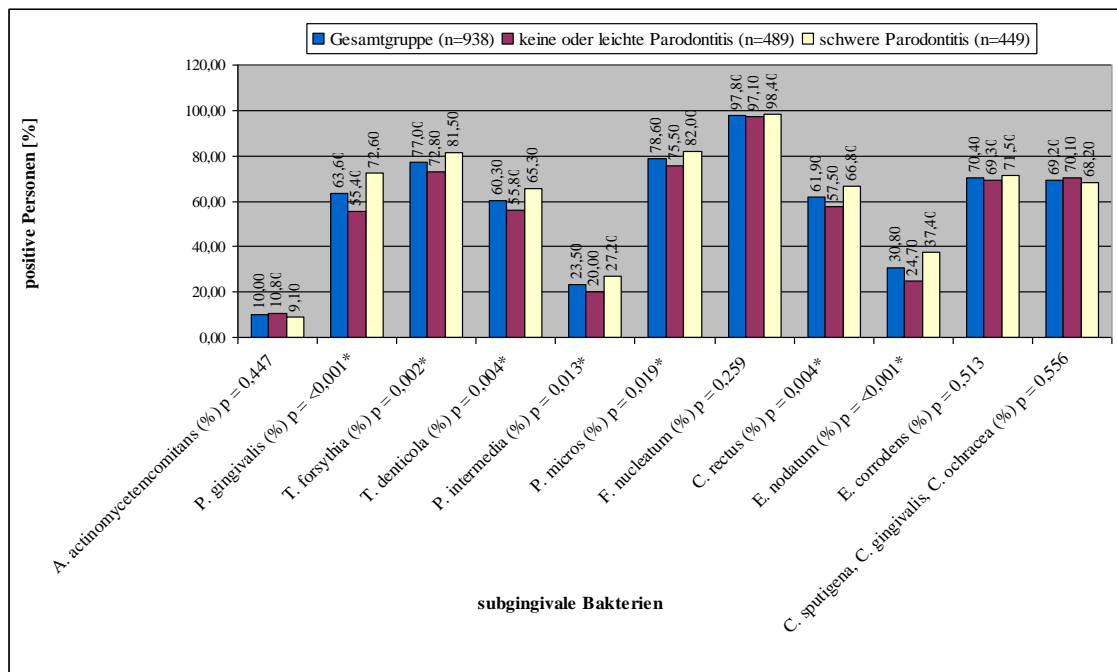


Abb. 6: Prozentualer Anteil von Probanden mit Nachweis parodontaler Leitbakterien in Abhängigkeit von der parodontalen Diagnose. Signifikanz: Chi<sup>2</sup>-Test mit Yates Korrektur; \*kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (p ≤ 0,05)

#### 4.2 Untersuchungen zum -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens

##### 4.2.1 Einfluss des -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens auf den Schweregrad der Parodontitis

Unter den 938 genotypisierten Patienten befanden sich 429 TT-Träger (45,7%), 425 AT-Träger (45,3%) und 84 Träger des AA-Genotyps (9,0%). 50,8% aller Probanden mit schwerer Parodontitis waren im A-dominanten Modell (TT vs. AA und AT) Träger des TT-Genotyps, wohingegen nur 41,1% der Patienten ohne oder mit leichter Parodontitis TT-Carrier waren (p = 0,004). Bei Betrachtung des Modells AT-Genotyp vs. AA und TT zeigte sich, dass Träger des AT-Genotyps seltener unter einer schweren Parodontitis litten (p = 0,004). Die Konstellation AA-Genotyp vs. AT/TT ergab keine signifikante Assoziation zur schweren Parodontitis (Abb. 7).

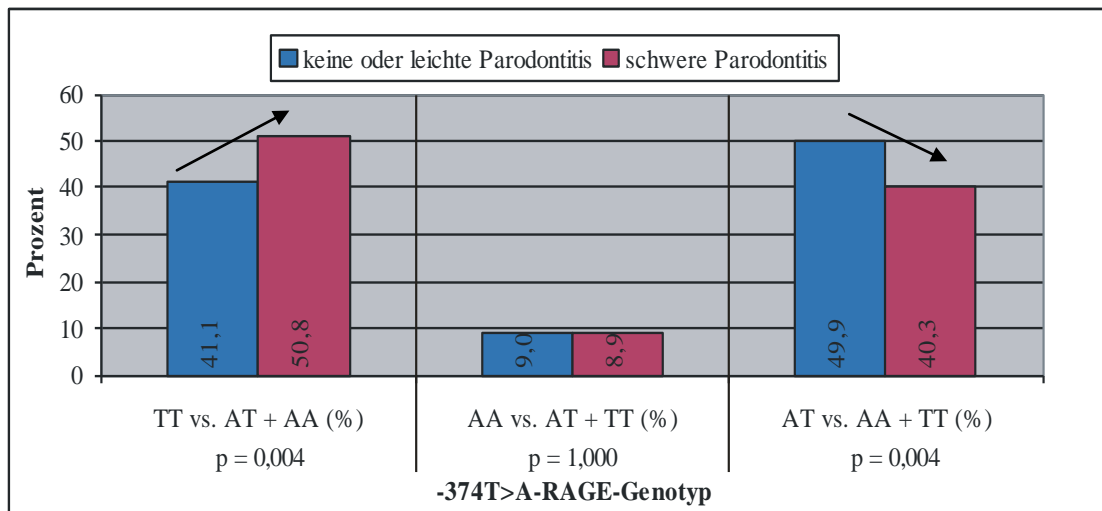


Abb. 7: Assoziationen der Genotypen TT, AA und AT des -374T>A Polymorphismus zur Prävalenz einer schweren Parodontitis. Signifikanz: Chi<sup>2</sup>-Test mit Yates Korrektur.

Auch bei der Untersuchung der Allele konnte ein signifikantes Ergebnis ermittelt werden. Patienten mit schwerer Parodontitis waren häufiger Träger des -374-T-Allels (Abb. 8).

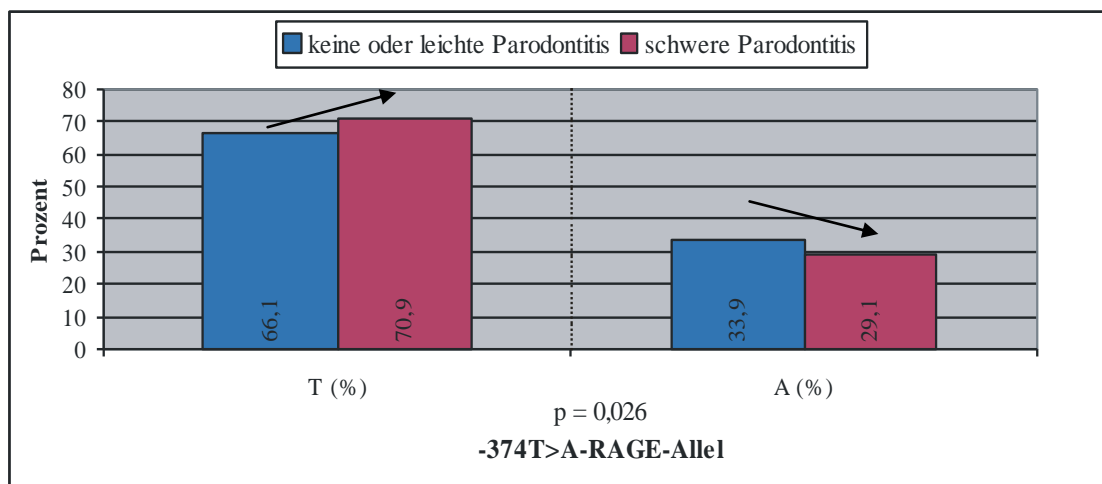


Abb. 8: Assoziation der Allelverteilung des -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens zur Prävalenz einer schweren Parodontitis. Signifikanz: Chi<sup>2</sup>-Test mit Yates Korrektur.

Die im bivariaten Vergleich signifikante Assoziation zwischen dem untersuchten Polymorphismus und schwerer Parodontitis wurde im multivariaten Vergleich unter Berücksichtigung etablierter Kofaktoren für Parodontitis und KHK wie Alter, Raucherstatus, männliches Geschlecht, Plaqueindex und Diabetes mellitus bestätigt. Nach dem Plaqueindex war das Vorhandensein des TT-Genotyps zweitstärkster Einflussfaktor auf den Schweregrad der Parodontitis. Danach haben Patienten mit KHK und nachgewiesenem TT-Genotyp eine 1,63-fach erhöhte Odds-Ratio gleichzeitig auch an schwerer Parodontitis zu erkranken. Im Gegensatz dazu war der AT-Genotyp mit einem verringerten Risiko an einer schweren Parodontitis zu erkranken assoziiert (OR=0,633). Wurde nur das T-Allel isoliert betrachtet, waren der Plaqueindex (OR=3,51) und der Raucherstatus (OR=1,74) größere Einflussfaktoren auf den

Schweregrad der Parodontitis als das T-Allel (OR=1,37). Wie im bivariaten Vergleich war der -374-AA-Genotyp auch im multivariaten Vergleich nicht signifikant zur Schwere der Parodontitis assoziiert (Tab. 6).

Tab. 6: Binäre logistische Regression (schrittweise vorwärts) zur Untersuchung der Auswirkung des -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens auf den Schweregrad der Parodontitis adjustiert für die Kofaktoren Plaqueindex, Rauchen, Diabetes, Geschlecht und Alter. Kofaktoren, die keinen signifikanten Einfluss auf die jeweiligen Modelle hatten, sind nicht dargestellt

- a) Assoziation der TT-Genotyp Konstellation
- b) Assoziation des T-Allels

	<b>Regressions- koeffizient</b>	<b>Standard- fehler</b>	<b>p- Wert</b>	<b>Odds- Ratio</b>	<b>95% Konfidenzintervall</b>
<b>a Plaqueindex</b>	1,324	0,116	<0,001	3,76	2,990 - 4,720
<b>TT-Genotyp</b>	<b>0,49</b>	<b>0,146</b>	<b>0,001</b>	<b>1,63</b>	<b>1,230 - 2,170</b>
<b>b Plaqueindex</b>	1,254	0,083	<0,001	3,51	2,980 - 4,122
<b>aktive Raucher</b>	0,556	0,177	0,002	1,74	1,230 - 2,470
<b>T-Allel</b>	<b>0,314</b>	<b>0,111</b>	<b>0,005</b>	<b>1,37</b>	<b>1,100 - 1,700</b>
<b>Alter</b>	0,014	0,005	0,009	1,014	1,003 - 1,024
<b>Männliches Geschlecht</b>	0,251	0,119	0,036	1,285	1,017 - 1,623

#### 4.2.2 Statistische Untersuchungen zur Beziehung des -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens zum Nachweis subgingivaler Bakterien

Bei Trägern des -374-TT-Genotyps wurde signifikant häufiger *P. intermedia* in der subgingivalen Plaque nachgewiesen. Nach Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche lag jedoch keine Signifikanz mehr vor ( $p=0,352$ ). Nach binärer logistischer Regression und Adjustierung für die Kovariaten Alter, männliches Geschlecht, Raucherstatus, Diabetes mellitus und Plaqueindex war der -374-TT-Genotyp jedoch mit einer signifikant erhöhten Odds-Ratio für eine Besiedelung mit *P. intermedia* assoziiert. Es konnten keine signifikanten Assoziationen der Genotypen -374-AT und -374-AA und des T-Allels zum Auftreten der untersuchten subgingivalen Bakterien gefunden werden. (Abb. 9 und Tab. 7).

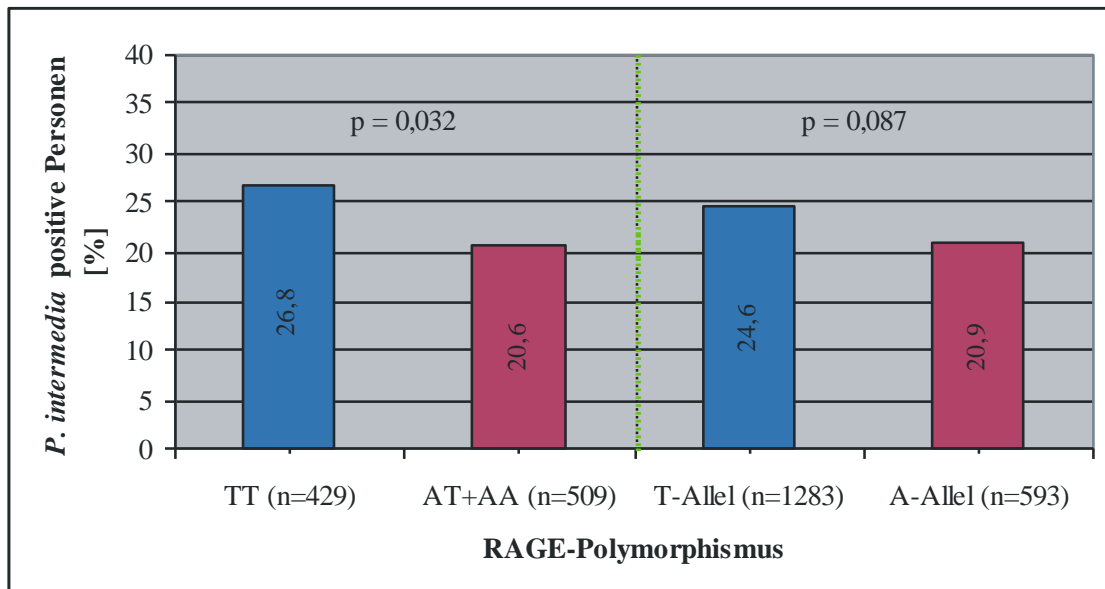


Abb. 9: Beziehung zwischen individueller Genotyp/Allel-Konstellation des -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens und dem Nachweis von elf parodontalen Markerbakterien in der gesamten Studiengruppe. Nur die Assoziation zwischen dem TT-Genotyp und *P. intermedia* war nach Chi<sup>2</sup>-Test signifikant.

Tab. 7: Binäre logistische Regression (schrittweise vorwärts) zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der individuellen Genotyp/Allel-Konstellation des -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens und der subgingivalen Präsenz von *P. intermedia* adjustiert für die Kovariaten Alter, Geschlecht, Rauchen, Diabetes und Plaqueindex in der gesamten Studiengruppe. Nur signifikante Parameter sind aufgeführt

- a) TT-Genotyp assoziiert zum individuellen Nachweis von *P. intermedia*
- b) T-Allel assoziiert zum individuellen Nachweis von *P. intermedia*

		Regressions- koeffizient	Standard -fehler	p-Wert	Odds- Ratio	95% Konfidenz- intervall
a	Alter	-0,020	0,007	0,004	0,980	0,967 – 0,993
	Plaqueindex	0,229	0,096	0,017	1,32	1,042 – 1,520
	<b>TT-Genotyp</b>	<b>0,329</b>	<b>0,156</b>	<b>0,035</b>	<b>1,39</b>	<b>1,025 – 1,887</b>
b	Alter	-0,021	0,005	<0,001	0,979	0,970 – 0,989
	Plaqueindex	0,228	0,068	0,001	1,256	1,100 – 1,435
	<b>T-Allel</b>			<b>0,090</b>		

#### 4.2.3 Statistische Untersuchungen zum Einfluss des -374-RAGE-Polymorphismus auf biochemische Parameter

Untersucht wurden CRP, Leukozytenzahl, IL-6, Kreatinin, Gesamtcholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin sowie die Triglyceride.

Keine der drei untersuchten Genotyp-Konstellationen war signifikant zum Serumspiegel der untersuchten biochemischen Parameter assoziiert.



#### 4.2.4 Statistische Untersuchungen zum Einfluss des -374-RAGE-Polymorphismus auf anamnestisch bekannte Vorerkrankungen

Untersucht wurden dabei die Allel- und alle drei Genotypkonstellationen -374-TT vs. AT/AA, -374-AT vs. AA/TT und -374-AA vs. AT/TT, um potentielle Assoziationen zu den aus der Anamnese bekannten Vorerkrankungen Diabetes mellitus, Hypertonie, Hyperlipoproteinämie, periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK), Myokardinfarkt, Schlaganfall/TIA, Carotisstenose, bekannte KHK und Gicht zu evaluieren. Dabei konnten keine signifikanten Beziehungen beobachtet werden. Tendenziell waren aber Patienten mit bereits bekannter KHK seltener Träger des -374-TT-Genotyps im Vergleich zu Patienten ohne KHK-Anamnese (43,9% vs. 51%,  $p=0,066$ ;  $\chi^2$ -Test mit Yates Korrektur).

#### 4.3 Auswertungen der Follow-Up Ergebnisse

##### 4.3.1 Assoziation der individuellen Genotyp/Allel-Konstellation zur Häufigkeit des kombinierten Endpunkts innerhalb eines Jahres Follow-Up

Im Follow-Up wurden die Ereignisse Myokardinfarkt, Schlaganfall/TIA und kardialer Tod als kombinierter Endpunkt definiert. Bei lediglich einem von 938 genotypisierten Patienten (Drop-out Rate: 0,12%) konnten keine Follow-Up-Daten erhoben werden. Bei den verbliebenen 937 Patienten stellte sich innerhalb des Beobachtungszeitraumes bei 621 Patienten kein Folgeereignis ein. Unter den anderen 316 Probanden mit Folgeereignis kam es bei 69 zum Eintritt des kombinierten Endpunkts. Im Einzelnen erlitten 20 Patienten einen Myokardinfarkt, 17 einen Schlaganfall/TIA und 32 Patienten erlitten einen kardialen Tod (Abb. 10).

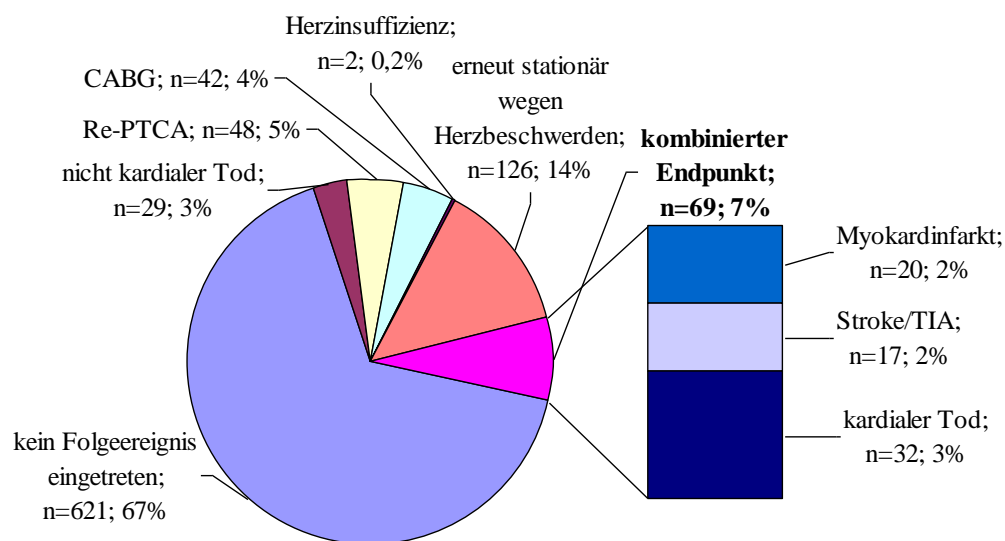


Abb. 10: Aufteilung der 316 Folgeereignisse mit Darstellung des kombinierten Endpunktes. Angabe: Folgerereignis; absolute Anzahl; relative Anzahl

CABG: *coronary artery bypass graft*, Re-PTCA: erneute perkutane transluminale koronare Angioplastie, TIA: transitorisch ischämische Attacke

Zunächst wurde nur die Häufigkeit des kombinierten Endpunkts in Abhängigkeit zur jeweiligen Genotypkonstellation untersucht, ohne die Zeit des Eintretens eines Ereignisses zu berücksichtigen.

Weder bei der Betrachtung der drei Genotypkonstellationen (AA vs. AT+TT, AT vs. AA+TT, TT vs. AT+AA), noch der einzelnen Allele A und T konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen -374T>A Polymorphismus und der Inzidenz des kombinierten Endpunkts gefunden werden. Tendenziell waren unter den Patienten, bei denen ein kardiovaskuläres Folgeereignis eingetreten ist, mehr TT-Träger (Abb. 11 und 12). Zwischen dem untersuchten Polymorphismus und Folgeereignissen außerhalb des kombinierten Endpunktes (nicht kardialer Tod, erneute perkutane transluminale koronare Angioplastie (Re-PTCA), *coronary artery bypass graft* (CABG), Herzinsuffizienz und stationäre Behandlung wegen Herzbeschwerden) gab es keine signifikanten Assoziationen (nicht dargestellt).

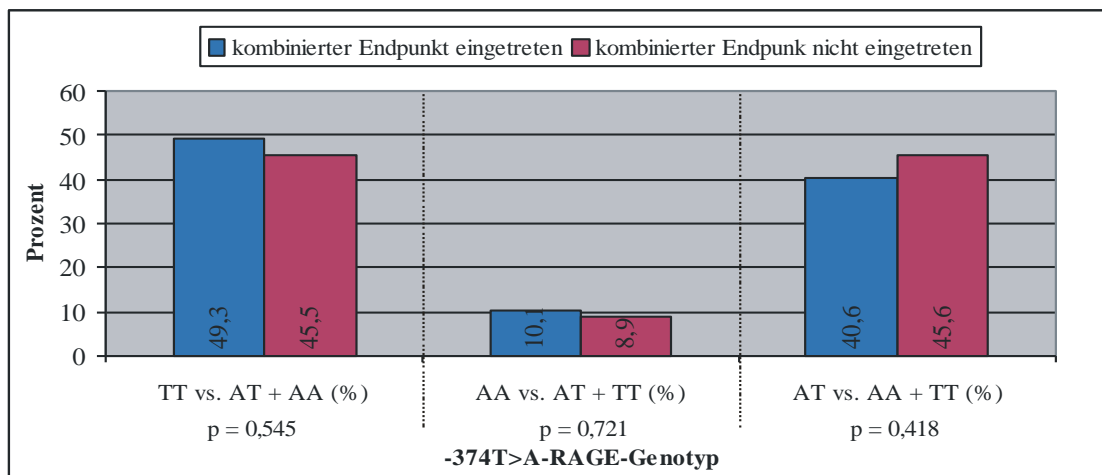


Abb. 11: Assoziation des Genotyps des untersuchten -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens zur Inzidenz des kombinierten Endpunktes in der gesamten Studiengruppe. Signifikanz: Chi<sup>2</sup>-Test mit Yates Korrektur

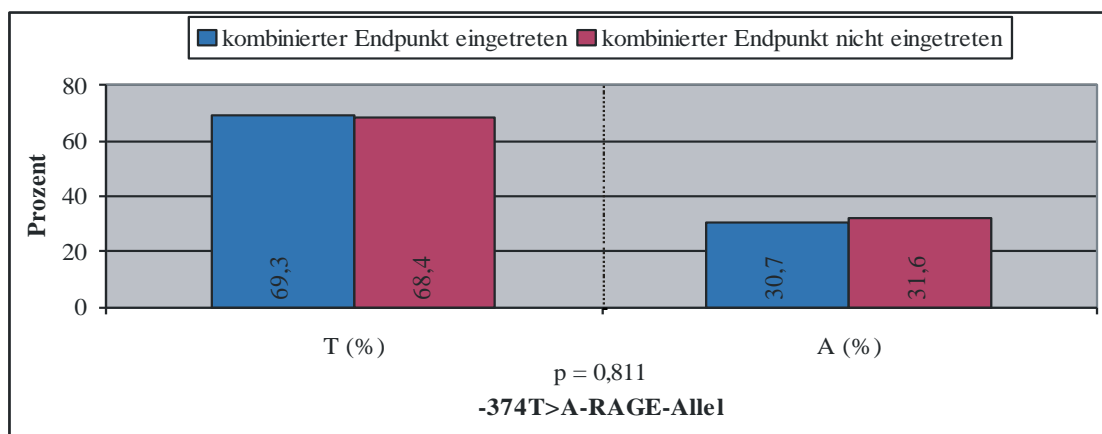


Abb. 12: Assoziation des Allels des untersuchten -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens zur Inzidenz des kombinierten Endpunktes in der gesamten Studiengruppe. Signifikanz: Chi<sup>2</sup>-Test mit Yates Korrektur

### 4.3.2 Univariate Überlebenszeitanalyse zur Inzidenz des kombinierten Endpunktes in Abhängigkeit von der individuellen Genotypkonstellation

Hier wurden die Anzahl der Endpunktereignisse und die Zeit ihres Eintretens der Genotypkonstellation gegenübergestellt. Innerhalb des Nachbeobachtungszeitraumes von einem Jahr war keiner der drei -374-RAGE-Genotypen signifikant zum kombinierten Endpunkt assoziiert. Zusätzlich wurde eine einfaktorische Hazard-Ratio in einer Cox-Regression berechnet (TT vs. AT/AA:  $p=0,501$ ,  $HR=1,175$ ; AA vs. AT/TT:  $p=0,814$ ,  $HR=1,098$ ; AT vs. AA/TT:  $p=0,418$ ,  $HR=0,821$ ). Der kombinierte Endpunkt trat jedoch bei Patienten mit TT-Genotyp tendenziell früher ein als bei AT- und AA-Trägern (73,188 Wochen vs. 76,822 Wochen)(Abb. 13).

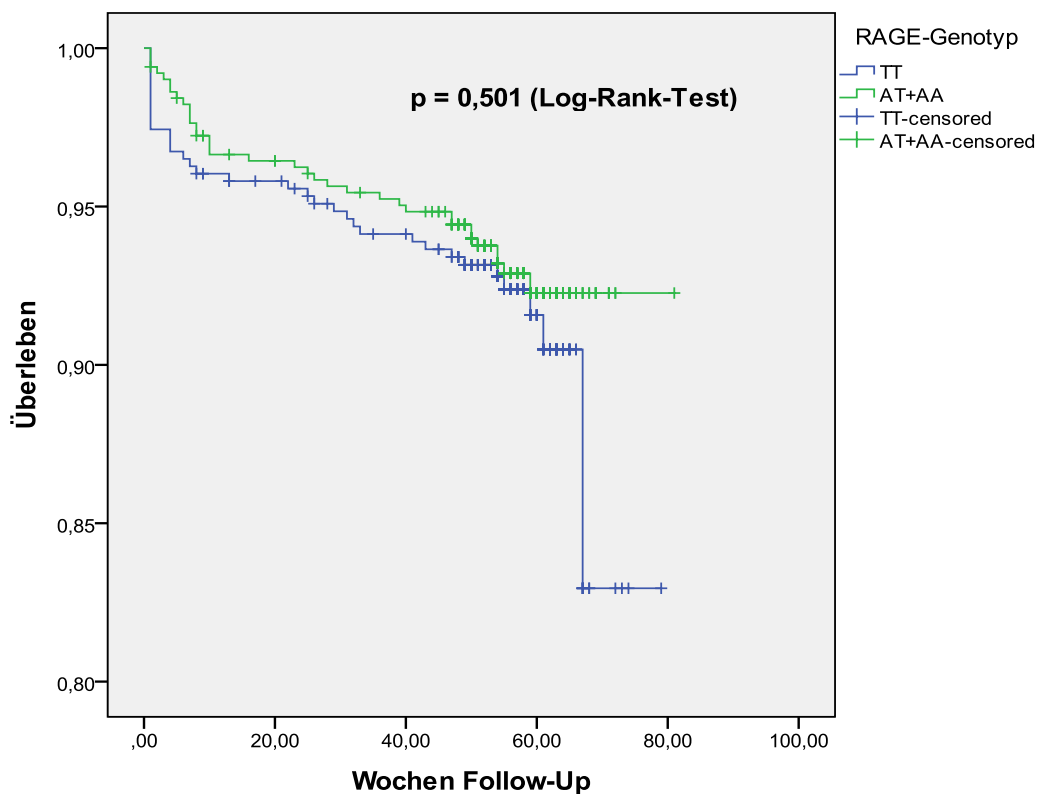


Abb. 13: Kaplan-Meier-Kurve zur Auswirkung des TT-Genotyps des -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens auf die Inzidenz des kombinierten Endpunktes.

### 4.3.3 Assoziation der Parodontitisdiagnose zur Inzidenz des kombinierten Endpunkts

Diese Untersuchung wurde in einer Parallelstudie (Dissertation Frau Andrea Lutze, in Vorbereitung) durchgeführt. Einige Ergebnisse sollen an dieser Stelle gezeigt werden, um den Einschluss der Kovariablen „schwere Parodontitis“ im multivariaten Modell zur Berechnung der adjustierten Hazard-Ratio für den -374T>A-RAGE-Polymorphismus zu begründen.

Von den 1002 in dieser Studie eingeschlossenen Patienten gelang es lediglich bei zwei Probanden nicht, ein Follow-Up-Ergebnis einzuholen (Drop-out Rate: 0,2%). Per Kreuztabelle

und Chi<sup>2</sup>-Test wurden zunächst nur die Proportionen ohne Zeitbezug untersucht. Dabei konnte kein signifikantes Ergebnis (p=0,154) erzielt werden. Es war jedoch die Tendenz erkennbar, dass bei Patienten mit schwerer Parodontitis häufiger der kombinierte Endpunkt eintrat (Tab. 8).

Tab. 8: Einflusses der Parodontitisdiagnose auf das Eintreten des kombinierten Endpunktes

		<b>kombinierter Endpunkt eingetreten</b> n (%)	<b>kombinierter Endpunkt nicht eingetreten</b> n (%)	<b>p- Wert</b>
	keine oder leichte Parodontitis (n=526)	34 (6,5)	492 (93,5)	0,154*
	schwere Parodontitis (n=474)	43 (9,1)	431 (90,9)	

\* Chi<sup>2</sup>-Test mit Yates Korrektur

#### **4.3.4 Univariate Überlebenszeitanalyse zur Auswertung des Eintretens des kombinierten Endpunktes in Abhängigkeit der Parodontitisdiagnose**

Untersucht wurde in der bereits oben genannten Parallelstudie (Dissertation Fr. Lutze, in Vorbereitung), ob eine schwere Parodontitis einen Einfluss auf die Inzidenz des kombinierten Endpunktes hatte. Dabei konnte eine Tendenz dafür gezeigt werden, dass eine schwere Parodontitis die Inzidenz des kombinierten Endpunktes erhöht. Die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant (74,737 Wochen vs. 75,337 Wochen; Log-Rank-Test: p=0,101).

#### **4.3.5 Multivariate Überlebenszeitanalyse zur Berechnung der adjustierten Hazard-Ratio des RAGE-Polymorphismus -347T>A auf die Inzidenz des kombinierten Endpunktes**

Für die multivariate Überlebenszeitanalyse der auswertbaren 937 Patientendaten wurde eine Cox-Regression durchgeführt. Neben dem -374T>A-RAGE-Polymorphismus und der qualitativen Parodontisdiagnostik wurden Alter, männliches Geschlecht, BMI, Raucherstatus und Diabetes mellitus als Kofaktoren definiert. Diese allgemein etablierten Faktoren könnten Auswirkungen auf das kardiovaskuläre Outcome haben.

Es stellten sich lediglich der BMI (p=0,042) und Diabetes mellitus (p=0,031) als signifikante Risikofaktoren für die Inzidenz des kombinierten Endpunktes heraus (Tab. 9).

Der -374-TT-Genotyp war von der Tendenz mit der Inzidenz des kombinierten Endpunktes assoziiert. Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht (p=0,575). Ebenso stellten sich die untersuchten Genotypkonstellationen -374-AT vs. AA/TT und -374-AA vs. AT/TT als nicht signifikant heraus (Daten nicht gezeigt).

Tab. 9: Cox-Regression zur Untersuchung der Assoziation des TT-Genotyps und der qualitativen Parodontitisdiagnostik zur Inzidenz des kombinierten Endpunktes adjustiert für die Kofaktoren Alter, Diabetes mellitus, BMI, Rauchen und Geschlecht

	Regressions- koeffizient	Standard- fehler	p- Wert	Hazard- Ratio	95% Konfidenz- intervall	
<b>Diabetes mellitus</b>	0,549	0,254	0,031	1,731	1,051	2,850
<b>schwere Parod.</b>	<b>0,365</b>	<b>0,250</b>	<b>0,144</b>	<b>1,440</b>	<b>0,882</b>	<b>2,351</b>
<b>TT-Genotyp</b>	<b>0,136</b>	<b>0,243</b>	<b>0,575</b>	<b>1,146</b>	<b>0,712</b>	<b>1,843</b>
<b>Alter</b>	0,002	0,013	0,863	1,002	0,977	1,028
<b>BMI</b>	-0,061	0,030	0,042	0,941	0,887	0,998
<b>Raucherstatus</b>	-0,086	0,417	0,837	0,918	0,406	2,077
<b>männl. Geschlecht</b>	-0,195	0,272	0,473	0,823	0,483	1,401

#### 4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ein Hauptziel dieser Arbeit war die Überprüfung einer möglichen Assoziation des -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens zur Prävalenz einer schweren Parodontitis unter Patienten mit KHK. Sowohl der TT-Genotyp als auch das T-Allel kamen im bivariaten Vergleich signifikant häufiger bei Probanden mit schwerer Parodontitis vor. Die im multivariaten Vergleich evaluierte Odds-Ratio von 1,63 zeigt, dass der TT-Genotyp ein möglicher Risikoindikator für eine schwere Parodontitis unter Patienten mit diagnostizierter KHK ist. Die Höhe des Risikos liegt aber unterhalb des für den Plaqueindex ermittelten Wertes. Ein weiteres Hauptziel bestand darin, zu überprüfen, ob der untersuchte Polymorphismus zur Inzidenz des kombinierten Endpunktes assoziiert war. Nach einer Follow-Up-Zeit von einem Jahr zeigte sich ohne Zeitbezug im bivariaten Vergleich die Tendenz, dass Patienten, bei denen der kombinierte Endpunkt eingetreten ist, häufiger TT-Carrier waren als Probanden, bei denen der kombinierte Endpunkt nicht eingetreten ist (49,3% vs. 45,5%,  $p=0,545$ ). Nach Durchführung einer Kaplan-Meier-Überlebensanalyse konnte diese Tendenz bestätigt werden. Der kombinierte Endpunkt trat bei Patienten mit TT-Genotyp tendenziell früher ein als bei AT- und AA-Trägern (73,188 Wochen vs. 76,822 Wochen,  $p=0,501$  nach Log-Rank-Test). In einer Cox-Regression stellten sich nur ein Diabetes mellitus und der BMI, aber nicht der -374T>A SNP als signifikante Risikofaktoren für das Auftreten des kombinierten Endpunktes dar.

Ein definiertes Nebenziel der Arbeit war die Frage der Assoziation des -374T>A Polymorphismus zum Auftreten subgingivaler Bakterien. Unter den TT-Trägern wurden signifikant mehr Personen gefunden, bei denen *P. intermedia* in der subgingivalen Plaque nachgewiesen wurde (26,8% vs. 20,6%;  $p=0,032$ ). Es konnte keine signifikante Assoziation des -374T>A Polymorphismus zu den biochemischen Parametern (CRP, IL-6, Leukozyten, Kreatinin, Gesamtcholesterin, HDL-/LDL-Cholesterin, Triglyceride) gefunden werden.

## 5. Diskussion

### 5.1 Patientenauswahl und Probandenuntersuchungen

In die vorliegende Studie wurden 1002 Probanden mit einer angiographisch festgestellten, mindestens 50%-igen Stenose einer dominanten Herzkranzarterie eingeschlossen, die in der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg stationär behandelt wurden. Bei 938 Patienten konnten Blutproben entnommen und DNA extrahiert werden. Die Patienten wurden bettseitig zahnärztlich untersucht. Dadurch mussten die Probanden nicht zu einem separaten Termin zur zahnärztlichen Untersuchung erscheinen. Zudem konnten auch immobile Patienten an der Studie teilnehmen. Nachteilig für die Untersuchung war das Fehlen einer zahnärztlichen Behandlungseinheit, wodurch auf optimale Patientenlagerung und Ausleuchtung verzichtet werden musste. Durch die parodontologische Befundung mit Bestimmung des klinischen Attachmentverlustes konnten die Probanden nach der Parodontitis-Fall-Definition von Tonetti und Claffey (2005), welche speziell für die Analyse von Parodontitis-Risikofaktoren entwickelt wurde, eingeteilt werden. Da nur 20 Patienten nicht unter einer Parodontitis litten, wurden diese der Gruppe der leichten Parodontitis zugeordnet (n=489 [52,1%]). Unter einer schweren Parodontitis litten 449 Patienten (47,9%). Auf Grundlage dieser Zuordnung erfolgten die Querschnittsuntersuchungen. Dabei wurde überprüft, ob bestimmte demografische Daten (Alter, Geschlecht, Nikotinkonsum), Vorerkrankungen wie Diabetes mellitus, biochemische Parameter (z.B. CRP, IL-6, etc.) und zahnärztliche Parameter (z.B. Plaqueindex, mikrobiologischer Befund, etc.) zur Prävalenz einer schweren Parodontitis assoziiert waren.

Um Messwertverfälschungen bei Bestimmung der Sondiertiefen, des Attachmentverlusts, des Blutungsindex bzw. des mikrobiologischen Befundes zu vermeiden, wurden nach Prüfung der Einschlusskriterien Patienten mit Antibiotikaeinnahme während der letzten drei Monate ausgeschlossen. Gleiches galt für die Einnahme von Medikamenten, die Gingivahyperplasien zur Folge haben könnten (Hydantoin, Nifedipin, Cyclosporin A, etc.). Weiterhin wurden Patienten ausgeschlossen, die in den letzten sechs Monaten vor der Untersuchung eine parodontalchirurgische Therapie (*scaling and root planing* [SRP], Lappenoperationen) erhalten hatten. Eine Schwangerschaft führte ebenfalls zum Studienausschluss, da es bedingt durch die Hormonumstellung zu einer nicht-spezifischen, proliferativen Inflammation und Einwanderung von Entzündungszellen kommen kann (Laine, 2002). Über die Bindung an Rezeptoren parodontaler Zellen kann die Zunahme der Geschlechtshormone Östrogen und Progesteron zu erhöhter Gefäß- und Zellproliferation, zu dosisabhängigen pro- oder antiinflammatorischen Effekten (u.a. durch Änderung der Zytokinsynthese) und einer Veränderung der PMN-Funktion führen (Wu et al., 2015). Zudem wird auch ein Einfluss der o.g. Hormone auf subgingivale

Bakterien diskutiert. So korrelierte ein Anstieg der Speichel-Progesteron-Konzentration vom ersten zum zweiten Trimenon mit einem erhöhten Auftreten des subgingival nachgewiesenen *P. gingivalis* (Carrillo-de-Albornoz et al., 2010). Weiterhin kann es zu einer hormonabhängigen Abnahme der Gingivakeratinisierung kommen (Abraham-Inpijn et al., 1996).

Die klinischen Untersuchungen wurden von zwei approbierten Zahnärzten durchgeführt, die umfassend in die Erhebung der Messdaten eingewiesen wurden. Zur Bestimmung der Sondertiefen und des Attachmentverlustes wurde eine druckkalibrierte Sonde in Millimeter-Einteilung (DB764R Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Germany) verwendet, um Messfehler, die auf einen unterschiedlichen Sondierdruck zurückzuführen sein könnten, zu vermeiden. Der Sondierdruck betrug 0,25N.

Die Genotypanalyse des -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens wurden nach dem Prinzip des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine etablierte molekularbiologische Methode zur sicheren und kostengünstigen Bestimmung einzelner Genotypen eines SNPs.

Die von HAIN Lifescience, Nehren (Deutschland) durchgeführte mikrobiologische Diagnostik liefert im Ergebnisprotokoll Informationen darüber, ob die Menge bakterieller DNA (*genome equivalents*) in der Plaqueprobe „unter der Nachweisgrenze“, „an der Nachweisgrenze“, „erhöht“, „stark erhöht“ oder „sehr stark erhöht“ war. In der vorliegenden Studie wurde ein Bakterium dann als nachgewiesen interpretiert, wenn es mindestens „an der Nachweisgrenze“ lag. Auf eine weitere Quantifizierung entsprechend der anderen genannten Kriterien wurde aufgrund der semiquantitativen Messung der *genome equivalents* verzichtet.

In der primär postalisch erfolgten Follow-Up-Untersuchung wurden die Patienten um Beantwortung eines Fragebogens (siehe Anhang) gebeten. Blieb eine Rückmeldung aus, wurde versucht, die Informationen durch ein Telefoninterview zu erfragen. Im Todesfall war es möglich, durch die Einbeziehung von Hausärzten, Kliniken und Standesämtern die Todesursache zu evaluieren. Insgesamt konnten bei 1000 von 1002 KHK-Patienten, die in die Studie eingeschlossen wurden, Follow-Up-Daten ermittelt werden. Dies entsprach einer sehr niedrigen Drop-out Rate von 0,2%.

## **5.2 Auswertung der Querschnittsuntersuchungen in Bezug zur parodontalen Diagnose**

### **5.2.1 Demografische Daten der Studienteilnehmer**

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Tonetti und Claffey (Tonetti und Claffey, 2005) das Vorhandensein eines approximalen Attachmentverlustes von 5mm oder höher an mindestens 30% der Zähne als schwere Parodontitis definiert. Da nur approximale Flächen bewertet wurden, konnte mit hoher Sicherheit ein Attachmentverlust, der nicht auf Parodontitis

zurückzuführen ist, ausgeschlossen werden. Dazu zählten z.B. vestibuläre Gingivarezessionen infolge traumatischen Zähneputzens oder einer kieferorthopädischen Therapie.

In der vierten deutschen Mundgesundheitsstudie war die Prävalenz einer schweren Parodontitis in der Altersgruppe der 65-74-jährigen mit 39,8% (Micheelis, 2011) geringer als unter unseren Patienten mit KHK (47,8%; Altersmittelwert: 67 Jahre). Dies könnte auch auf methodische Unterschiede (Definition der Altersgruppen, Definition schwere Parodontitis, Messung des Attachmentverlustes) zurückzuführen sein. Deshalb erlaubt die vorliegende Studie nicht die Schlussfolgerung, dass unter KHK-Patienten generell eine höhere Prävalenz von Patienten mit schwerer Parodontitis vorliegt, im Vergleich zur Normalbevölkerung.

Patienten mit schwerer Parodontitis waren zu 16,0% aktive Raucher, wohingegen der Raucheranteil der Probanden ohne oder mit leichter Parodontitis nur 9,0% betrug ( $p=0,002$ ). Im multivariaten Vergleich unter Einbeziehung anderer Kovariaten für Parodontitis und Anwendung der binär-logistischen-Regression bestätigte sich die Assoziation aktives Rauchen zur Prävalenz einer schweren Parodontitis jedoch nicht ( $p=0,098$ ). Nur der Plaqueindex und der RAGE-TT-Genotyp waren signifikant zur Prävalenz einer schweren Parodontitis assoziiert.

Wie bereits seit 1958 bekannt (Arno et al., 1958), gilt das Rauchen als einer der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung einer Parodontitis (Kocher et al., 2005), wobei neben dem Nikotin vermutlich auch Nebenprodukte (z.B. Kohlenstoffmonoxid) eine schädliche Rolle spielen (Mullally, 2004; Eggert et al., 2001). Rauchen ist mit einem verringerten IgG<sub>2</sub>-Serumspiegel assoziiert. (Marazita et al., 1996). IgG<sub>2</sub> ist u.a. bedeutsam in der Immunreaktion gegen *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* (Tangada et al., 1997). Bei Rauchern wurde zudem eine erhöhte Anzahl von RAGE auf der Oberfläche bioptisch entnommener gingivaler Epithelzellen im Vergleich zu Nichtrauchern gefunden (Katz et al., 2007). Nach Stimulierung durch bakterielle Polysaccharide kann es bei Rauchern zu einer gegenüber Nichtrauchern gesteigerten NF- $\kappa$ B-Produktion und Zytokin-Ausschüttung und somit verstärkten Endzündungsreaktion kommen.

Eventuell konnte der Raucherstatus in der vorliegenden Studie nicht als unabhängiger Risikofaktor für schwere Parodontitis nachgewiesen werden, da die Höhe der Odds-Ratio sowie die Signifikanz von der Zusammenstellung des multivariaten Modells abhängig ist und die Kofaktoren Plaqueindex bzw. Genotyp einen größeren Einfluss als Rauchen auf die Prävalenz einer schweren Parodontitis hatten. Die Höhe einer Odds-Ratio für einen parodontalen Risikofaktor und auch deren Signifikanz ist zudem auch abhängig von der jeweiligen Definition eines Parodontitisfalles. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete dichotome Einteilung in keine/leichte Parodontitis versus schwere Parodontitis ist tatsächlich eine Vereinfachung der klinischen Situation, da z.B. auch Übergangsformen zwischen milder und schwerer Parodontitis beobachtet werden konnten.



Das männliche Geschlecht war in unserer Studie im bivariaten Vergleich signifikant häufiger von einer schweren Parodontitis betroffen. Eine Erklärung dafür wäre, dass Männer einen signifikant höheren Plaqueindex (nach Silness und Loe) im Vergleich zu Frauen hatten (Mittelwert: 1,13 vs. 0,86;  $p=0,003$  nach Mann-Whitney-U-Test). Tendenziell waren Männer zudem häufiger aktive Raucher (13,5% vs. 9,0%;  $p=0,065$  nach Chi<sup>2</sup>-Test mit Yates Korrektur). Eine weitere mögliche Ursache für den beobachteten Geschlechtsunterschied hinsichtlich der Prävalenz einer schweren Parodontitis könnte die von Geschlechtshormonen abhängige Expression von Genen der Immunantwort sein (Shiau und Reynolds, 2010).

### **5.2.2 Assoziation anamnestisch erhobener Vorerkrankungen zur parodontalen Diagnose**

Patienten mit schwerer Parodontitis litten signifikant häufiger unter einer bereits bekannten KHK und hatten schon öfter einen Myokardinfarkt erlebt. Diese Ergebnisse sind konsistent mit vorangegangenen Studien (siehe Meta-Analyse Humphrey et al.), die eine Assoziation zwischen einer schweren Parodontitis und KHK bzw. Myokardinfarkt zeigten (Humphrey et al., 2008).

Patienten mit schwerer Parodontitis litten tendenziell häufiger auch unter einem Diabetes mellitus (37,0% vs. 31,5%;  $p=0,089$ ). Die fehlende Signifikanz ist möglicherweise darin begründet, dass auch der Schweregrad des Diabetes einen Einfluss auf die Parodontitis hat. Insulinpflichtige Patienten litten in unserer Untersuchung signifikant häufiger unter einer schweren Parodontitis (20,7% vs. 14,3%;  $p=0,013$ ) im Vergleich zu Nichtdiabetikern.

Die Abhängigkeit zwischen Diabetes mellitus und Parodontitis scheint nach der aktuellen Literatur bidirektional zu sein (Bascones-Martinez et al., 2015). Bei Vorliegen eines Diabetes mellitus werden vermehrt AGEs gebildet. Binden diese an ihren Rezeptor, kommt es neben einer gesteigerten Inflammation auch zu einer Apoptose von Matrix-produzierenden Zellen wie Fibroblasten und Osteoblasten (Graves et al., 2007). Auch eine direkte Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch eine Hyperglykämie wurde nachgewiesen. In Glukoselösung inkubierte humane Monozyten zeigten eine gesteigerte Ausschüttung von IL-6 und TNF $\alpha$  (Morohoshi et al., 1996). Zugleich wird von einem negativen Einfluss der Parodontitis auf Diabetes-assoziierte Komplikationen berichtet (Negrato et al., 2013).

Der insulinpflichtige Patient, bei dem häufig eine schlechtere glykämische Einstellung beobachtet wird (Bashan et al., 2015), könnte u.a. über eine verstärkte HbA<sub>1c</sub>-Produktion (Hämoglobin A<sub>1c</sub>) ein höheres Risiko besitzen, eine schwere Parodontitis zu entwickeln als Patienten, die lediglich mit Tabletten eingestellt werden oder nur eine diabetesgerechte Ernährung einhalten müssen. Auch Negrato et al. zeigten eine Verschlechterung der Parodontitis in Abhängigkeit zur glykämischen Einstellung (Negrato et al., 2013). Eine schlechte glykämische Einstellung fördert nicht nur die Produktion von HbA<sub>1c</sub> sondern auch die Akkumulation von AGEs (Turk et al., 1998). Diese triggern über die Bindung an RAGE einerseits die Entzündungskaskade und führen andererseits auch zu einer Quervernetzung

(*crosslinks*) von Kollagen. Folgen sind Funktionseinschränkungen der Extrazellulärmatrix und ein erschwerter Ab- und Umbau sowie eine verzögerte Erneuerung des parodontalen Bindegewebes (Gelse et al., 2003; Zieman und Kass, 2004; Nass et al., 2007). Zudem wird durch diese Quervernetzung auch eine zunehmende Versteifung des arteriellen Gefäßsystems beobachtet. Die Messung des dadurch bedingten Anstiegs der Pulswellengeschwindigkeit ist ein guter Prädiktor der kardiovaskulären Dysfunktion (Hofmann et al., 2014).

### **5.2.3 Biochemische Daten**

Da die Parodontitis als Infektionserkrankung auch mit einer Erhöhung allgemeiner Entzündungsparameter einhergeht (Loos et al., 2000; Paraskevas et al., 2008), war die Prävalenz einer schweren Parodontitis erwartungsgemäß mit signifikant höheren Serumspiegeln für IL-6 und CRP assoziiert.

IL-6 wird von verschiedenen Zelltypen produziert (Lymphozyten, Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen) und gilt als Aktivator der Leukozyten-Rekrutierung. Es führt zur Initiation der Blutgerinnungskaskade und stimuliert unter anderem die Synthese von CRP. Die Erhöhung des CRP-Serumspiegels gegenüber dem Normwert sowohl bei Patienten ohne oder mit leichter Parodontitis, als auch bei Patienten mit schwerer Verlaufsform könnte auf das Studienkollektiv von ausschließlich KHK-Patienten zurückzuführen sein. Obwohl ein erhöhter CRP-Serumspiegel ein Risikofaktor für KHK ist, kann die KHK selbst Ursache für eine CRP-Erhöhung sein (Strang und Schunkert, 2014).

Die Analyse der Daten der vorliegenden Studie bestätigt die aus anderen Studien (Loos et al., 2000; Pejic et al., 2011) bekannte Assoziation zwischen dem Schweregrad der Parodontitis und den Serumspiegeln für IL-6 und CRP. Zusammenfassend zeigten unsere Untersuchungen, dass Patienten mit KHK generell erhöhte Serumwerte für IL-6 und CRP hatten und dass diese Werte zusätzlich mit der Schwere und Ausdehnung der Parodontitis assoziiert waren.

### **5.2.4 Klinische Daten**

Sondiertiefen und Attachmentverlust wurden trotz bettseitiger Untersuchung in 6-Punkt-Messung unter Verwendung einer druckkalibrierten Messsonde bestimmt. Dadurch war eine zuverlässige Erfassung der Ausprägung und des Schweregrades der Parodontitis möglich. Die Proben für die mikrobiologischen Untersuchungen wurden mit sterilen Papierspitzen aus der jeweils tiefsten Tasche pro Quadrant entnommen. Diese Durchführung erlaubt eine sichere Detektion subgingivaler bakterieller DNA (Beikler et al., 2006).

Die pathogene Plaque ist der primäre ätiologische Faktor der Parodontitis. Dies wird durch die Assoziation des ermittelten Plaqueindex nach Sillnes und Löe und der Parodontitisdiagnose bestätigt (1,40 bei der schweren Form der Parodontitis; 0,75 bei Patienten ohne oder mit leichter Parodontitis;  $p < 0,001$ ). Einschränkend muss jedoch bemerkt werden, dass mit dem verwendeten

Plaqueindex nur die supragingivale, aber nicht die für die Ätiologie der Parodontitis bedeutendere subgingivale Plaque erfasst wurde. Der höhere Sondierblutungsindex (12,37 vs. 7,28;  $p < 0,001$ ) bei Probanden mit schwerer Parodontitis zeigt den Zusammenhang zwischen dem Entzündungsgrad des Parodonts und der Ausprägung der Parodontitis. Weitere Studien bestätigen die Assoziation zwischen erhöhtem Plaqueindex bzw. Sondierblutungsindex und Parodontitis (Vielkind et al., 2015; Camelo-Castillo et al., 2015).

Die höhere Zahl fehlender Zähne bei Patienten mit schwerer Parodontitis (14,53 vs. 8,95;  $p < 0,001$ ) deutet darauf hin, dass Schwere und Ausdehnung einer Parodontitis das Risiko für Zahnverlust erhöhen. Dies wurde bereits in einer anderen Studie bestätigt. Diese zeigte, dass zunehmender Attachmentverlust mit einem steigenden Risiko für Zahnverlust einhergeht (Gilbert et al., 2002).

Patienten mit schwerer Parodontitis hatten signifikant mehr kariöse Zähne (0,39 vs. 0,20;  $p = 0,003$ ) und signifikant weniger gefüllte Zähne (4,17 vs. 7,0;  $p < 0,001$ ) als die Vergleichsgruppe. Zusammenfassend kann anhand des erhöhten DMF-T-Indexes (19,09 vs. 16,09) ein reduzierter Gebisszustand bei Patienten mit schwerer Parodontitis konstatiert werden.

### **5.2.5 Parodontopathogene Bakterien**

Die Ausbildung eines pathogenen Biofilmes mit einem hohen Anteil überwiegend strikt anaerober Bakterien induziert eine lokale Immunantwort, die oft nicht in der Lage ist, die pathogenen Mikroorganismen ausreichend zu reduzieren, um eine gesunde Mundhöhlenflora zu etablieren. Stattdessen fördert sie durch die Abgabe von Entzündungsmediatoren durch Zellen des Immunsystems die Destruktion des Zahnhalteapparates.

Die Mundhöhle ist mit einer Vielfalt von ca. 19.000 verschiedenen Phylotypen besiedelt (Keijsers et al., 2008), von denen jedoch nur ein Teil direkt mit parodontalen Destruktionen in Verbindung gebracht wird (Socransky und Haffajee, 1994). Zu den Hauptleitkeimen der Parodontitis gehören *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* (Socransky et al., 1998). Diese drei, den roten Komplex bildenden Spezies, stellten sich auch in dieser Studie im bivariaten Vergleich als signifikant erhöht bei Vorliegen einer schweren Parodontitis dar. Auch *P. intermedia*, *P. micros*, *C. rectus* und *E. nodatum*, die dem orangenen Komplex zugeordnet sind, zeigten sich signifikant assoziiert zur Schwere der Parodontitis. Bakterien des orangenen Komplexes stellen nach Socransky et al. Brückenbakterien dar und sind entscheidend bei der nachfolgenden Etablierung von Bakterien des roten Komplexes. Auch in der Literatur wurde eine positive Assoziation zwischen dem erhöhten Vorkommen von Bakterien des orangenen und roten Komplexes und erhöhten Sondiertiefen beschrieben (Socransky et al., 1998). Das vermehrte Auftreten parodontopathogener Bakterien bei Patienten mit schwerer Parodontitis zeigt, dass eine stärkere bakterielle Besiedlung mit dem Schweregrad der Parodontitis assoziiert ist.

*A. actinomycetemcomitans* kam von der Tendenz bei Patienten mit schwerer Parodontitis weniger häufig vor, als bei Patienten, die eine milde oder keine Parodontitis hatten (9,1% vs. 10,8%,  $p=0,447$ ). Eine Ursache dafür könnte sein, dass *A. a.* vorwiegend bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen mit lokalisierter aggressiver Parodontitis auftritt (Herbert et al., 2015). Ein weiterer Grund könnte der fakultativ anaerobe Stoffwechsel des *A. a.* sein. Im zeitlichen Verlauf einer Parodontitis scheint der Einfluss des *A. a.* im Vergleich zu strikt anaeroben Bakterien abzunehmen (Aberg et al., 2015).

### **5.3 Untersuchungen zum -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens in den**

#### **Querschnittsuntersuchungen**

##### **5.3.1 Assoziation des -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens zur Parodontitis**

Nachdem eine Forschergruppe um Hudson feststellte, dass im Promotor des RAGE-Gens der in dieser Arbeit untersuchte -374T>A Polymorphismus zu einer Veränderung der Promotoraktivität führt (Hudson et al., 2001), könnte dies auch Auswirkungen auf die Parodontitis haben.

RAGE ist unter anderem assoziiert mit einer verstärkten Entzündungsreaktion, begründet durch eine gesteigerte Expression von proinflammatorischen Zytokinen, die durch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B vermehrt gebildet werden (Hofmann et al., 1999; Nah et al., 2007). Die grundlegende Frage ist, welche Auswirkungen der untersuchte Polymorphismus auf die Aktivität des Promotors und damit auf die RAGE-Expression hat. Diese Auswirkung wird kontrovers diskutiert und konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Während Hudson von einer durch das A-Allel erhöhten Promotoraktivität ausgeht (Hudson et al., 2001), wird in einer anderen Untersuchung eine A-Allel-vermittelte verringerte RAGE-Expression vermutet (Martens et al., 2012). Eine italienische Forschergruppe vermutet eine T-Allel abhängige gesteigerte RAGE-Expression (Campo et al., 2007).

Eine verringerte Promotoraktivität könnte zu einer Abnahme der Immunaktivität führen. Dadurch könnte eine verminderte Erregerabwehr, aber eventuell auch eine verminderte parodontale Destruktion folgen, da das Immunsystem für einen Teil des Abbaus parodontalen Gewebes selbst verantwortlich ist. Dabei spielen sowohl die Sezernierung von MMPs, welche zum proteolytischen Abbau von Kollagen und Fibronectin führen (Birkedal-Hansen, 1993), als auch die Ausschüttung von TNF $\alpha$ , IL-1 und IL-6 abhängige Osteoklastenfunktion eine Rolle (Gillespie, 2007). Die gesteigerte Promotoraktivität würde gegenteilige Effekte haben.

Im Hauptergebnis wurde in der vorliegenden Studie eine signifikante Assoziation zwischen dem untersuchten Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens und dem Schweregrad der Parodontitis festgestellt. Patienten mit schwerer Parodontitis waren signifikant häufiger Träger

des TT-Genotyps. Diese Beziehung wurde auch nach binärer logistischer Regression und Adjustierung für etablierte Risikofaktoren für Parodontitis bestätigt.

In einer Parallelstudie der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie wurde das T-Allel als möglicher Risikofaktor für eine aggressive Parodontitis identifiziert (Stosberg et al., 2011). Als Ursache wurde eine durch das T-Allel verringerte Promotoraktivität vermutet.

### **5.3.2 Ergebnisse anderer Assoziationsmodelle des -374T>A Polymorphismus**

In den meisten Studien wurde das A-Allel bzw. der AA-Genotyp als protektiver Faktor für verschiedene Erkrankungen identifiziert. Eine Kaplan-Meier-Untersuchung in einer italienischen Probandengruppe ergab, dass Patienten mit dem AA-Genotyp erst später einen Myokardinfarkt als AT- oder TT-Träger erlitten ( $p=0,002$ ) (Boiocchi et al., 2011). Pettersson-Fernholm und Kollegen untersuchten den Zusammenhang zwischen dem -374T>A SNP und KHK bei Patienten mit Typ-I-Diabetes. Dabei fanden sie heraus, dass bei Probanden mit schlecht eingestelltem Diabetes und AA-Genotyp sowohl kardiovaskuläre Erkrankungen als auch ein akuter Myokardinfarkt seltener auftraten. Daraus folgerten sie eine protektive Rolle des AA-Genotyps für diabetische Komplikationen. Damit stellt er einen Marker für einen geringeren Grad der Atherosklerose bei Typ-I-Diabetikern dar (Pettersson-Fernholm et al., 2003). Lu und Feng schlussfolgerten in einer Meta-Analyse (kaukasische, chinesische, asiatische und afrikanische Probanden), dass der AA-Genotyp ein schützender Faktor für den Eintritt eines diabetisch bedingten kardiovaskulären Ereignisses besonders bei Kaukasiern ist (Lu und Feng, 2010). Dagegen wurde in einer slowenischen Studie kein Zusammenhang zwischen dem untersuchten RAGE-374T>A SNP und dem Auftreten einer KHK festgestellt (Kirbis et al., 2004).

In einer niederländischen Studie wurde ein Einfluss des -374T>A Polymorphismus auf die Ausbildung eines systemischen Lupus erythematoses (SLE) nachgewiesen. Der Polymorphismus hatte einen signifikanten Effekt auf die Transkriptionsrate des RAGE-Gens. Das T-Allel stellte sich als signifikant assoziiert zum SLE gegenüber der Kontrollgruppe dar. Die Forschergruppe vermutete eine durch das A-Allel verringerte RAGE-Expression und eine damit einhergehende verminderte Immunantwort (Martens et al., 2012).

Bei italienischen Patienten mit Sarkoidose fanden Campo und Kollegen eine Häufung von -374-TT und AT-Genotypen (Campo et al., 2007).

2012 fassten Yuan und Kollegen in einer Meta-Analyse, in der sieben Studien die Einschlusskriterien erfüllten, zusammen, dass es einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem -374T>A SNP und diabetischer Retinopathie gibt (Yuan et al., 2012). Die Forschergruppe fand einen schützenden Effekt sowohl für das A-Allel als auch den AA-Genotyp.

Auch für das Auftreten der Multiplen Sklerose (MS) wurde der -374-AA-Genotyp als protektiver Faktor identifiziert (Tiszlavicz et al., 2009).

Daneben gibt es aber auch Studien, allerdings von geringerer Anzahl, die das A-Allel bzw. den AA-Genotyp als Risikofaktor identifiziert hatten oder dem T-Allel/TT-Genotyp einen schützenden Effekt zuschrieben. So konnte bei Patienten mit vaskulären chronischen Nephropathien eine signifikante Assoziation des A-Allels zu eingeschränkter Nierenfunktion nachgewiesen werden (Baragetti et al., 2013). Außerdem wurde im Kontrast zu den bereits zitierten Studien von Pettersson-Fernholm (2003) und Lu und Feng (2010) das A-Allel auch als Risikofaktor für eine KHK bei Patienten mit Diabetes mellitus identifiziert (Kucukhuseyin et al., 2009). Ebenso wurde bei männlichen Patienten mit Diabetes mellitus und Hypertonie das A-Allel als unabhängiger Risikofaktor für eine KHK identifiziert (Kawai et al., 2013). Der TT-Genotyp war in einer weiteren Studie mit einem reduzierten Risiko eines nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms assoziiert (OR=0,63;  $p < 0,005$ ) (Wang et al., 2012b).

Zusammenfassend stellte die Mehrzahl der Untersuchungen eine protektive Rolle des selteneren -374-AA-Genotyps bei KHK, SLE, Sarkoidose, diabetischer Retinopathie und MS fest. Dies entspricht dem in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnis der Assoziation von TT-Genotyp bzw. T-Allel zur schweren Parodontitis, während der AA-Genotyp hier seltener nachweisbar war.

### **5.3.3 Biologische Plausibilität der Assoziation des -374T>A SNP zur schweren Parodontitis**

RAGE befindet sich auf unterschiedlichen Zelltypen, sodass der Polymorphismus Auswirkungen auf T-Lymphozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten haben könnte, die alle im parodontalen Gewebe vorkommen (Lalla et al., 2000). Unter physiologischen Bedingungen befindet sich nur wenig RAGE auf der Oberfläche dieser Zellen. Eine durch Bakterien induzierte Aktivierung von Makrophagen triggert über NF- $\kappa$ B die Ausschüttung von Zytokinen wie IL-1, TNF $\alpha$  und Prostaglandinen (Page, 1991). LPS oder Lipoproteine auf der Bakterienoberfläche werden u.a. durch Toll-like-Rezeptoren (Medzhitov, 2001), Scavenger-Rezeptoren (Peiser et al., 2002) oder C-Typ Lektin-Rezeptoren (CLR) (McGreal et al., 2005) erkannt.

RAGE selbst kann LPS-Rezeptoren binden (Yamamoto et al., 2011) und über NF- $\kappa$ B-Aktivierung die Expression proinflammatorischer Zytokine fördern. Zusätzlich kommt es zur direkten Ausschüttung von RAGE-Liganden wie HMGB-1 und S100-Proteinen durch Entzündungszellen (Bierhaus et al., 2005). Eine Aktivierung von RAGE kann auch zur Ausschüttung von Sauerstoffradikalen führen (Wautier et al., 2001), die ihrerseits wieder die Expression des sauerstoffsensitiven NF- $\kappa$ B fördern. NF- $\kappa$ B stellt einen Transkriptionsfaktor für

RAGE dar. Durch die Aktivierung des Immunsystems wandelt RAGE eine akute Entzündung in eine chronische zelluläre Immunantwort um (Bierhaus et al., 2005). Eine durch einen Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens verursachte Aktivitätsänderung verstärkt diesen Effekt möglicherweise zusätzlich.

Dabei ist durch eine gesteigerte RAGE-Aktivität von einer erhöhten Makrophagenmigration in das parodontale Gewebe einschließlich gesteigerter TNF $\alpha$ -Produktion auszugehen. Das Endothel reagiert mit erhöhter Permeabilität und forcierter Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 (Schmidt et al., 1995; Wautier et al., 1996). Die gingivalen Fibroblasten antworten (stimuliert durch  *$\beta$ 2-microglobulin modified with AGEs*) mit verringerter Produktion von Kollagen Typ I (Owen jr. et al., 1998) und gesteigerter MMP-Sekretion (Lalla et al., 2000). Eine durch RAGE vermehrte NF- $\kappa$ B-Bildung kann außerdem zur erhöhten Osteoklastenaktivität führen (Leibbrandt und Penninger, 2008). Zudem ist neben der Bildung von IL-1 und IL-6 eine RAGE-vermittelte gesteigerte Expression des chemotaktischen Zytokins IL-8 denkbar, was zur Mobilisierung und Degranulation neutrophiler Granulozyten führt.

In einer In-vitro-Studie an humanen Monozyten (THP-1-Zelllinie) wurde festgestellt, dass glykiertes Albumin zu einer gesteigerten Synthese von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  führt. Eine zusätzliche Inkubation mit bakteriellem LPS verstärkte diesen Effekt. Durch Blockierung von RAGE durch Antikörper wurde diese gesteigerte Produktion jedoch reduziert. Dieses Ergebnis erlaubt die Schlussfolgerung, dass RAGE tatsächlich ein proinflammatorisches Potential besitzt und einen Einfluss auf Parodontitis haben kann (Shim und Babu, 2015).

Zusätzlich zur Betrachtung der Auswirkung des Polymorphismus auf die Promotoraktivität ist zu bedenken, dass neben dem flRAGE auch Varianten ohne intrazelluläre Domäne (dnRAGE), ohne extrazelluläre Domäne (ntRAGE) und die nicht membranständigen Formen sRAGE und esRAGE existieren. Bei dnRAGE, sRAGE und esRAGE ist davon auszugehen, dass nach Ligandenbindung keine intrazelluläre Signalweiterleitung stattfindet. So könnte eine gesteigerte Anzahl aller RAGE-Isoformen durch den Promotorpolymorphismus dazu führen, dass die tatsächliche Auslösung der intrazellulären Signalkaskade abnimmt, da RAGE-Aktivatoren auch an RAGE-Isoformen ohne intrazelluläre Domäne gebunden werden. Die gebundenen Liganden stehen folglich nicht mehr für die Bindung an flRAGE zu Verfügung. Eine Untersuchung über die Hemmung der RAGE-Aktivierung durch sRAGE bestätigt dies. So konnte gezeigt werden, dass sRAGE zu reduzierter akuter und chronischer Entzündung beiträgt (Yang et al., 2014). Falcone et al. fanden, dass geringere Plasmaspiegel von sRAGE mit einer erhöhten KHK-Inzidenz verbunden sind (Falcone et al., 2005).

Zudem scheinen unterschiedliche RAGE-Aktivatoren einen differierenden Effekt auf die verschiedenen RAGE-Varianten zu haben. Während in einer Untersuchung an Endothelzellen *humanes methylglyoxal-modifiziertes-Serumalbumin* (MG-HSA) die Expression von flRAGE, ntRAGE und esRAGE stimuliert, führt *humanes carboxymethyllysin-Serumalbumin* (CML-

HSA) nicht zu einer Stimulation der esRAGE-mRNA-Expression. So könnte die MG-HSA-induzierte verstärkte Expression von esRAGE durch das Abfangen von Liganden zu einer negativen Rückkopplung der RAGE-Aktivierung führen (Grossin et al., 2009).

Die Aktivierung von RAGE führt also vermutlich einerseits zu einer Progression der Parodontitis (verursacht durch gesteigerte Produktion von IL-1, IL-6, MMP's, erhöhte Osteoklastenaktivität, verminderte Kollagen-Typ-I-Produktion), aber andererseits zu einer besseren Erregerbekämpfung durch Aktivierung des Immunsystems. Dabei führt wahrscheinlich das Überwiegen eines Effektes zur zunehmenden Destruktion des Zahnhalteapparates.

Zusammenfassend ist zu vermuten, dass ein Gleichgewicht zwischen negativer und positiver Regulation der Expression des RAGE-Gens auch zu physiologisch ausbalancierten Effekten des Immunsystems führt. Da die Immunantwort sowohl eine Reduzierung der Pathogene bewirkt, als auch für einen Bindegewebs- und Knochenabbau verantwortlich ist, könnten alle Abweichungen der Homöostase dementsprechend zur verstärkten Progression der Parodontitis führen.

#### **5.3.4 Assoziation des -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens zum Auftreten von *P. intermedia***

Genetische Faktoren wirken auf die Progredienz der Parodontitis unter anderem über die Beeinflussung des körpereigenen Immunsystems, welches für die Reduzierung von parodontopathogenen Bakterien verantwortlich ist. Dies ist auch beim untersuchten Polymorphismus des RAGE-Gens zu vermuten. Daher wurde in dieser Studie der Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und der Besiedlung durch parodontopathogene Bakterien untersucht. Es stellte sich bei mehreren Spezies eine Tendenz zu verstärktem Auftreten bei Vorhandensein des TT-Genotyps dar. Der TT-Genotyp war nach Adjustierung für etablierte Risikofaktoren signifikant mit *P. intermedia* assoziiert und erwies sich somit als unabhängiger Risikofaktor für die subgingivale Besiedlung mit *P. intermedia*. Eine durch den TT-Genotyp veränderte Immunantwort könnte zur verstärkten Präsenz von *P. intermedia* führen.

#### **5.3.5 Assoziation des -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens zu biochemischen Parametern und anamnestisch bekannten Vorerkrankungen**

Eine Assoziation zwischen dem -374T>A Polymorphismus und den gemessenen biochemischen Parametern (CRP, Leukozytenzahl, IL-6, Kreatinin, Gesamtcholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin sowie Triglyceride) konnte nicht gezeigt werden. Wahrscheinlich hatte die akute KHK-Situation, in der sich der Patient während der Blutentnahme befand, einen größeren Einfluss auf die gemessenen Parameter als der Genpolymorphismus.



In der vorliegenden Arbeit konnten keine Assoziationen zwischen dem -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens und der Prävalenz von der aus der Anamnese der KHK-Patienten bekannten Vorerkrankungen (Diabetes mellitus, Hypertonie, Hyperlipoproteinämie, PAVK, Myokardinfarkt, Schlaganfall/TIA, Carotisstenose, anamnestisch bekannte KHK und Gicht) identifiziert werden. Der Effekt des genetischen Polymorphismus auf das Erkrankungsrisiko lag offenbar unter dem anderer etablierter Risikofaktoren für diese Erkrankungen.

#### **5.4 Assoziation des untersuchten -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens zum Auftreten neuer kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten mit KHK**

Eine durch den Polymorphismus veränderte RAGE-Expressionsrate könnte über eine veränderte Immunantwort zu einer Verstärkung atherosklerotischer Effekte führen. Dies kann das Risiko für kardiovaskuläre Folgeereignisse erhöhen. Ein weiteres Hauptziel der vorliegenden Arbeit bestand deshalb darin zu überprüfen, ob der untersuchte RAGE-Polymorphismus zur Inzidenz des kombinierten Endpunkts (Myokardinfarkt, Schlaganfall/TIA, kardialer Tod) innerhalb eines Jahres Follow-Up assoziiert war.

Innerhalb dieses Nachuntersuchungszeitraumes konnte weder ohne Zeitbezug (Chi<sup>2</sup>-Test) noch mit Zeitbezug (univariat: Kaplan-Meier-Analyse; multivariat: Cox-Regression) eine signifikante Assoziation zwischen dem untersuchtem -374T>A Polymorphismus und der Inzidenz des kombinierten Endpunkts unter Patienten mit KHK gefunden werden. Tendenziell befanden sich unter den Patienten, bei denen ein kardiovaskuläres Folgeereignis eingetreten ist, mehr TT-Carrier (49,3% vs. 45,5%; p=0,545). In der Kaplan-Meier-Analyse trat bei TT-Trägern der kombinierte Endpunkt tendenziell früher ein als bei AA- und AT-Trägern (73,188 Wochen vs. 76,822 Wochen; p=0,501 nach Log-Rank-Test). Auch in der multivariaten Cox-Regression zeigte sich der TT-Genotyp tendenziell assoziiert zum häufigeren Auftreten des kombinierten Endpunktes (adjustierte HR=1,146). Signifikanz konnte nicht nachgewiesen werden (p=0,575). In Querschnittsuntersuchungen wurde gehäuft eine protektive Rolle des AA-Genotyps für kardiovaskuläre Ereignisse festgestellt (Pettersson-Fernholm et al., 2003; Lu und Feng, 2010; Boiocchi et al., 2011; Falcone et al., 2013). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde das A-Allel aber in weiteren Studien auch als unabhängiger *Risikofaktor* für eine KHK (Kucukhuseyin et al., 2009) und für Atherosklerose (Kawai et al., 2013) identifiziert. Andere Analysen zeigten keinen Zusammenhang zwischen dem untersuchten -374T>A Polymorphismus und KHK (Kirbis et al., 2004) bzw. Schlaganfall (Cui et al., 2013).

Es existieren nur wenige Daten aus longitudinalen Studien. Poon et al. untersuchten eine chinesische Studiengruppe mit Diabetes mellitus Typ II und diabetischer Nephropathie. Dabei

fanden sie nach einer Nachbeobachtungszeit von acht Jahren ebenso wie wir keine signifikante Assoziation zwischen dem -374T>A Polymorphismus und dem Auftreten kardiovaskulärer Events bzw. der Überlebensrate (Poon et al., 2010).

Damit stellt der -374T>A Polymorphismus wahrscheinlich keinen Risikofaktor für erneute kardiovaskuläre Ereignisse dar. Trotzdem ist geplant (Parallelstudie), ein weiteres Follow-Up nach drei Jahren durchzuführen, um erneut die prognostische Bedeutung des RAGE Polymorphismus zu bewerten.

### **5.5 Risikofaktor Parodontitis für das Auftreten neuer kardiovaskulärer Folgeereignisse**

In einer Meta-Analyse prospektiver Studien bei Patienten ohne bekannte KHK bei Studienbeginn wurde festgestellt, dass Parodontitis mit einer 1,24-fach erhöhten Wahrscheinlichkeit für eine KHK assoziiert ist. Die Forscher forderten jedoch weitere prospektive Untersuchungen (Humphrey et al., 2008). In einer 7-Jahres-Follow-Up-Studie an Patienten (Durchschnittsalter 49 Jahre), die bereits zu Studienbeginn an einer KHK litten, konnten dentale Infektionen (inklusive Karies, apikalen Läsionen und Perikoronitis) als Risikofaktor für erneute kardiovaskuläre Ereignisse bestimmt werden (Mattila et al., 1995). In einer weiteren Studie zeigte sich, dass eine Parodontitis die Odds-Ratio für ein erneutes akutes Koronarsyndrom signifikant erhöht (OR=3,6; 95%-CI=2,0 – 6,6;  $p<0,001$ ) (Renvert et al., 2010). Im Gegensatz dazu steht eine prospektive Untersuchung an 8032 Patienten ohne vorher bekannte KHK, bei denen keine signifikante Assoziation zwischen Parodontitis und erstmalig aufgetretener KHK gezeigt werden konnte (Hujoel et al., 2000). Aufgrund der beschriebenen Untersuchungen zum KHK-Risikofaktor Parodontitis ist es möglich, dass Parodontitis nicht nur das Risiko für eine KHK erhöht, sondern auch mit kardiovaskulären Folgeereignissen unter KHK-Patienten assoziiert ist.

In der untersuchten Studienpopulation konnte jedoch in einer Parallelstudie unserer Arbeitsgruppe (A. Lutze, Dissertation in Vorbereitung) entgegen der Vermutung keine signifikante Assoziation zwischen der Diagnose schwere Parodontitis und der Inzidenz des kombinierten Endpunktes innerhalb eines Jahres nach Erstaufnahme festgestellt werden. Möglicherweise ist die fehlende Assoziation durch das Durchschnittsalter von 67 Jahren zu erklären. Dietrich et. al konnten in einer Analyse klinischer und radiologischer Daten von ca. 1200 Veteranen (die zu Studienbeginn nicht unter einer KHK litten) eine signifikante Assoziation zwischen chronischer Parodontitis und der Inzidenz der KHK nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 24 Jahren nur bei unter 60-jährigen Männern feststellen (HR=2.12). Jedoch nicht bei Männern über 60 Jahren (Dietrich et al., 2008).

## **5.6 Schlussfolgerung und Ausblick**

Das Hauptergebnis der vorliegenden Studie ist die signifikante Assoziation des -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens zum erhöhten Schweregrad der Parodontitis. Dieser Zusammenhang konnte auch im multivariaten Vergleich unter Einbeziehung weiterer etablierter Risikofaktoren für Parodontitis wie Plaqueindex, Nikotinabusus, Alter und Geschlecht gezeigt werden. Der TT-Genotyp ist unter Patienten mit KHK mit einer 1,63-fach höheren Wahrscheinlichkeit, eine schwere Parodontitis zu entwickeln, assoziiert.

Vermutlich ist eine durch den untersuchten Polymorphismus TT-Genotyp-vermittelte veränderte RAGE-Expression für eine modifizierte Immunantwort über die RAGE-NF-κB-Zytokin-Achse und dadurch bedingte verstärkte parodontale Destruktion verantwortlich.

Der untersuchte Polymorphismus stellte sich nach der Nachbeobachtungszeit von einem Jahr nicht als signifikanter prospektiver Risikofaktor für die Inzidenz des kombinierten Endpunkts heraus. Carrier des TT-Genotyps hatten jedoch von der Tendenz mehr kardiovaskuläre Folgeereignisse. Mit Zeitbezug zeigte die Kaplan-Meier-Analyse einen tendenziell früheren Eintritt des kombinierten Endpunktes unter Trägern des TT-Genotyps. Dies stimmt mit Ergebnissen anderer Studien überein, in der AA-Genotyp-Träger erst später einen Myokardinfarkt erlitten, bzw. kardiovaskuläre Erkrankungen seltener auftraten als bei AT- und TT-Carriern (Pettersson-Fernholm et al., 2003; Lu und Feng, 2010; Boiocchi et al., 2011). Die Vermutung, dass eine schwere Parodontitis ein Risikofaktor für das Auftreten neuer kardiovaskulärer Ereignisse innerhalb eines Jahres Follow-Up ist, konnte nicht bestätigt werden. Um die gewonnenen Ergebnisse zu bestätigen, sollten weitere Studien mit längerer Follow-Up-Zeit durchgeführt werden. Zudem gibt es bisher keine eindeutigen Erkenntnisse über die funktionellen Auswirkungen des untersuchten Polymorphismus in Bezug zur Transkriptionsrate des RAGE-Gens und damit verbundener Änderung der Immunantwort. Zu beachten ist, dass es unterschiedliche RAGE-Varianten gibt. Der Polymorphismus könnte gegensätzliche Effekte haben, was die Auswirkungen auf kardiovaskuläre Folgeereignisse möglicherweise mindert.

Zukünftig könnten Forschungen zu genetischen Risikofaktoren für Parodontitis und KHK dazu beitragen, neuartige diagnostische und therapeutische Verfahren zu entwickeln. Eine Diagnostik von krankheitsassoziierten Genen könnte eine Risikoabschätzung, frühe Erkennung und entsprechend individualisierte Therapie ermöglichen. Ein therapeutischer Ansatzpunkt wäre das Antagonisieren von RAGE, wodurch die folgende intrazelluläre Signalkette nicht oder weniger stark ausgelöst wird. RAGE-Antagonisten wie TTP488 oder niedermolekulares Heparin (LMWH) könnten in Zukunft vor den Folgen der RAGE-Signalkaskade schützen (Myint et al., 2006; Chen et al., 2008). Das gezielte Einsetzen von zirkulierendem sRAGE, welches entgegengesetzt zu Entzündungsmarkern assoziiert ist, könnte eine Senkung freier RAGE-Liganden bewirken (Al Rifai et al., 2015).

## **6. Zusammenfassung**

Die endotheliale Dysfunktion (Soga et al., 2003) einschließlich der Akkumulation von Lipiden und fibrösen Stoffen in den arteriellen Zellwänden wird maßgeblich durch das Immunsystem beeinflusst. Genetische Faktoren wie der hier untersuchte -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens könnten einen Einfluss auf die KHK haben.

Der primäre ätiologische Faktor der Parodontitis ist eine pathogene mikrobielle Plaque, die in Form eines Biofilms auf mineralisierten subgingivalen Zahnoberflächen adhärert. Die körpereigene Immunabwehr kann bei betroffenen Patienten die Infektion nicht kontrollieren und triggert durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren den Abbau des Zahnhalteapparates.

Seit langem besteht der Verdacht, dass die Parodontitis ein Risikofaktor für KHK sein könnte.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war, im Rahmen einer Kohortenstudie den Einfluss des -374T>A SNP im Promotor des RAGE-Gens auf den Schweregrad der Parodontitis unter stationären Patienten mit nachgewiesener KHK zu untersuchen. Außerdem sollte überprüft werden, ob der untersuchte Polymorphismus im Rahmen einer Longitudinalstudie in Kombination mit schwerer Parodontitis zu kardiovaskulären Folgeereignissen assoziiert ist.

Für die vorliegende Studie wurden insgesamt 1002 ausschließlich kaukasische, stationäre Patienten mit mindestens 50%-iger Stenose einer oder mehrerer dominanter Herzkranzarterien in der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg untersucht. Darauf folgte nach Genotypisierung die Einteilung der Teilnehmer in eine Gruppe ohne oder mit leichter Parodontitis (489 Patienten) und in eine Gruppe mit schwerer Parodontitis (449 Patienten) nach Kriterien von Tonetti und Claffey (Tonetti und Claffey, 2005). Nach einem Jahr erfolgte ein Follow-Up. Die genomische Untersuchung des -374T>A SNP wurde per Restriktions-Fragment-Längen-Analyse durchgeführt. Die molekularbiologische Bestimmung von elf etablierten, parodontopathogenen Bakterienspezies aus subgingival gewonnenen Plaqueproben wurde von HAIN Lifescience (Nehren, Deutschland) durchgeführt.

Für den untersuchten -374T>A SNP konnte innerhalb der Querschnittsuntersuchungen eine Assoziation zum Schweregrad der Parodontitis gefunden werden. Dabei waren Patienten mit schwerer Parodontitis signifikant häufiger Träger des TT-Genotyps als Patienten, die unter einer leichten oder unter keiner Parodontitis litten (50,8% vs. 41,1%;  $p=0,004$ ). Im multivariaten Vergleich wurde für den TT-Genotyp ein adjustiertes Odds-Ratio von 1,63 für die Ausbildung einer schweren Parodontitis ermittelt. Möglicherweise führt eine durch den Polymorphismus verursachte veränderte RAGE-Expression über NF- $\kappa$ B zu einer Veränderung der Immunantwort, was in einer verstärkten Progression der Parodontitis resultiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass weder der untersuchte Polymorphismus, noch die Schwere der Parodontitis innerhalb des 1-Jahres-Follow-Up einen signifikanten

Risikoindikator für kardiovaskuläre Folgeereignisse unter stationären Patienten mit KHK darstellen. Unter den Patienten, bei denen der kombinierte Endpunkt eingetreten ist, waren tendenziell häufiger TT-Träger (49,3% vs. 45,5%;  $p=0,545$ ). Der TT-Genotyp (vs. AT- und AA-Genotyp) zeigt tendenziell in Richtung eines früheren Auftretens kardialer Folgeereignisse (73,188 Wochen vs. 76,822 Wochen;  $p=0,501$  nach Log-Rank-Test).

Existierende longitudinale Untersuchungen mit ähnlichen Voraussetzungen sind bisher rar. Unter Patienten mit Diabetes mellitus Typ II und diabetischer Nephropathie konnte nach acht Jahren Nachuntersuchungszeit ebenso keine signifikante Assoziation zwischen dem untersuchten -374T>A Polymorphismus und dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse gefunden werden (Poon et al., 2010). Fallkontrollstudien zu bereits vorliegenden kardiovaskulären Erkrankungen zeigten den AA-Genotyp als protektiven Faktor (Lu und Feng, 2010; Boiocchi et al., 2011). Andere Studien stellten keinen signifikanten Zusammenhang fest (Kirbis et al., 2004).

## **7. Literaturverzeichnis**

- Abbass MM, Korany NS, Salama AH, Dmytryk JJ, Safiejko-Mroccka B (2012) The relationship between receptor for advanced glycation end products expression and the severity of periodontal disease in the gingiva of diabetic and non diabetic periodontitis patients. *Archives of oral biology* 57:1342–1354.
- Aberg CH, Kelk P, Johansson A (2015) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: virulence of its leukotoxin and association with aggressive periodontitis. *Virulence* 6:188–195.
- Abraham-Inpijn L, Polsacheva OV, Raber-Durlacher JE (1996) The significance of endocrine factors and microorganisms in the development of gingivitis in pregnant women. *Stomatologia* 75:15–18.
- Ainamo J, Bay I (1975) Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *International dental journal* 25:229–235.
- Al Rifai M, Schneider, Andrea L C, Alonso A, Maruthur N, Parrinello CM, Astor BC, Hoogeveen RC, Soliman EZ, Chen LY, Ballantyne CM, Halushka MK, Selvin E (2015) sRAGE, inflammation, and risk of atrial fibrillation: results from the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Journal of diabetes and its complications* 29:180–185.
- Albandar JM (2002) Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontology* 2000 29:177–206.
- Arno A, Waerhaug J, Lovdal A, Schei O (1958) Incidence of gingivitis as related to sex, occupation, tobacco consumption, toothbrushing, and age. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* 11:587–595.
- Asai K, Yamori M, Yamazaki T, Yamaguchi A, Takahashi K, Sekine A, Kosugi S, Matsuda F, Nakayama T, Bessho K (2015) Tooth loss and atherosclerosis: the Nagahama Study. *Journal of Dental Research* 94:52–58.
- Aydogan HY, Kucukhuseyin O, Tekeli A, Isbir T (2012) Associations of receptor for advanced glycation end products -374 T/A and Gly82 Ser and peroxisome proliferator-activated receptor gamma Pro12Ala polymorphisms in Turkish coronary artery disease patients. *Genetic testing and molecular biomarkers* 16:134–137.
- Baldwin AS Jr (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annual review of immunology* 14:649–683.
- Baragetti I, Norata GD, Sarcina C, Baragetti A, Rastelli F, Buzzi L, Grigore L, Garlaschelli K, Pozzi C, Catapano AL (2013) -374 T/A RAGE polymorphism is associated with chronic kidney disease progression in subjects affected by nephrocardiovascular disease. *PloS one* 8:e60089.

- Bascones-Martinez A, Munoz-Corcuera M, Bascones-Ilundain J (2015) Diabetes and periodontitis: A bidirectional relationship. *Medicina clinica* 145:31–35.
- Bashan E, Harper R, Bi Y, Hodish I (2015) A novel approach to optimise glycaemic control in insulin users. *BMJ case reports* 2015
- Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S (1996) Periodontal disease and cardiovascular disease. *Journal of periodontology* 67:1123–1137.
- Beikler T, Schnitzer S, Abdeen G, Ehmke B, Eisenacher M, Flemmig TF (2006) Sampling strategy for intraoral detection of periodontal pathogens before and following periodontal therapy. *Journal of Periodontology* 77:1323–1332.
- Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP (2005) Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 83:876–886.
- Birkedal-Hansen H (1993) Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *Journal of periodontology* 64:474–484.
- Blake GJ, Ridker PM (2002) Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. *Journal of internal medicine* 252:283–294.
- Bochenek G, Hasler R, El Mokhtari N, Konig 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. *Human molecular genetics* 22:4516–4527.
- Boiocchi C, Bozzini S, Buzzi MP, Schirinzi S, Zorzetto M, Pelissero G, Cuccia M, Falcone C (2011) Age of onset of myocardial infarction: is promoter polymorphism of the RAGE gene implicated? *Rejuvenation research* 14:67–73.
- Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, Nowygrod R, Nepper M, Przysiecki C, Shaw A (1993) Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *The American journal of pathology* 143:1699–1712.
- Bucciarelli LG, Wendt T, Rong L, Lalla E, Hofmann MA, Goova MT, Taguchi A, Yan SF, Yan SD, Stern DM, Schmidt AM (2002) RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 59:1117–1128.
- 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.

- Campo I, Morbini P, Zorzetto M, Tinelli C, Brunetta E, Villa C, Bombieri C, Cuccia M, Agostini C, Bozzi V, Facoetti A, Ferrarotti I, Mazzola P, Scabini R, Semenzato G, Pignatti PF, Pozzi E, Luisetti M (2007) Expression of receptor for advanced glycation end products in sarcoid granulomas. *American journal of respiratory and critical care medicine* 175:498–506.
- Carrillo-de-Albornoz A, Figuero E, Herrera D, Bascones-Martinez A (2010) Gingival changes during pregnancy: II. Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm. *Journal of Clinical Periodontology* 37:230–240.
- Chen Y, Akirav EM, Chen W, Henegariu O, Moser B, Desai D, Shen JM, Webster JC, Andrews RC, Mjalli AM, Rothlein R, Schmidt AM, Clynes R, Herold KC (2008) RAGE ligation affects T cell activation and controls T cell differentiation. *Journal of immunology* 181:4272–4278.
- Cui X, Chen H, Hou X, Wang S, Jayaram S, Zheng Z (2013) Polymorphism of the RAGE affects the serum inflammatory levels and risk of ischemic stroke in a Chinese population. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 32:986–996.
- Dattilo BM, Fritz G, Leclerc E, Kooi CWV, Heizmann CW, Chazin WJ (2007) The extracellular region of the receptor for advanced glycation end products is composed of two independent structural units. *Biochemistry* 46:6957–6970.
- Del Turco S, Basta G (2012) An update on advanced glycation endproducts and atherosclerosis. *BioFactors (Oxford, England)* 38:266–274.
- DeStefano F, Anda RF, Kahn HS, Williamson DF, Russell CM (1993) Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. *BMJ (Clinical research ed.)* 306:688–691.
- Dietrich T, Jimenez M, Krall Kaye, Elizabeth A, Vokonas PS, Garcia RI (2008) Age-dependent associations between chronic periodontitis/edentulism and risk of coronary heart disease. *Circulation* 117:1668–1674.
- Ding Q, Keller JN (2005a) Evaluation of rage isoforms, ligands, and signaling in the brain. *Biochimica et biophysica acta* 1746:18–27.
- Ding Q, Keller JN (2005b) Splice variants of the receptor for advanced glycosylation end products (RAGE) in human brain. *Neuroscience letters* 373:67–72.
- Dodge Jr, Brown BG, Bolson EL, Dodge HT (1992) Lumen diameter of normal human coronary arteries. Influence of age, sex, anatomic variation, and left ventricular hypertrophy or dilation. *Circulation* 86:232–246.
- Dou L, Lu Y, Shen T, Huang X, Man Y, Wang S, Li J (2012) Panax notoginseng saponins suppress RAGE/MAPK signaling and NF-kappaB activation in apolipoprotein-E-deficient



atherosclerosis-prone mice. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 29:875–882.

Dukic-Stefanovic S, Gasic-Milenkovic J, Deuther-Conrad W, Munch G (2003) Signal transduction pathways in mouse microglia N-11 cells activated by advanced glycation endproducts (AGEs). *Journal of neurochemistry* 87:44–55.

Eggert FM, McLeod MH, Flowerdew G (2001) Effects of smoking and treatment status on periodontal bacteria: evidence that smoking influences control of periodontal bacteria at the mucosal surface of the gingival crevice. *Journal of Periodontology* 72:1210–1220.

Falcone C, Bozzini S, Matrone B, Colonna A, Falcone R, Calcagnino M, Pelissero G (2013) RAGE gene polymorphism in heart failure patients with and without angiographic evidence of significant coronary atherosclerosis. *International journal of immunopathology and pharmacology* 26:199–206.

Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, Buzzi MP, Belvito C, Cuccia M, Geroldi D (2005) Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25:1032–1037.

Falcone C, Geroldi D, Buzzi MP, Emanuele E, Yilmaz Y, Fontana JM, Vignali L, Boiocchi C, Sbarsi I, Cuccia M (2008) The -374T/A RAGE polymorphism protects against future cardiac events in nondiabetic patients with coronary artery disease. *Archives of medical research* 39:320–325.

Fiehn N, Larsen T, Christiansen N, Holmstrup P, Schroeder TV (2005) Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. *Journal of periodontology* 76:731–736.

Ford PJ, Gemmell E, Chan A, Carter CL, Walker PJ, Bird PS, West MJ, Cullinan MP, Seymour GJ (2006) Inflammation, heat shock proteins and periodontal pathogens in atherosclerosis: an immunohistologic study. *Oral microbiology and immunology* 21:206–211.

Friedewald VE, Kornman KS, Beck JD, Genco R, Goldfine A, Libby P, Offenbacher S, Ridker PM, Van Dyke, Thomas E., Roberts WC (2009) The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology Editors' Consensus: Periodontitis and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Journal of Periodontology* 80:1021–1032.

Galbraith GM, Hendley TM, Sanders JJ, Palesch Y, Pandey JP (1999) Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 26:705–709.

Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P (1994) Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *The Journal of clinical investigation* 94:2493–2503.

Garlet GP (2010) Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of dental research* 89:1349–1363.

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. *Journal of periodontology* 73:73–78.

Gelse K, Poschl E, Aigner T (2003) Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews* 55:1531–1546.

Genco R, Offenbacher S, Beck J (2002) Periodontal disease and cardiovascular disease: epidemiology and possible mechanisms. *Journal of the American Dental Association* 133:14-22.

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 microbiology letters* 241:95–101.

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.

Gillespie MT (2007) Impact of cytokines and T lymphocytes upon osteoclast differentiation and function. *Arthritis research & therapy* 9:103.

Glass CK, Witztum JL (2001) Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104:503–516.

Gomez RS, Dutra WO, Moreira PR (2009) Epigenetics and periodontal disease: future perspectives. *Inflammation Research* 58:625–629.

Graves DT, Liu R, Oates TW (2007) Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis: impact on periodontal pathosis. *Periodontology 2000* 45:128–137.

Grossin N, Wautier MS, Picot J, Stern DM, Wautier JT (2009) Differential effect of plasma or erythrocyte AGE-ligands of RAGE on expression of transcripts for receptor isoforms. *Diabetes & metabolism* 35:410–417.

Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S Jr, Fuster V (1999) AHA/ACC scientific statement: Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the AHA and the ACC. *Journal of the American College of Cardiology* 34:1348–1359.

Harja E, Bu D, Hudson BI, Chang JS, Shen X, Hallam K, Kalea AZ, Lu Y, Rosario RH, Oruganti S, Nikolla Z, Belov D, Lalla E, Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM (2008) Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE<sup>-/-</sup> mice. *The Journal of clinical investigation* 118:183–194.

- Hasegawa N (2008) Effect of high mobility group box 1 (HMGB1) in cultured human periodontal ligament cells. *The Journal of the Stomatological Society, Japan* 75:155–161.
- Herbert BA, Novince CM, Kirkwood KL (2015) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis. *Molecular oral microbiology*.
- Herzberg MC, Weyer MW (1998) Dental plaque, platelets, and cardiovascular diseases. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 3:151–160.
- Hofmann B, Riemer M, Erbs C, Plehn A, Navarrete Santos A, Wienke A, Silber R, Simm A (2014) Carotid to femoral pulse wave velocity reflects the extent of coronary artery disease. *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn.)* 16:629–633.
- Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM (1999) RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97:889–901.
- Holla LI, Fassmann A, Stejskalova A, Znojil V, Vanek J, Vacha J (2004) Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontology* 75:30–36.
- Holla LI, Kankova K, Fassmann A, Buckova D, Halabala T, Znojil V, Vanek J (2001) Distribution of the receptor RAGE gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis: a preliminary study. *Journal of periodontology* 72:1742–1746.
- Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D (1995) The receptor for advanced glycation end products is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphotericin in the developing nervous system. *The Journal of biological chemistry* 270:25752–25761.
- Huang JS, Guh JY, Chen HC, Hung WC, Lai YH, Chuang LY (2001) Role of receptor for advanced glycation end-product (RAGE) and the JAK/STAT-signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK-49F cells. *Journal of cellular biochemistry* 81:102–113.
- Hudson BI, Stickland MH, Futers TS, Grant PJ (2001) Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes* 50:1505–1511.
- Hujoel PP, Drangsholt M, Spiekerman C, DeRouen TA (2000) Periodontal disease and coronary heart disease risk. *JAMA* 284:1406–1410.

- Humphrey LL, Fu R, Buckley DI, Freeman M, Helfand M (2008) Periodontal disease and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. *Journal of general internal medicine* 23:2079–2086.
- Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H (1999) Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 274:19919–19924.
- Imamura T, Travis J, Potempa J (2003) The biphasic virulence activities of gingipains: activation and inactivation of host proteins. *Current protein & peptide science* 4:443–450.
- Imani F, Horii Y, Suthanthiran M, Skolnik EY, Makita Z, Sharma V, Vlassara H (1993) Advanced glycosylation endproduct-specific receptors on human and rat T-lymphocytes mediate synthesis of interferon gamma: role in tissue remodeling. *The Journal of experimental medicine* 178:2165–2172.
- Ishihara K, Tsutsumi K, Kawane S, Nakajima M, Kasaoka T (2003) The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site. *FEBS letters* 550:107–113.
- Janket S, Baird AE, Chuang S, Jones JA (2003) Meta-analysis of periodontal disease and risk of coronary heart disease and stroke. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 95:559–569.
- Jeftha A, Holmes H (2013) Periodontitis and cardiovascular disease. *SADJ: journal of the South African Dental Association = tydskrif van die Suid-Afrikaanse Tandheelkundige Vereniging* 68:60, 62-3.
- 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. *Journal of Clinical Periodontology* 32:40–44.
- Katz J, Yoon TYH, Mao S, Lamont RJ, Caudle RM (2007) Expression of the receptor of advanced glycation end products in the gingival tissue of smokers with generalized periodontal disease and after nornicotine induction in primary gingival epithelial cells. *Journal of periodontology* 78:736–741.
- Kawai T, Kamide K, Ito N, Onishi M, Oguro R, Takeya Y, Tatara Y, Maekawa Y, Katsuya T, Ohishi M, Rakugi H (2013) -374 T/A polymorphism in RAGE gene is associated with onset of diabetes mellitus, atherosclerosis, and renal dysfunction in patients with hypertension. *Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y. : 1993)* 35:236–241.

- 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, Shiba H, Hart TC (2005) The genetic basis of periodontitis. *Periodontology* 2000 39:91–117.
- Kirbis J, Milutinovic A, Steblovnik K, Teran N, Terzic R, Zorc M (2004) The -429 T/C and -374 T/A gene polymorphisms of the receptor of advanced glycation end products gene (RAGE) are not risk factors for coronary artery disease in Slovene population with type 2 diabetes. *Collegium antropologicum* 28:611–616.
- Kocher T, Schwahn C, Gesch D, Bernhardt O, John U, Meisel P, Baelum V (2005) Risk determinants of periodontal disease - an analysis of the Study of Health in Pomerania (SHIP 0). *Journal of Clinical Periodontology* 32:59–67.
- Koppolu P, Durvasula S, Palaparthy R, Rao M, Sagar V, Reddy SK, Lingam S (2013) Estimate of CRP and TNF-alpha level before and after periodontal therapy in cardiovascular disease patients. *The Pan African medical journal* 15:92.
- 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. *Journal of Clinical Periodontology* 24:72–77.
- Kucukhuseyin O, Aydogan HY, Isbir CS, Isbir T (2009) Associations of -374T/A polymorphism of receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene in Turkish diabetic and non-diabetic patients with coronary artery disease. *In vivo* 23:949–954.
- Laine MA (2002) Effect of pregnancy on periodontal and dental health. *Acta odontologica Scandinavica* 60:257–264.
- Laine ML, Loos BG, Crielaard W (2010) Gene polymorphisms in chronic periodontitis. *International journal of dentistry* 2010:324719.
- Laki J, Kizsel P, Vatay A, Blasko B, Kovacs M, Korner A, Madacsy L, Blatniczky L, Almassy Z, Szalai C, Rajczy K, Pozsonyi E, Karadi I, Fazakas A, Hosszufalusi N, Panczel P, Arason GJ, Wu Y, Zhou B, Yang Y, Yu C, Fust G (2007) The HLA 8.1 ancestral haplotype is strongly linked to the C allele of -429TC promoter polymorphism of receptor of the advanced glycation endproduct (RAGE) gene. Haplotype-independent association of the -429C allele with high hemoglobinA1C levels in diabetic patients. *Molecular immunology* 44:648–655.
- Lalla E, Lamster IB, Drury S, Fu C, Schmidt AM (2000) Hyperglycemia, glycooxidation and receptor for advanced glycation endproducts: potential mechanisms underlying diabetic complications, including diabetes-associated periodontitis. *Periodontology* 2000 23:50–62.

- Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM (1997) Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *The Journal of biological chemistry* 272:17810–17814.
- Leclerc E, Fritz G, Weibel M, Heizmann CW, Galichet A (2007) S100B and S100A6 differentially modulate cell survival by interacting with distinct RAGE (receptor for advanced glycation end products) immunoglobulin domains. *The Journal of biological chemistry* 282:31317–31331.
- Leibbrandt A, Penninger JM (2008) RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1143:123–150.
- Libby P (2006) Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *The American journal of clinical nutrition* 83:456-460.
- Lloyd-Jones DM, Nam B, D'Agostino, Ralph B Sr, Levy D, Murabito JM, Wang TJ, Wilson, Peter WF, O'Donnell CJ (2004) Parental cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults: a prospective study of parents and offspring. *JAMA* 291:2204–2211.
- Loe H, Anerud A, Boysen H, Smith M (1978) The natural history of periodontal disease in man. The rate of periodontal destruction before 40 years of age. *Journal of periodontology* 49:607–620.
- 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. *Journal of periodontology* 71:1528–1534.
- Loos BG, Leppers-Van de Straat FGJ, Van de Winkel JGJ, Van der Velden U (2003) Fcγ receptor polymorphisms in relation to periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 30:595–602.
- Lu W, Feng B (2010) The -374A Allele of the RAGE Gene As a Potential Protective Factor for Vascular Complications in Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 220:291–297.
- Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407:233–241.
- Lusis AJ, Mar R, Pajukanta P (2004) Genetics of atherosclerosis. *Annual review of genomics and human genetics* 5:189–218.
- Mahanonda R, Pichyangkul S (2007) Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontology 2000* 43:41–55.

- Malherbe P, Richards JG, Gaillard H, Thompson A, Diener C, Schuler A, Huber G (1999) cDNA cloning of a novel secreted isoform of the human receptor for advanced glycation end products and characterization of cells co-expressing cell-surface scavenger receptors and Swedish mutant amyloid precursor protein. *Brain research* 71:159–170.
- Marazita ML, Lu H, Cooper ME, Quinn SM, Zhang J, Burmeister JA, Califano JV, Pandey JP, Schenkein HA, Tew JG (1996) Genetic segregation analyses of serum IgG2 levels. *American journal of human genetics* 58:1042–1049.
- Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, 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.
- Martens H, Nienhuis H, Gross S, der Steege Gv, Brouwer E, Berden J, Sevaux RD, Derksen R, Voskuyl A, Berger S, Navis G, Nolte I, Kallenberg C, Bijl M (2012) Receptor for advanced glycation end products (RAGE) polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus and disease severity in lupus nephritis. *Lupus* 21:959–968.
- Mattila KJ, Nieminen MS, Valtonen VV, Rasi VP, Kesaniemi YA, Syrjala SL, Jungell PS, Isoluoma M, Hietaniemi K, Jokinen MJ (1989) Association between dental health and acute myocardial infarction. *BMJ (Clinical research ed.)* 298:779–781.
- Mattila KJ, Valtonen VV, Nieminen M, Huttunen JK (1995) Dental infection and the risk of new coronary events: prospective study of patients with documented coronary artery disease. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 20:588–592.
- McGreal EP, Miller JL, Gordon S (2005) Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Current opinion in immunology* 17:18–24.
- 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, Oates TW (2006) Diabetes mellitus and periodontal diseases. *Journal of periodontology* 77:1289–1303.
- Medzhitov R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews. Immunology* 1:135–145.
- Meisel P, Carlsson LE, Sawaf H, Fanghaenel J, Greinacher A, Kocher T (2001) Polymorphisms of Fc gamma-receptors RIIa, RIIIa, and RIIIb in patients with adult periodontal diseases. *Genes and immunity* 2:258–262.

Michalowicz BS, Aepli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL, Bouchard TJ, JR, Pihlstrom BL (1991) Periodontal findings in adult twins. *Journal of periodontology* 62:293–299.

Micheelis W (2011) Oral health in Germany: an oral epidemiological outline. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 54:1022–1026.

Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I, Numano F (1996) Glucose-dependent interleukin 6 and tumor necrosis factor production by human peripheral blood monocytes in vitro. *Diabetes* 45:954–959.

Moughal NA, Adonogianaki E, Thornhill MH, Kinane DF (1992) Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally-induced gingivitis. *Journal of periodontal research* 27:623–630.

Mullally BH (2004) The influence of tobacco smoking on the onset of periodontitis in young persons. *Tobacco induced diseases* 2:53–65.

Müller H: *Checklisten der Zahnmedizin Parodontologie*. 3. Aufl. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2012, S. 40.

Myint K, Yamamoto Y, Doi T, Kato I, Harashima A, Yonekura H, Watanabe T, Shinohara H, Takeuchi M, Tsuneyama K, Hashimoto N, Asano M, Takasawa S, Okamoto H, Yamamoto H (2006) RAGE control of diabetic nephropathy in a mouse model: effects of RAGE gene disruption and administration of low-molecular weight heparin. *Diabetes* 55:2510–2522.

Nah S, Choi I, Yoo B, Kim YG, Moon H, Lee C (2007) Advanced glycation end products increases matrix metalloproteinase-1, -3, and -13, and TNF-alpha in human osteoarthritic chondrocytes. *FEBS letters* 581:1928–1932.

Nass N, Bartling B, Navarrete Santos A, Scheubel RJ, Borgermann J, Silber RE, Simm A (2007) Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie* 40:349–356.

Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A (1992) Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *The Journal of biological chemistry* 267:14998–15004.

Negrato CA, Tarzia O, Jovanovic L, Chinellato, Luiz Eduardo Montenegro (2013) Periodontal disease and diabetes mellitus. *Journal of applied oral science: revista FOB* 21:1–12.

Nibali L, Madden I, Franch Chillida F, Heitz-Mayfield L, Brett P, Donos N (2011) IL6 -174 genotype associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Indians. *Oral diseases* 17:232–237.



Offenbacher S, Divaris K, Barros SP, Moss KL, Marchesan JT, Morelli T, Zhang S, Kim S, Sun L, Beck JD, Laudes M, Munz M, Schaefer AS, North KE (2016) Genome-wide association study of biologically-informed periodontal complex traits offers novel insights into the genetic basis of periodontal disease. *Human molecular genetics*.

Okumura, Nizet V (2014) Subterfuge and sabotage: evasion of host innate defenses by invasive gram-positive bacterial pathogens. *Annual review of microbiology* 68:439–458.

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.

Owen WF, JR, Hou FF, Stuart RO, Kay J, Boyce J, Chertow GM, Schmidt AM (1998) Beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products modulates collagen synthesis by human fibroblasts. *Kidney international* 53:1365–1373.

Padilla C, Lobos O, Hubert E, Gonzalez C, Matus S, Pereira M, Hasbun S, Descouvieres C (2006) Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontal research* 41:350–353.

Page RC (1991) The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of periodontal research* 26:230–242.

Page RC, Kornman KS (1997) The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000* 14:9–11.

Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA (2005) Mechanisms of action of environmental factors-tobacco smoking. *Journal of Clinical Periodontology* 32 Suppl 6:180–195.

Papapanou PN, Neiderud AM, Sandros J, Dahlen G (2001) Interleukin-1 gene polymorphism and periodontal status. A case-control study. *Journal of Clinical Periodontology* 28:389–396.

Paraskevas S, Huizinga JD, Loos BG (2008) A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 35:277–290.

Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S (2002) Scavenger receptors in innate immunity. *Current opinion in immunology* 14:123–128.

Pejcic A, Kesic LJ, Milasin J (2011) C-reactive protein as a systemic marker of inflammation in periodontitis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 30:407–414.

Pettersson-Fernholm K, Forsblom C, Hudson BI, Perola M, Grant PJ, Groop P (2003) The functional -374 T/A RAGE gene polymorphism is associated with proteinuria and cardiovascular disease in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 52:891–894.

- Poon PY, Szeto C, Chow K, Kwan BC, Li PK (2010) Relation between polymorphisms of receptor for advanced glycation end products (RAGE) and cardiovascular diseases in Chinese patients with diabetic nephropathy. *Clinical nephrology* 73:44–50.
- Preshaw PM (2008) Host response modulation in periodontics. *Periodontology* 2000 48:92–110.
- Preshaw PM, Foster N, Taylor JJ (2007) Cross-susceptibility between periodontal disease and type 2 diabetes mellitus: an immunobiological perspective. *Periodontology* 2000 45:138–157.
- Renvert S, Ohlsson O, Pettersson T, Persson GR (2010) Periodontitis: a future risk of acute coronary syndrome? A follow-up study over 3 years. *Journal of periodontology* 81:992–1000.
- 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.
- Roberts R (2008) A customized genetic approach to the number one killer: coronary artery disease. *Current opinion in cardiology* 23:629–633.
- Roberts R, Stewart AFR (2012) Genes and coronary artery disease: where are we? *Journal of the American College of Cardiology* 60:1715–1721.
- Ross R (1999) Atherosclerosis-an inflammatory disease. *The New England journal of medicine* 340:115–126.
- Rozlog LA, Kiecolt-Glaser JK, Marucha PT, Sheridan JF, Glaser R (1999) Stress and immunity: implications for viral disease and wound healing. *Journal of periodontology* 70:786–792.
- Sasaki N, Takeuchi M, Chowei H, Kikuchi S, Hayashi Y, Nakano N, Ikeda H, Yamagishi S, Kitamoto T, Saito T, Makita Z (2002) Advanced glycation end products (AGE) and their receptor (RAGE) in the brain of patients with Creutzfeldt-Jakob disease with prion plaques. *Neuroscience letters* 326:117–120.
- Sato H, Seiki M (1993) Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* 8:395–405.
- Schafer AS, Jepsen S, Loos BG (2011) Periodontal genetics: a decade of genetic association studies mandates better study designs. *Journal of Clinical Periodontology* 38:103–107.
- Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, Cao R, Yan SD, Brett J, Stern D (1995) Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *The Journal of clinical investigation* 96:1395–1403.

- Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, Esposito C, Hegarty H, Hurley W, Clauss M (1992) Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *The Journal of biological chemistry* 267:14987–14997.
- Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D (1999) Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circulation research* 84:489–497.
- Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM (2001) The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *The Journal of clinical investigation* 108:949–955.
- Schulz S, Immel UD, Just L, Schaller H, Glaser C, Reichert S (2016) Epigenetic characteristics in inflammatory candidate genes in aggressive periodontitis. *Human immunology* 77:71–75.
- Seinost G, Wimmer G, Skerget M, Thaller E, Brodmann M, Gasser R, Bratschko RO, Pilger E (2005) Periodontal treatment improves endothelial dysfunction in patients with severe periodontitis. *American heart journal* 149:1050–1054.
- Selvin E, Halushka MK, Rawlings AM, Hoogeveen RC, Ballantyne CM, Coresh J, Astor BC (2013) sRAGE and risk of diabetes, cardiovascular disease, and death. *Diabetes* 62:2116–2121.
- Sen R, Baltimore D (1986) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47:921–928.
- Shiau HJ, Reynolds MA (2010) Sex differences in destructive periodontal disease: exploring the biologic basis. *Journal of periodontology* 81:1505–1517.
- Shim E, Babu JP (2015) Glycated albumin produced in diabetic hyperglycemia promotes monocyte secretion of inflammatory cytokines and bacterial adherence to epithelial cells. *Journal of periodontal research* 50:197–204.
- Silness J, Loe H (1964) Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta odontologica Scandinavica* 22:121–135.
- Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE (2012) New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *Journal of dental research* 91:1110–1118.
- Socransky SS, Haffajee AD (1991) Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *Journal of periodontal research* 26:195–212.
- Socransky SS, Haffajee AD (1994) Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontology 2000* 5:7–25.

- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* 25:134–144.
- Soga Y, Nishimura F, Ohyama H, Maeda H, Takashiba S, Murayama Y (2003) Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF-alpha) -1031/-863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. *Journal of Clinical Periodontology* 30:524–531.
- Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Giambanco I, Donato R (2004) Amphoterin stimulates myogenesis and counteracts the antimyogenic factors basic fibroblast growth factor and S100B via RAGE binding. *Molecular and cellular biology* 24:4880–4894.
- Soro-Paavonen A, Watson, Anna MD, Li J, Paavonen K, Koitka A, Calkin AC, Barit D, Coughlan MT, Drew BG, Lancaster GI, Thomas M, Forbes JM, Nawroth PP, Bierhaus A, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA (2008) Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes* 57:2461–2469.
- Srikrishna G, Huttunen HJ, Johansson L, Weigle B, Yamaguchi Y, Rauvala H, Freeze HH (2002) N -Glycans on the receptor for advanced glycation end products influence amphoterin binding and neurite outgrowth. *Journal of neurochemistry* 80:998–1008.
- Stosberg D, Schulz S, Klapproth J, Zimmermann U, Reichert Y, Stein JM, Gläser C, Schaller HG, Reichert S (2011) The role of the c.-374T>A SNP in the promoter region of RAGE-gene in aggressive periodontitis. *Int Poster J Dent Oral Med.* 13:Poster 551.
- Strang F, Schunkert H (2014) C-reactive protein and coronary heart disease: all said-is not it? *Mediators of inflammation* 2014:757123.
- Sugaya K, Fukagawa T, Matsumoto K, Mita K, Takahashi E, Ando A, Inoko H, Ikemura T (1994) Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. *Genomics* 23:408–419.
- Sun W, Jiao Y, Cui B, Gao X, Xia Y, Zhao Y (2013) Immune complexes activate human endothelium involving the cell-signaling HMGB1-RAGE axis in the pathogenesis of lupus vasculitis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 93:626–638.
- Taba M Jr., Souza SLSd, Mariguela VC (2012) Periodontal disease: a genetic perspective. *Brazilian oral research* 26 Suppl 1:32–38.
- Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM, Schmidt AM (2000) Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* 405:354–360.

- Takeuchi M, Makita Z (2001) Alternative routes for the formation of immunochemically distinct advanced glycation end-products in vivo. *Current molecular medicine* 1:305–315.
- Tan AL, Forbes JM, Cooper ME (2007) AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. *Seminars in nephrology* 27:130–143.
- Tangada SD, Califano JV, Nakashima K, Quinn SM, Zhang JB, Gunsolley JC, Schenkein HA, Tew JG (1997) The effect of smoking on serum IgG2 reactive with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in early-onset periodontitis patients. *Journal of periodontology* 68:842–850.
- Tardy Y, Resnick N, Nagel T, Gimbrone, MA Jr, Dewey, CF Jr (1997) Shear stress gradients remodel endothelial monolayers in vitro via a cell proliferation-migration-loss cycle. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 17:3102–3106.
- Teng YA (2006) Protective and destructive immunity in the periodontium: Part 1--innate and humoral immunity and the periodontium. *Journal of dental research* 85:198–208.
- Tiszlavicz Z, Gyulai Z, Bencsik K, Szolnoki Z, Kocsis AK, Somogyvari F, Vecsei L, Mandi Y (2009) RAGE gene polymorphisms in patients with multiple sclerosis. *Journal of molecular neuroscience: MN* 39:360–365.
- Tonetti MS, Claffey N (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 6:210–213.
- Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB Jr, de Souza AP, Line SRP (2003) Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in Caucasian Brazilian population. *Journal of Clinical Periodontology* 30:438–442.
- Turk Z, Mesic R, Benko B (1998) Comparison of advanced glycation endproducts on haemoglobin (Hb-AGE) and haemoglobin A1c for the assessment of diabetic control. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 277:159–170.
- Tuzcu EM, Kapadia SR, Tutar E, Ziada KM, Hobbs RE, McCarthy PM, Young JB, Nissen SE (2001) High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. *Circulation* 103:2705–2710.
- Verstappen J, Von den Hoff, JW (2006) Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *Journal of dental research* 85:1074–1084.

- Vielkind P, Jentsch H, Eschrich K, Rodloff AC, Stingu C (2015) Prevalence of *Actinomyces* spp. in patients with chronic periodontitis. *International journal of medical microbiology: IJMM* 305:682–688.
- Vlassara H, Brownlee M, Cerami A (1984) Accumulation of diabetic rat peripheral nerve myelin by macrophages increases with the presence of advanced glycosylation endproducts. *The Journal of experimental medicine* 160:197–207.
- Wang J, Zou L, Song Z, Lang X, Huang S, Lu F, Han L, Xu Z (2012a) Meta-analysis of RAGE gene polymorphism and coronary heart disease risk. *PloS one* 7:e50790.
- Wang X, Cui E, Zeng H, Hua F, Wang B, Mao W, Feng X (2012b) RAGE genetic polymorphisms are associated with risk, chemotherapy response and prognosis in patients with advanced NSCLC. *PloS one* 7:e43734.
- Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R, Hori O, Stern D, Schmidt AM (1996) Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *The Journal of clinical investigation* 97:238–243.
- Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL (2001) Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *American journal of physiology* 280:685–694.
- Wendt T, Harja E, Bucciarelli L, Qu W, Lu Y, Rong LL, Jenkins DG, Stein G, Schmidt AM, Yan SF (2006) RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 185:70–77.
- Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE (1996) Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annual review of microbiology* 50:513–552.
- Wu M, Chen S, Jiang S (2015) Relationship between Gingival Inflammation and Pregnancy. *Mediators of inflammation* 2015:623427.
- Yamamoto Y, Harashima A, Saito H, Tsuneyama K, Munesue S, Motoyoshi S, Han D, Watanabe T, Asano M, Takasawa S, Okamoto H, Shimura S, Karasawa T, Yonekura H, Yamamoto H (2011) Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS. *Journal of immunology* 186:3248–3257.
- Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM (1996) RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382:685–691.

- Yan SD, Zhu H, Zhu A, Golabek A, Du H, Roher A, Yu J, Soto C, Schmidt AM, Stern D, Kindy M (2000) Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis. *Nature medicine* 6:643–651.
- Yang W, Lee D, Lee DL, Hong S, Lee S, Kang S, Choi D, Jang Y, Kim SH, Park S (2014) Blocking the RAGE activation attenuates autoimmune myocarditis. *Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society* 78:1197–1205.
- Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, Sherwood SJ, Bjercke RJ, Juhasz O, Crow MT, Tilton RG, Denner L (2001) Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes* 50:1495–1504.
- Yla-Herttuala S, Luoma J, Kallionpaa H, Laukkanen M, Lehtolainen P, Viita H (1996) Pathogenesis of atherosclerosis. *Maturitas* 23:47-49.
- Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, Yasui K, Takeuchi M, Makita Z, Takasawa S, Okamoto H, Watanabe T, Yamamoto H (2003) Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *The Biochemical journal* 370:1097–1109.
- Yoshie H, Kobayashi T, Tai H, Galicia JC (2007) The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontology 2000* 43:102–132.
- Yu S, Li H, Ma Y, Fu Y (2012) Matrix Metalloproteinase-1 of Gingival Fibroblasts Influenced by Advanced Glycation End Products (AGEs) and Their Association With Receptor for AGEs and Nuclear Factor- $\kappa$ B in Gingival Connective Tissue. *Journal of Periodontology* 83:119–126.
- Yuan D, Yuan D, Liu Q (2012) Association of the Receptor for Advanced Glycation End Products Gene Polymorphisms with Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis. *Ophthalmologica* 227:223–232.
- Zieman S, Kass D (2004) Advanced glycation end product cross-linking: pathophysiologic role and therapeutic target in cardiovascular disease. *Congestive heart failure (Greenwich, Conn.)* 10:144–150.





## 9. Thesen

1. Parodontitis und koronare Herzerkrankung (KHK) sind multifaktorielle, inflammatorische Erkrankungen mit hoher Prävalenz in der Bevölkerung.
2. Aufgrund verschiedener biologischer Mechanismen wie einer Erhöhung des proinflammatorischen und prothrombotischen Entzündungsstatus bei Parodontitis-Patienten, einer systemischen Streuung parodontaler Bakterien und der Existenz von gemeinsamen Risikofaktoren (u.a. Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Adipositas) für KHK und Parodontitis ist für Patienten mit Parodontitis das Risiko eine KHK zu entwickeln höher im Vergleich zur Normalbevölkerung. Zudem können auch genetische Faktoren existieren, die sowohl bei der Parodontitis als auch bei KHK eine Rolle spielen. In der Pathogenese beider Erkrankungen könnte der in dieser Arbeit untersuchte -374T>A Polymorphismus im Promotor des Gens für den Rezeptor für *advanced glycation endproducts* (RAGE) von Bedeutung sein.
3. Die vorliegende Arbeit ist eine Teilstudie des Projekts „Parodontale Erkrankungen und ihre mikrobiologischen Erreger als Risikofaktoren für kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit KHK“ (ClinicalTrials.gov; *identifier*: NCT01045070). Ziel ist es, mögliche Assoziationen des -374T>A Polymorphismus zur Ausprägung einer Parodontitis unter stationären Patienten mit KHK zu untersuchen. Ein weiteres Ziel bestand darin zu evaluieren, ob der -374T>A Polymorphismus ein möglicher Prädiktor für die Inzidenz neuer kardiovaskulärer Ereignisse innerhalb eines Follow-Up Zeitraums von einem Jahr darstellt.
4. Für das gesamte Studienprojekt wurden 1002 stationäre Patienten mit KHK (mindestens 50%ige Stenose einer Hauptkoronararterie) zahnärztlich-parodontologisch untersucht. Eine schwere Parodontitis lag vor, wenn mindestens 30% der Zähne einen approximalen Attachmentverlust von  $\geq 5$ mm aufwiesen. Die Genotypisierung zur Bestimmung des -374T>A Polymorphismus konnte an 938 Probanden (Alter 66,8 Jahre, Männer 74%) per Restriktions-Fragment-Längen-Analyse erfolgen. Elf parodontale Markerbakterien in subgingivalen Plaqueproben wurden in einem Fremdlabor molekularbiologisch mit PCR (Polymerasekettenreaktion) und anschließender reverser Hybridisierung nachgewiesen.
5. Im Ergebnis wurde festgestellt, dass der TT-Genotyp des untersuchten -374T>A Polymorphismus im Promotor des RAGE-Gens häufiger bei Patienten mit schwerer Parodontitis auftrat (50,8%) im Vergleich zu Probanden ohne oder mit milder Parodontitis

(41,1%;  $p=0,004$  nach  $\chi^2$ -Test mit Yates-Korrektur). Diese Assoziation bestätigte sich auch nach Adjustierung für die Kofaktoren Plaqueindex, Rauchen, Diabetes mellitus, Geschlecht und Alter mit binärer logistischer Regression, wobei der TT-Genotyp als unabhängiger Risikoindikator ( $OR=1,63$ ;  $p=0,001$ ; 95% Konfidenzintervall=1,23–2,17) für die Prävalenz einer schweren Parodontitis unter Patienten mit KHK identifiziert werden konnte.

6. In Rahmen der Querschnittsuntersuchungen wurde außerdem festgestellt, dass Patienten mit bekannter KHK oder einem bereits erlebten Myokardinfarkt häufiger unter einer schweren Parodontitis litten (bekannte KHK: 77,5% vs. 71,4%;  $p=0,025$ ; erlebter Myokardinfarkt: 42,3% vs. 35,0%;  $p=0,038$ ).
7. Für die Bewertung des Einflusses des -374T>A Polymorphismus auf das kardiovaskuläre Outcome wurde ein kombinierter Endpunkt definiert (erneuter Myokardinfarkt, Schlaganfall/TIA und kardialer Tod). Die Patientendaten nach einem Jahr Follow-Up wurden anhand schriftlicher Fragebögen, Telefoninterviews mit den Studienteilnehmern und von Hausärzten bzw. Gesundheitsämtern bezogen.
8. Der -374T>A Polymorphismus im RAGE-Gen war im Ergebnis nicht signifikant zur Inzidenz des kombinierten Endpunkts nach einem Jahr Follow-Up assoziiert. Es konnte lediglich die Tendenz beobachtet werden, dass bei Trägern des -374-TT-Genotyps der kombinierte Endpunkt früher (73,2 Wochen vs. 76,8 Wochen;  $p=0,501$ ) und häufiger (49,3% vs. 45,5%;  $p=0,545$ ) im Vergleich zu AT- bzw. AA-Trägern auftrat. Ebenso stellte sich der Schweregrad der Parodontitis nicht als signifikanter Risikofaktor für die Inzidenz des kombinierten Endpunktes dar (Parallelstudie Promotion Andrea Lutze).
9. Es ist zu vermuten, dass der Polymorphismus im Promotorbereich einen Einfluss auf die Aktivität des Gens hat. Durch eine zu erwartende Änderung der Anzahl gebildeter RAGE-Rezeptoren könnte es über eine veränderte Produktion von NF- $\kappa$ B zu krankheitsbeeinflussenden Effekten auf das Immunsystem kommen. Dabei könnte sowohl eine zu hohe als auch eine zu geringe Aktivität des Immunsystems zur Progression der Parodontitis führen.
10. Der in der vorliegenden Studie nicht nachweisbare Einfluss des untersuchten Polymorphismus auf erneute kardiovaskuläre Ereignisse könnte auf das relativ kurze 1-Jahres-Follow-Up zurückzuführen sein. Deshalb wären weitere Untersuchungen mit verlängerten Follow-Up-Intervallen notwendig.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Martin Kohnert  
Geburtsdatum: 22.12.1988  
Geburtsort: Nordhausen  
Familienstand: verheiratet  
Nationalität: deutsch

### **Schulbildung**

1995 - 1999 Staatliche Grundschule „Adolf Diesterweg“ Niedergerbra  
1999 - 2007 Staatliches Gymnasium „Friedrich Schiller“ Bleicherode  
2007 Abitur

### **Zivildienst**

2007 - 2008 Zivildienstleistender an der Helios-Klinik Bleicherode

### **Hochschulbildung**

2008 - 2013 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
2009 Naturwissenschaftliche Vorprüfung  
2011 Zahnärztliche Vorprüfung  
2013 Staatsexamen und Approbation als Zahnarzt

### **Berufstätigkeit**

01/2014 – 01/2016 Vorbereitungsassistent in Zahnarztpraxis Dipl.-Stomat. Chr. Horn,  
Halle (Saale)  
01/2016 – 03/2016 Entlastungsassistent in Zahnarztpraxis Dipl.-Stomat. Chr. Horn,  
Halle (Saale)  
seit 03/2016 Angestellter Zahnarzt in Zahnarztpraxis Dipl.-Stomat. Chr. Horn,  
Halle (Saale)

Halle (Saale), den 30.06.2016

### **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet (Amtsblatt der MLU Nr. 5, 02.07.09).

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle (Saale), den 30.06.2016

Martin Kohnert

Die vorliegende Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Weiterhin erkläre ich, dass weder diese noch eine andere Arbeit von mir einer anderen Fakultät oder Universität vorgelegt wurde.

Halle (Saale), den 30.06.2016

Martin Kohnert

### **Hinweis auf erfolgte Teilnahme an einem wissenschaftlichen Wettbewerb**

Teile der Dissertation wurden in einem Posterbeitrag anlässlich des 29. Dentsply Förderpreises auf dem Deutschen Zahnärztetag 2015 (06. & 07. November 2015) in Frankfurt (Main) vorgestellt. Thema: „Assoziation des c.-374T>A Polymorphismus im RAGE-Gen (rs1800624) zu Parodontitis und kardiovaskulären Folgeereignissen bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung (KHK)“

## Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Herrn apl. Prof. Dr. med. dent. Stefan Reichert für die Überlassung des Themas, der eingehenden Einarbeitung und seinen Vorschlägen und Hinweisen zur Gestaltung der Arbeit. Die freundliche Betreuung und seine großartige Geduld ermöglichten es, auch bei schwierigen Fragestellungen Lösungen zu finden.

Besonders danke ich Frau PD Dr. rer. nat., rer. medic. habil. Susanne Schulz für die ausführliche Einführung in die Abläufe der molekulargenetischen Untersuchungen, der Unterstützung in den statistischen Analysen und der erschöpfenden Beantwortung zahlreicher Fragen in stets sehr angenehmer Atmosphäre.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. dent. Hans-Günter Schaller danke ich für die Möglichkeit der Promotion an der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Allen drei genannten danke ich zudem für ihr Engagement zugunsten meiner Teilnahme am 29. Dentsply Förderpreis 2015 in Frankfurt.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, allen voran meinen Eltern, die mich neben der Ermöglichung meines Studiums auch durch die entgegengebrachte Motivation bei der Bearbeitung eines solch umfangreichen wissenschaftlichen Themas unterstützt haben. Weiterhin danke ich meiner Frau, für den mir entgegengebrachten Freiraum zur Durchführung der Arbeit und ihren liebevollen, mir gegebenen Rückhalt.