

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

**Assoziationen funktionell bedeutsamer Polymorphismen im RAGE-Gen zur chronischen und aggressiven Parodontitis**

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 Diana Stosberg, geb. Nedbal  
geboren am 24.12.1974 in Karl-Marx-Stadt

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

Gutachter:

1. apl. Prof. Dr. Stefan Reichert (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
2. Prof. Dr. Dr. Robert Fuhrmann (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
3. Prof. Dr. Jamal M. Stein, Msc. (Uniklinik RWTH Aachen)

03.11.2015

24.08.2016

## Referat:

Der Rezeptor für „Advanced Glycation Endproducts“ (RAGE) bindet glykierte und oxidierte Proteine, sogenannte AGEs, und aktiviert u.a. den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B. Dieser reguliert die Expression von Genen der Immunantwort die bei der Entstehung von entzündlichen Parodontitiden eine wesentliche Rolle spielen. Die Expression von RAGE wird u.a. von Polymorphismen im RAGE-Gen [c.-374T>A Polymorphismus (rs1800624), c.-429C>T Polymorphismus (rs1800625), G82S Polymorphismus (rs2070600) und die 63bp Deletion (-407 bis -345bp)] beeinflusst. Deshalb war das Hauptziel dieser Studie zu untersuchen, ob diese SNPs mit der Prävalenz einer generalisierten aggressiven Parodontitis (GAgP) und generalisierten chronischen Parodontitis (GChP) assoziiert sind. Es wurden 81 Patienten mit GAgP (40,4 $\pm$ 9,8 Jahre; 63% Frauen), 68 Patienten mit GChP (48,9 $\pm$ 9,6 Jahre; 63,2% Frauen) und 85 parodontal gesunde Kontrollprobanden (K) (46,7 $\pm$ 10,8 Jahre; 54,1% Frauen) eingeschlossen. Die klinische Charakterisierung beinhaltete die Erfassung des approximalen Plaqueindex (API), der Sondiertiefe (PD), der Blutung auf Sondierung (BOP), des klinischen Attachmentverlustes (CAL) sowie des Raucherstatus. Die Präsenz von fünf parodontalen Leitkeimen (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* und *T. denticola*) in subgingivalen Plaqueproben wurde molekularbiologisch mit Hilfe des micro-Ident<sup>®</sup> Tests (HAIN-Diagnostik) untersucht. Die RAGE-Genotypisierung erfolgte mittels PCR-Analyse und Tsp509I-Restriktionsspaltung.

Für den c.-374 T>A Polymorphismus konnte gezeigt werden, dass das T-Allel ( $p_{\text{kor}}=0,026$ ; OR=1,8; 95% Konfidenzintervall: 1,1-2,8) sowie die Genotypen AT oder TT ( $p_{\text{kor}}=0,003$ , OR=14,4; 95% Konfidenzintervall: 1,84-113,2) mit dem Auftreten einer GAgP assoziiert waren. In der logistischen Regression konnte bei Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, Raucherstatus sowie API das T-Allel als unabhängiger Risikofaktor für GAgP bestätigt werden ( $p_{\text{kor}}=0,026$ ; OR=1,8; 95% Konfidenzintervall: 1,07-2,97). Der c.-374T>A Polymorphismus war nicht zu weiteren parodontalen Risikofaktoren und dem Vorkommen von parodontalen Bakterien assoziiert.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Träger des T-Allels ein zweifach erhöhtes Risiko für GAgP besitzen. Ursache dafür könnte eine beeinträchtigte Immunantwort, möglicherweise zurückführbar auf eine T-Allel-assoziierte verringerte Transkriptionsrate (mRNA) des RAGEs, sein. Für den c.-429 C>T- und G82S Polymorphismus konnte keine Assoziation zum Auftreten von Parodontitis (GChP und GAgP) sowie zum Auftreten von parodontalen Leitkeimen ermittelt werden. Aufgrund der bekannten ethnischen Unterschiede in der Prävalenz von SNPs können die Ergebnisse dieser Studie nicht auf andere Populationen übertragen werden.



## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Einführung	1
1.2 Parodontitis	2
1.2.1 Mikrobiologie der Parodontitis	2
1.2.2 Die Immunologie der Parodontitis	5
1.2.3 Bewertung von Risikofaktoren für Parodontitis unter besonderer Berücksichtigung von Genpolymorphismen	8
1.2.4 Klassifikation der Parodontitis	9
1.3 Der Rezeptor für Advanced Glycation Endproducts–RAGE	12
1.3.1 Einführung	12
1.3.2 Struktureller Aufbau und Vorliegen des Rezeptors	13
1.3.3 RAGE und seine Liganden	14
1.3.4 RAGE und seine nachgeschaltete Signaltransduktion	16
1.3.5 RAGE und Allgemeinerkrankungen	17
1.3.6 Die Rolle von RAGE bei Parodontitis	18
1.3.7 Polymorphismen im RAGE-Gen	19
<b>2 Zielstellung</b>	<b>21</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>22</b>
3.1 Patienten der Studie, Ein- und Ausschlusskriterien	22
3.1.1 Auswahl der Patienten	22
3.1.2 Einschlusskriterien	22
3.1.3 Ausschlusskriterien	23
3.1.4 Erfassung der klinischen Daten	23
3.2 Methoden	24
3.2.1 Genomische Untersuchungen	24
3.2.2 Blutentnahme	24
3.2.3 Genotypisierung	24
3.2.4 Subgingivale Bestimmung parodontopathogener Keime	30
3.2.5 Statistische Auswertung	32
3.3 Chemikalien und Geräte	33
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>37</b>
4.1 Statistische Untersuchung der Studienprobanden	37

4.1.1	Betrachtung demografischer Parameter in Abhängigkeit von der parodontalen Diagnose	37
4.1.2	Vergleich klinisch-parodontologischer Daten unter Berücksichtigung der parodontalen Diagnose	37
4.1.3	Auftreten subgingivaler Parodontopathogene in den einzelnen parodontalen Diagnosegruppen	38
4.2	Parodontale Erkrankungen und Genetik	39
4.2.1	Der c.-374T>A Polymorphismus	39
4.2.2	Statistische Untersuchung zum Einfluss des c.-374T>A Polymorphismus im RAGE-Gen	39
4.2.3	Binäre logistische Regression: Assoziation des T-Allels des c.-374T>A Polymorphismus auf die Prävalenz von aggressiver Parodontitis	40
4.3	Weitere Polymorphismen im RAGE-Gen in Assoziation zur Parodontitis	41
4.4	Demographie und Genetik	42
4.4.1	Vergleich der Genotypen und Allele des c.-374T>A, c.-429C>T und des G82S Polymorphismus hinsichtlich der demografischen Daten	42
4.5	Klinik und Genetik	42
4.5.1	Vergleich klinisch-parodontologischer Daten unter Berücksichtigung der Genotypen- und Allelverteilung des c.-374T>A Polymorphismus	42
4.5.2	Vergleich klinisch-parodontologischer Daten unter Berücksichtigung der Genotypen- und Allelverteilung des c.-429C>T Polymorphismus	42
4.5.3	Vergleich klinisch-parodontologischer Daten unter Berücksichtigung der Genotypen- und Allelverteilung des G82S Polymorphismus	43
4.6	Bakterien und Genetik	43
4.6.1	Auftreten subgingivaler Bakterien unter Berücksichtigung der Genotyp- und Allelverteilung	43
4.7	Die 63 bp Deletion (delta 63)	43
4.8	Zusammenfassung der Ergebnisse	43
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>45</b>
5.1	Einflussfaktoren auf die Pathogenese der Parodontitis	45
5.2	Parodontaler Befund und Klassifizierung der Probanden inklusive demografischer Parameter	46
5.3	Klinische Daten der Probanden	47
5.4	Mikrobiologische Analyse der subgingivalen Plaque in den Studiengruppen	48

5.5	Biologische Plausibilität für die Untersuchung von SNPs im RAGE-Gen	48
5.6	Auswertung des c.-374 T>A und c.-429 C>T Polymorphismus	50
5.7	Auswertung des G82S Polymorphismus	52
5.8	Schlussfolgerung, Limitation und Ausblick	54
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>Thesen</b>	<b>72</b>

**Lebenslauf**

**Danksagung**

**Eidesstattliche Erklärung**

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A. a.	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
AAP	American Academy of Periodontology
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer´s Disease (Morbus Alzheimer)
AF	Allelfrequenz
AGEs	Advanced Glycation Endproducts
APC	Antigen präsentierende Zellen
API	approximaler Plaqueindex
AgP	aggressive Parodontitis
aMMP-8	Gewebsabbauende Matrixmetalloproteinase-8
Arg	Arginin
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bakt.	bakteriell
bp	Basenpaare
BMI	Body Mass Index (Körpergewichtsindex)
BOP	Bleeding on probing (Blutungsindex)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C1-9	Komplementfaktor 1-9;
C3a	Komplementfaktor 3a
C5a	Komplementfaktor 5a
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CAL	klinischer Attachmentverlust
cDNA	complementary DNA
ChP	chronische Parodontitis
del	Deletion
dest.	destilliert
DGParo	Deutsche Gesellschaft für Parodontologie
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DZ	Dendritische Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

et al.	et alii
FMLP	Formyl-methionyl-leucyl-Phenylalanin
F.n.	Fusobacterium nucleatum
g	Gramm
G	Glycin
GAgP	generalisierte aggressive Parodontitis
GCF	Sulkusflüssigkeit (gingival crevicular fluid)
GChP	generalisierte chronische Parodontitis
GF	Genotypfrequenz
Gln	Glutamin
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
H <sub>2</sub> O	Wasser
HGECs	Epithelzellen der Gingiva (human gingival epithelial cells)
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
ins	Insertion
IRAK	IL-1R-Associated Kinase
K	Parodontitisfreie Kontrollgruppe
KI	Konfidenzintervall
LPS	Lipopolysaccharid
Lys	Lysin
µl	Mikroliter
M	Mol
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger ribonucleic acid



MV	Membran Vesikel
n	Anzahl der Studienprobanden
NaBH <sub>4</sub>	Natriumborhydrid
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
n.s.	nicht signifikant
ng	Nanogramm
NF-κB	nukleärer Faktor-kappa B
NK	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
OPG	Osteoprotegerin
OR	Kreuzprodukt (odds ratio)
pMO	parodontalpathogenen Mikroorganismen
PA	Parodontitis
PAMPs	pathogen associated molecular patterns
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PD	Sondiertiefe (pocket depth)
P. g.	Porphyromonas gingivalis
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
P. i.	Prevotella intermedia
PNM	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PRR	pattern recognition receptor
RAGE	Rezeptor für Advanced Glycation Endproducts
RANK	Rezeptor Aktivator von NF-kappa B
RANKL	RANK -Ligand
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
S	Gesamtstudiengruppe
SD	Standardabweichung
Ser	Serin
SNP	single nucleotide polymorphism
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
T. d.	Treponema denticola

T. f.	Tannerella forsythensis
TGF	transforming growth factor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TM	Transmembranhelix
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris-HCl	Tris-Hydroxymethylaminomethan- Chlorwasserstoff
Trp	Tryptophan
U	Units (Einheiten)
UV	Ultraviolett
V	Volt
vs.	versus
W	Watt

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Parodontitis (PA) wird als chronisch entzündliche Erkrankung verstanden, welche in ihrer Entstehung und Progression multifaktoriell bedingt und komplex reguliert ist. Der auslösende Reiz ist primär das Vorhandensein des subgingivalen Biofilms, wobei die individuelle Immunantwort des Patienten auf die parodontalpathogenen Mikroorganismen im Biofilm für den Verlauf der Entzündungsreaktion entscheidend ist. Neben den nicht genetischen, veränderbaren Risikofaktoren für die Entstehung einer PA, wie Rauchen, ungenügende Mundhygiene oder psychischer Stress, spielen nicht veränderbare Parameter wie das Alter, Geschlecht und genetische Faktoren (Hart und Kornman, 1997) bzw. genetische Erkrankungen (z.B. das Papillon-Lefèvre-Syndrom) eine Rolle. Zudem beeinflussen Erkrankungen mit Beeinträchtigung der Immunabwehr, wie z.B. Diabetes mellitus (DM), die Entstehung und Progression einer PA (Jepsen et al., 2011).

Vor allem bei Patienten mit glykämisch ungenügend eingestellten DM, werden Advanced Glycation Endproducts (AGEs) im Parodont akkumuliert (Salvi et al., 2008) und vermehrt Abwehrzellen in den parodontalen Geweben mobilisiert, welche einen Rezeptor für diese AGEs auf der Zelloberfläche tragen. Binden die AGEs an den Rezeptor (RAGE), kommt es im Zellinneren unter anderem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors (NF- $\kappa$ B). Dadurch wird die Expression von proinflammatorischen Proteinen wie Interleukin-1(IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Adhäsionsmolekülen oder GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) begünstigt (Kislinger et al., 2001), so dass der bakterieninduzierte parodontale Abbau verstärkt wird. Die durch RAGE vermittelte Signaltransduktionskaskade spielt somit eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Parodontitis. Aufgrund von Arbeiten der Gruppe um Hudson (Hudson et al., 2001) ist bekannt, dass Polymorphismen im Bereich des Promotors im RAGE-Gen zu einer unterschiedlichen Expression von RAGE unter NF- $\kappa$ B-Stimulation und damit zu einer differentiellen Stimulierbarkeit des Signaltransduktionsweges führen. Das lässt vermuten, dass Polymorphismen im RAGE-Gen auch mögliche Indikatoren für das Auftreten von Parodontitis sind.

Im Rahmen der vorliegenden Studie sollte untersucht werden ob der Glycin82Serin-Polymorphismus (G82S-SNPs/rs2070600), die c.-374T>A (rs1800624), c.-429C>T (rs1800625) Genpolymorphismen sowie der 63bp-Deletionspolymorphismus (-407 bis -345bp Deletionspolymorphismus) zur Prävalenz einer aggressiven und/oder chronischen Parodontitis assoziiert sind.

Des Weiteren sollte in dieser Studie beurteilt werden, ob die verschiedenen Genotypen im RAGE-Gen zum Nachweis der fünf parodontalen Markerbakterien *Aggregatibacter actinomyce-*

*temcomitans* (A. a.), *Porphyromonas gingivalis* (P. g.), *Treponema denticola* (T. d.), *Tannerella forsythia* (T. f.) und *Prevotella intermedia* (P. i.) in Beziehung stehen.

## **1.2 Parodontitis**

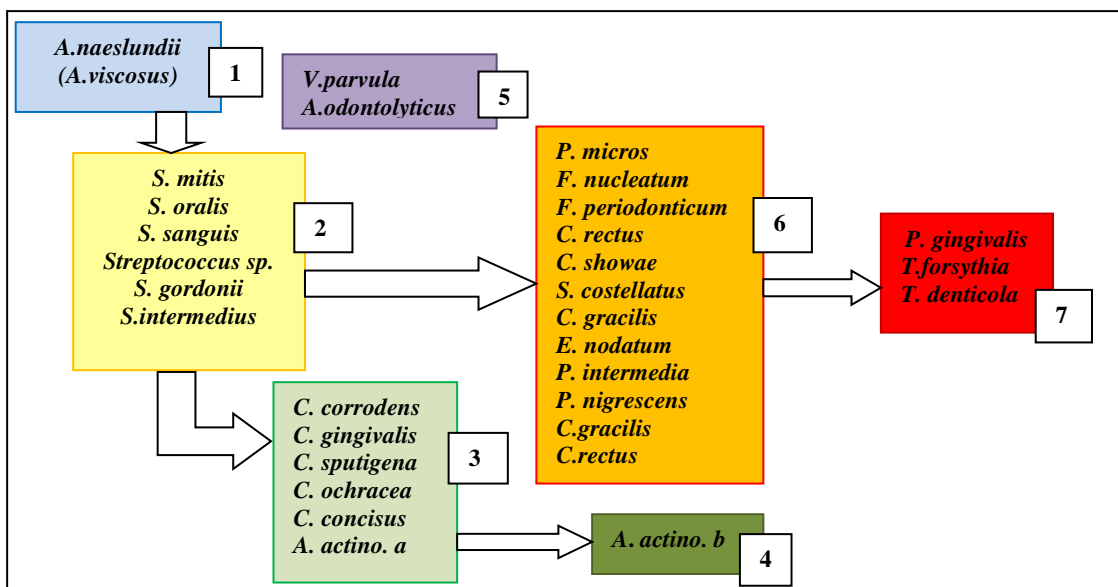
### **1.2.1 Mikrobiologie der Parodontitis**

Orale Biofilme zeichnen sich durch eine große Heterogenität und Artenvielfalt aus (Marsh 2005). Durch moderne molekularbiologische Techniken lassen sich aus der Mundhöhle geschätzte 19000 Phylotypen von Bakterien identifizieren (Keijser et al., 2008), von denen circa 415 Arten kultiviert werden können (Paster et al., 2001; ten Cate 2006). Bevor sich Bakterien auf den Zähnen anlagern bildet sich der initiale orale Biofilm, die Pellikel, aus. Hierbei handelt es sich um einen weitgehend bakterienfreien Biofilm, welcher sich an desquamationsfreien Oberflächen (Zahn- und Wurzeloberflächen, Füllungsmaterialien, Implantaten etc.) bilden kann. Er setzt sich hauptsächlich aus Proteinen, Glycoproteinen, Lipiden und anderen organischen Komponenten der Mundhöhle (Speichel, Sulkusflüssigkeit) zusammen und ist deutlich vom mikrobiellen Biofilm (Plaque) zu unterscheiden (Marsh et.al, 2005, Reich et al., 2012). Einige, meist grampositive, Bakterien sind in der Lage sich mit Hilfe spezieller Oberflächenmoleküle (Adhäsine) an Pellikelrezeptoren anzuheften. Zu ihnen zählen orale Streptokokken, gefolgt von Aktinomyzeten und Veillonellen (violetter Komplex). Diese adhären Pionierarten produzieren extrazelluläre Polysaccharide (Lektine), die der Vernetzung der Bakterien untereinander dienen, aber auch das Anheften weiterer Spezies fördern. Sie koaggregieren mit Brückenbildnern wie z.B. *Fusobacterium nucleatum* (F.n.), einer Bakterienspezies des orangefarbenen Komplexes (Kolenbrander et al., 2000). Auch Spätbesiedler wie P.g. koaggregieren über Galaktosebindende Adhäsine mit F.n. (Weiss et al., 2000). Koaggregation ist ein zentraler Mechanismus der Biofilmbildung (Metzger et al., 2009) unter dem man die gegenseitige Erkennung genetisch unterschiedlicher Bakterienarten und ihre Anheftung untereinander versteht (Marsh und Martin, 2003).

Mit zunehmender Reifung verändert sich die Zusammensetzung des Biofilms. Grampositive Bakterien werden zunehmend durch gramnegative Mikroorganismen ersetzt. Dazu zählen gramnegative Kokken sowie grampositive und gramnegative Stäbchen und Filamente (Listgarten et al., 1975; Listgarten 1976). Bakterielle Mikrokolonien vereinigen sich zu einem komplexen Biofilm von zäher und klebriger Konsistenz, welcher sich nur mechanisch entfernen lässt. Er schützt die Bakterien vor Austrocknung und der Immunantwort des Wirts. Zusätzlich ist auch die Penetration von Antibiotika erschwert (Caldwell et al., 1997; Marsh, 2004). Im letzten Stadium der Vergesellschaftung siedeln sich Bakterien des „roten Komplexes“ an. Zu ihnen zählen T. f., P. g. und *Treponema denticola* (T. d.) (Sokransky et al., 1998). Diese obligaten

Anaerobier sind mit der Entstehung einer PA assoziiert und werden deshalb als Leitkeime für die PA bezeichnet (Socransky und Haffajee, 1994; Genco et al., 1996).

*A. a.* ist ein gram-negatives, fakultativ anaerobes Stäbchen, das optimal in Gegenwart von Sauerstoff wächst, aber auch in Abwesenheit von Sauerstoff leben kann. Es exprimiert eine Reihe von Virulenzfaktoren, wie z.B. Leukotoxin, das bei Immunzellen (Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) zur Zellyse führen kann (Henderson et al., 2003). Während der Serotyp a mehrheitlich aus Stellen mit Gingivitis isoliert wird (Darveau et al., 1997), findet man vor allem *A. a.* vom Serotyp b deutlich häufiger im Biofilm von Patienten mit aggressiver Parodontitis (GAgP) (Yang et al., 2004). *A. a.* vom Serotyp b kann keinem der fünf Hauptkomplexe zugeordnet werden (Socransky et al., 1998). Das gramnegative anaerobe Bakterium *P. g.* sondert an der äußeren Membran Vesikel (MVs) ab, die wichtige Virulenzfaktoren, darunter Proteasen, sogenannte Gingipaine (Arg-Gingipain [Rgp] und Lys-Gingipain [Kgp]) enthalten (Furuta et al., 2009). Gingipaine können u.a. proinflammatorische Zytokine spalten, wodurch die Immunreaktion des Wirts herunterreguliert und die Entzündungsantwort reduziert wird (Stathopoulou et al., 2010). Eine weitere Eigenschaft von *P. g.* und *A. a.* besteht darin in menschliche gingivale Fibroblasten einzudringen und darin auch in Anwesenheit hoher Antibiotikakonzentrationen zu überleben (Irshad et al., 2012). Socransky und Mitarbeiter (Socransky et al., 1998) fassten die jeweils in einem engen Zusammenhang stehenden Bakterien zu Komplexen zusammen (Abb.1), die entsprechend ihrer Pathogenität farblich unterschiedlich gekennzeichnet wurden.



**Abb.1:** Schematische Darstellung der Entwicklung von Bakterienkomplexen in der Mundhöhle (modifiziert nach Socransky et al., 1998 und Rateitschak, Farbatlas der Parodontologie, 2012)  
 Ein Weg 1 bis 7 führt zum roten Komplex, ein anderer 1 bis 4 in Richtung *A.a.* Serotyp a und *A.a.* Serotyp b

Die Nummerierung von 1-7 stellt die Reihenfolge der bakteriellen Kolonisierung und Komplexbildung dar. Zu den Besiedlern der ersten Phase zählen Actinomyceten und Streptokokken. Der blaue, violette, grüne und gelbe Komplex treten oft miteinander vergesellschaftet auf und interagieren untereinander. Der orange Komplex umfasst mäßig bis stark pathogene Bakterien, die zwischen den Erstbesiedlern und den stark pathogenen Keimen des roten Komplexes (charakteristisch für die späte Kolonisierungsphase), vermitteln.

Um als Erreger einer Erkrankung anerkannt zu werden, mussten Bakterien ursprünglich die sogenannten Henle-Koch-Postulate (Koch 1884) vollständig erfüllen (Infektiöses Agens stets nachweisbar, Kein Vorkommen beim Gesunden, evoziert Erkrankung im Tierversuch). Da parodontale Bakterien nicht alle Eigenschaften für Erreger nach den Postulaten von Koch erfüllen, z.B. sind sie auch bei Individuen ohne Parodontitis nachweisbar, wurden von Socransky und Mitarbeitern modifizierte Eigenschaften für parodontale Erreger definiert (Socransky et al., 1994).

Postulate von Socransky et al. 1994:

1. Assoziation:  
Der Erreger muss in höherer Quantität an Stellen mit progressivem Attachmentverlust vorliegen als an solchen, die keinen zunehmenden Verlust an Stützgewebe zeigen.
2. Elimination:  
Die Elimination des Erregers beendet das Fortschreiten der Erkrankung.
3. Wirtsantwort:  
Der Erreger ruft eine zelluläre und humorale Reaktion des Immunsystems hervor.
4. Virulenzfaktoren:  
Der Erreger sollte Virulenzfaktoren besitzen, die für die Initiation und Progressionen der Erkrankungen von Relevanz sind.
5. Tierversuch:  
Die Pathogenität des Erregers im Tierversuch muss darauf schließen lassen, dass sie am Menschen eine Parodontitis auslösen können.

Als Virulenzfaktoren werden solche Strukturelemente und Stoffwechselprodukte von Bakterien bezeichnet, die die krankheitserregenden Eigenschaften einer bestimmten Spezies bedingen (Miksits et al. 1992).

### 1.2.2 Die Immunologie der Parodontitis

Auf den Angriff der parodontalpathogenen Mikroorganismen (pMO) im Biofilm reagiert das Immunsystem des Wirts mit verschiedenen Mechanismen.

In den ersten Tagen der parodontalen Infektion wird das angeborene Immunsystem aktiviert. Es wird von lokalen Abwehrzellen wie Neutrophilen Granulozyten (PMN), Monozyten, Dendritischen Zellen (DZ), natürlichen Killerzellen (NK), löslichen Komplementfaktoren sowie Akutphase-Proteinen wie C-reaktives-Protein (CRP) repräsentiert. Die angeborene Abwehr erfolgt schnell, da nur bestimmte pathogene Muster (PAMPs [pathogen-associated molecular patterns]) erkannt werden müssen. Zunächst stimulieren bakterielle Metaboliten [Butter-, Propionsäure, Peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP), LPS] aus dem Biofilm gingivale Epithelzellen zur Synthese und Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren (IL-8, TNF $\alpha$ , PGE $_2$  und MMP). Diese schädigen die Epithelzellen zum Teil direkt und erhöhen die Permeabilität für Produkte der pMO in das subepitheliale Gewebe. Durch das Saumepithel diffundierende Zellwandkomponenten parodontalpathogener Bakterien, vor allem Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien, aktivieren daraufhin lokal ansässige PMN. Diese binden mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen an Endothelzellen, lockern diese auf und verlassen die Blutgefäße entsprechend eines chemotaktischen Gefälles in Richtung Sulkus. Um ein weiteres Vordringen der pMO zu verhindern, etablieren sie zwischen Epithel und Biofilm einen ersten Abwehrwall. Der antimikrobielle Effekt der eingewanderten PMNs besteht damit vor allem in der Phagozytose, dem darauffolgenden intrazellulären Verdau der pMO, sowie der Freisetzung lysosomaler Enzyme und Entzündungsmediatoren. Für verschiedene Formen der GAgP konnte eine verringerte Chemotaxis und Phagozytosefähigkeit der PMNs auf mikrobielle Stimulation nachgewiesen werden (Clark et al., 1977; Van Dyke et al., 1987; Kimura et al., 1992). Mediatormoleküle wie Bradykinine und proinflammatorische Zytokine verstärken die entstandene Entzündungsreaktion.

Darüber hinaus können mikrobielle Polysaccharide (LPS) die Kaskade des Komplementsystems (C1-C9) direkt und antikörperunabhängig (Alternativer Weg) aktivieren (Hajishengallis, 2010). Infolgedessen kommt es zur Anaphylatoxinbildung (C3a und C5a) und Freisetzung vasoaktiver Amine (Histamin) aus perivaskulären Mastzellen. Diese erhöhen die Gefäßpermeabilität und führen zur Ödembildung. So wurde ein hoher Anteil aktivierter Komplement-Fragmente in der Sulkusflüssigkeit (GCF) von Patienten mit Parodontitis nachgewiesen, während sie bei gesunden Probanden abwesend oder nur in geringeren Konzentrationen vorhanden waren (Hajishengallis, 2010).

Einen weiteren Mechanismus zur frühen und unmittelbaren Pathogenerkennung stellen keimbahnkodierte Rezeptoren, sogenannte Toll-Like-Rezeptoren (TLR), dar. TLR gehören zu den PRR, den pattern-recognition receptors, die PAMPs erkennen können und damit der Unter-

scheidung zwischen körperfremd und körpereigen dienen. TLRs werden primär auf der Oberfläche von Makrophagen, DZ, B-Zellen, nicht-myeloiden Zellen und auf Epithelzellen sowie Fibroblasten exprimiert, kommen aber auch in löslicher Form im Plasma vor (Matsumoto et al., 2003). Bisher wurden 10 humane TLRs identifiziert (TLR1-10) (Ford et al., 2010). Für TLR-2 und TLR4 konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, dass sie auch in oralen Epithel- und Gewebezellen vorkommen (Mori et al., 2003; Ren et al., 2005) und eine enge Beziehung zur Pathogenese der Parodontitis aufweisen. Viele Studien zeigen, dass LPS von *P. gingivalis* ausschließlich TLR2 stimulieren (Kikkert et al., 2007, Pulendran et al., 2001) und allein *A. actinomycetemcomitans* sowie *V. parvula* in der Lage sind sowohl TLR2 als auch TLR4 zu aktivieren. Beide Rezeptoren stimulieren, über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, die Produktion entzündungsfördernder Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF $\alpha$  (Ford et al., 2010).

Auch die Epithelzellen der Gingiva (HGECs) reagieren auf verschiedene Bakterien des Biofilms mit der Produktion von entzündlichen Zytokinen (Stathopoulou et al., 2010). Zytokine bilden eine Gruppe von Peptiden, die der Steuerung der Immunantwort dienen. Sie sind Teil der angeborenen und der adaptiven Immunabwehr und werden von Makrophagen, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen (NKs) sowie von Fibroblasten und Epithelzellen exprimiert. Durch die Ausschüttung dieser Zytokine kommt es zur lokalen Aktivierung des Gefäßendothels, was Adhäsion, Diapedese und Infiltration weiterer Immunzellen ins gingivale Gewebe fördert. IL-1, TNF $\alpha$  und IL-6 befördern über die RANK (Rezeptor Aktivator von nuclear factor-kappa B) -RANKL (RANK-Ligand) -OPG (Osteoprotegerin) -Achse eine gesteigerte Osteoklastensynthese (Cochran et al., 2008). Zur Alveolarknochenresorption trägt zusätzlich eine erhöhte IL-6-Produktion bei. IL-6 triggert die Osteoklastendifferenzierung hemmt aber gleichzeitig die Knochenbildung. Zusätzlich steigern diese Zytokine die Freisetzung der gewebeabbauenden Matrixmetalloproteinase 8 (aMMP-8) (Sorsa et al., 1994; Teronen et al., 1997, Ford et al., 2000).

Der Gegenspieler von IL-1 ist der IL-1-Rezeptor Antagonist (IL-1RA). IL-10 bremst den alveolären Knochenverlust (Zhang und Teng, 2006) und den durch aMMP8 verursachten Gewebeabbau. Die Entzündungsreaktion ist in ihrem Verlauf und dem Schweregrad individuell verschieden und genetisch beeinflusst, hängt aber in hohem Maße auch von Umweltfaktoren ab. Überwiegt aufgrund eines bestimmten genetischen Backgrounds die Anzahl proinflammatorischer Zytokine im Vergleich zu antiinflammatorischen Zytokinen, so folgt eine Störung der Gewebshomöostase und der betroffene Patient neigt zu einer verstärkten Entzündungsreaktion und Gewebeabbau auf bakterielle Reize (Schwartz et al., 1997). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass einige Patienten mit geringer Plaquebesiedlung starke Krankheitssymptome aufweisen und wiederum andere Patienten mit starker Plaquebildung nur geringe klinische Entzündungszeichen zeigen.



Unterstützend zum angeborenen Immunsystem, greifen die Zellen der adaptiven Immunabwehr ein. Die Reaktion der adaptiven Immunantwort benötigt Zeit, da nach klonaler Expansion hochspezifische Effektorzellen gebildet werden. Sie bildet auch die Grundlage für das immunologische Gedächtnis.

Zu den Zellen der adaptiven Immunantwort zählen T-Lymphozyten und B-Lymphozyten. Die Induktion der adaptiven Immunität erfolgt dabei durch Makrophagen und DZ. Sie erkennen lokal eindringende Pathogene und phagozytieren diese. Mit dem Lymphfluss wandern sie zum nächstgelegenen Lymphknoten. Dort wirken sie als Antigen präsentierende Zellen (APC). Sie prozessieren aufgenommene Antigene über MHC-I -und MHC-II Moleküle und interagieren mit dem T-Zell-Rezeptor-Komplex (TCR) naiver T-Lymphozyten. Daraufhin differenziert sich ein Teil der T-Zellen zu CD8+T-Zellen (Tc/zytotoxisch wirksam) welche infizierte Zellen eliminieren. Weitere T-Lymphozyten differenzieren zu CD4+T-Zellen (Th0-Zellen). Diese können zu zwei Subtypen von Effektorzellen ausreifen (Th1-und Th2-Helferzellen). Th1-Zellen sezernieren vorwiegend proinflammatorische Zytokine wie IL-2, Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und TNF- $\alpha$ . IFN- $\gamma$  bremsst die parodontale Infektion indem es die Makrophagen aktiviert, die B-Zellaktivierung hemmt und eine Th2-Antwort verhindert. Diverse Studien konnten zeigen, dass in Läsionen der frühen Chronischen Parodontitis (ChP) Infiltration von Th1-Zellen (Seymour et al., 1993) und Makrophagen (Ford et al., 2010) im gingivalen Gewebe dominieren. Die Zytokine der Th2-Zellen, IL-4 und 5, aktivieren B-Zellen und Plasmazellen. IL10 blockiert die Makrophagenaktivierung, so dass sich das Th1/Th2-Gleichgewicht zugunsten der humoralen Wirtsantwort verschiebt. Der Übergang von einer frühen, stabilen parodontalen Läsion hin zu einer progressiven PA ist somit durch eine Zunahme von B-Zellen und Plasmazellen im entzündlichen Infiltrat gekennzeichnet (Ford et al., 2010). Die pathogenen Mechanismen der PA sind jedoch komplex, so dass das traditionelle Th1/Th2 Paradigma nicht mehr unumstritten ist (Arun et al., 2011).

B-Zellen differenzieren zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen und bilden gegen Bakterien der Plaque gerichtete Immunglobuline (hauptsächlich IgG) (Ebersole et al., 1993). Die Funktion der Immunglobuline besteht dabei in der Opsonierung von pathogenen Mikroorganismen für die Aufnahme durch Phagozyten, der Aktivierung des Komplementsystems (klassischer Aktivierungsweg) und der Inaktivierung bakterieller Virulenzfaktoren wie LPS, Leukotoxin, äußere Membranproteine oder Fimbrien (Ebersole, 2003).

Eine weitere T-Zell-Untergruppe stellen Th17-Zellen und das von ihnen produzierte Zytokin IL-17 dar. IL-17 unterdrückt eine effiziente Th1-Reaktion und chronifiziert Entzündungsprozesse. Es triggert in Kombination mit dem Rezeptor-Aktivator von NF-kB (RANK) und RANKL die Osteoklastenaktivierung und steigert so die parodontale Knochenresorption (Takahashi et al., 2005).

### **1.2.3 Bewertung von Risikofaktoren für PA unter besonderer Berücksichtigung von Genpolymorphismen**

Die Pathogenese der Parodontitis umfasst eine komplexe Immun- und Entzündungskaskade welche durch die oralen Bakterien im Biofilm eingeleitet wird (Cekici et al., 2014). Bei ungestörter Plaqueanlagerung kommt es zunächst innerhalb von wenigen Tagen zur Entstehung einer Gingivitis (initial, frühe und etablierte Läsion) [Smith et al., 2010]. Erfolgt keine effektive Plaquekontrolle bleibt die Gingivitis bestehen und etabliert sich. Theilade et al. konnten in Longitudinalstudien zeigen, dass die klinischen Zeichen der Gingivitis (Entzündung, Blutung, Rötung und Schwellung) durch eine entsprechend gute Mundhygiene vollständig reversibel sind (Löe, Theilade & Jensen, 1965; Theilade et al., 1966).

Trotz vergleichbarer Mundhygiene kommt es jedoch bei anderen Patienten zur Entstehung einer PA und zu einem erheblichen Verlust parodontalen Gewebes (Offenbacher et al. 1996, Page et al. 1997). Dies zeigt, dass man die Entstehung der PA nicht allein auf das Vorhandensein von parodontalpathogenen Bakterien im Biofilm zurückführen kann. Viele Menschen können über einen langen Zeitraum potentielle Parodontalpathogene im Biofilm beherbergen, ohne dass sich eine PA entwickelt (Armitage, 2000). So gilt das Vorhandensein geringer Mengen parodontalpathogener Mikroorganismen im Biofilm als physiologisch und dient der Reifung und Entwicklung des Immunsystems sowie dessen Training. Überschreiten jedoch die virulenten parodontalpathogenen Bakterien einen individuell kritischen Schwellenwert und treffen bei einem empfindlichen Wirt auf eine geschwächte Immunabwehr, kann sich aus einer etablierten Gingivitis eine PA entwickeln (Rataitschak 2012). Manifest wird die PA durch das komplexe Zusammenwirken einer Vielzahl von individuellen Risikofaktoren (Genco J.R. und Borgnakke S.W., 2013). Dazu zählen in erster Linie der Lebensstil z.B. Tabakkonsum (Tonetti et al., 1998), Stress (Genco et al., 1999), Vorerkrankungen wie DM (Taylor et al., 1998), Metabolisches Syndrom (Shimazaki et al., 2007), Osteoporose (Martinez-Maestre et al., 2010) sowie genetische Faktoren die die Sensitivität und Entzündungsbereitschaft des Wirts beeinflussen.

Michalowicz et al. haben in Zwillingsstudien erstmals gezeigt, dass die genetische Prädisposition eines Menschen wesentlichen Einfluss auf die Schwere und Ausdehnung einer Parodontitis hat (Michalowicz et al., 1991). Sie verglichen in ihrer Arbeit den alveolären Knochenabbau, PD, CAL und die Anzahl der betroffenen Zahnflächen von Zwillingspaaren mit GChP, wobei sich monozygote Zwillinge (MZ) in den parodontalen Symptomen ähnlicher waren als dizygote Zwillinge (DZ) (Michalowicz et al., 1991). So bewerteten Michalowicz et al. (2000) den genetischen Impact für das Risiko an einer GChP zu erkranken mit circa 50 Prozent. In einer Studie von Torres et al. (2010) wird eine mögliche Rolle genetischer Faktoren bei GChP zwar bestätigt, aber das Ausmaß der genetischen Wirkung auf die Schwere der PA relativiert. In dieser Arbeit wurden MZ- und DZ-Paare mit moderater bis schwerer GChP hinsichtlich klinischer Parameter

wie CAL, Knochenabbau und bakterieller Keimbesiedlung aber auch Bildungsniveau, Body-Mass-Index (BMI) und Rauchverhalten miteinander verglichen. Im Ergebnis dieser Studie zeigte sich, dass MZ-Paare gegenüber klinischen und bakteriellen Befunden diskordant waren. Die Diskordanz war jedoch für DZ-Paare größer als für MZ-Paare.

Allein für die aggressiven Formen der PA scheint der genetische Einfluss unumstritten (Rapp et al., 2011). Marazita und Mitarbeiter postulieren in ihrer Studie an Afroamerikanern mit früh beginnender PA (EOP) einen autosomal-dominanten Erbgang (Marazita et al., 1994).

Für die Beurteilung aggressiver Parodontitisformen wurden bisher vor allem Familienaggregationsstudien durchgeführt. Dies lässt sich damit begründen, dass die familiäre Häufung der AgP mit einem prozentualen Anteil von 40-50% der betroffenen Geschwister weit über der der Normalbevölkerung liegt (Kaukasier 2-3%). Studien zur familiären Aggregation lassen Schlussfolgerungen über den Erbgang einer genetischen Eigenschaft zu, erlauben jedoch keine Aussage über die daran beteiligten Gene.

In den letzten Jahre haben sich Studien intensiv mit Polymorphismen, vor allem Single Nukleotid Polymorphismen (SNPs), beschäftigt, die sich in immunologisch relevanten Genen befinden (Zytokine, Zelloberflächenrezeptoren, Chemokine). Dabei wurden unterschiedliche Assoziationen dieser SNPs zur Parodontitis nachgewiesen.

In genomweiten Assoziationsstudien wird dagegen zunächst das gesamte Genom hypothesenfrei nach SNPs, die mit einer Erkrankung assoziiert sind, gescannt. In einer aktuellen genomweiten Assoziationsstudie haben Schäfer et al. einen SNP (rs3217992) im Marker ANRIL „long-non-coding RNA“ als einen wichtigen genetischen Risikofaktor für das Auftreten von GAgP, identifiziert (Schaefer et al., 2013). Es wird vermutet, dass ANRIL in die transkriptionelle Regulation anderer Gene eingreift. Ergebnisse von Bochenek et al. lieferten die ersten Hinweise auf die regulatorische Wirkung von ANRIL auf Gene des Glucosestoffwechsels ADIPOR1 und VAMP3 sowie C11ORF10 (Funktion bisher unbekannt) (Bochenek et al., 2013).

#### **1.2.4 Klassifikation der Parodontitis**

Klassifikationssysteme bieten den Rahmen, um Ätiologie, Pathogenese und Behandlung von Krankheiten wissenschaftlich zu erforschen und sie stellen für Kliniker ein Ordnungssystem dar, anhand dessen Erkrankungen diagnostiziert und kommuniziert werden können (Armitage 1999, DGP 2013). Die gegenwärtige Einteilung der parodontalen und gingivalen Erkrankungen basiert auf den Vorgaben der American Academy of Periodontology (AAP) aus dem Jahre 1999. Sie wurde von der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DGParo) als Klassifikation für Parodontalerkrankungen aufgenommen und im Jahre 2013 aktualisiert. Daneben trägt sie den wachsenden Erkenntnissen in Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese der PA Rechnung und berücksichtigt praxisnahe Bedürfnisse. Die Einteilung von Parodontalerkrankungen folgt dabei

klinischen Kriterien, wobei sich hinsichtlich des Erkrankungsverlaufs und der Geschwindigkeit der Gewebeerstörung zwei Hauptformen der Parodontitis unterscheiden lassen. Auf diese soll im Folgenden näher eingegangen werden, da sowohl Patienten mit generalisierter aggressiver Parodontitis (GAgP, Abb.2) als auch generalisierter chronischer Parodontitis (GChP, Abb.3) in dieser Studie untersucht wurden. Beide Parodontitisformen unterscheiden sich im Alter bei Erkrankungsbeginn, der Progression des Attachmentverlusts, dem Knochenabbau und der Plaqueakkumulation voneinander (Armitage et al., 1999; Armitage et al., 2000), sie können sowohl lokalisiert als auch generalisiert auftreten. Folgende Hauptmerkmale müssen für die GAgP erfüllt sein (DGP Klassifikation der PAR-Erkrankungen 2013):

Primäre Kennzeichen (für beide Formen der AgP):

- Patient ist, abgesehen von der Parodontitis, klinisch gesund
- Rasch fortschreitende Gewebsdestruktion
- Familiäre Häufung

Sekundäre Kennzeichen (sind häufig aber nicht obligat):

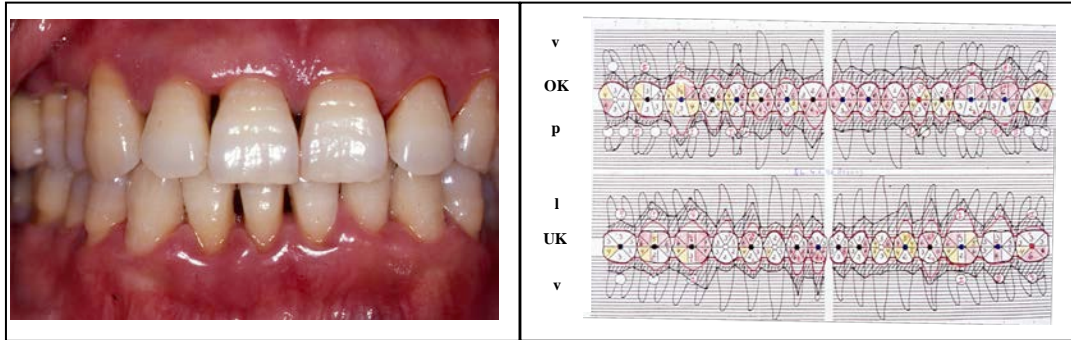
- Missverhältnis zwischen mikrobieller Besiedlung und parodontaler Gewebeerstörung
- Erhöhte Anteile von *A. actinomycetemcomitans* und (manchmal) *P. gingivalis*
- Abnorme Phagozytenfunktion
- Hyperreaktiver Phänotyp der Makrophagen mit erhöhten Spiegeln von PGE<sub>2</sub> und IL-1 $\beta$
- Progression von Attachmentverlust und Knochenverlust kann selbstlimitierend sein

Spezifische Kennzeichen der lokalisierten AgP:

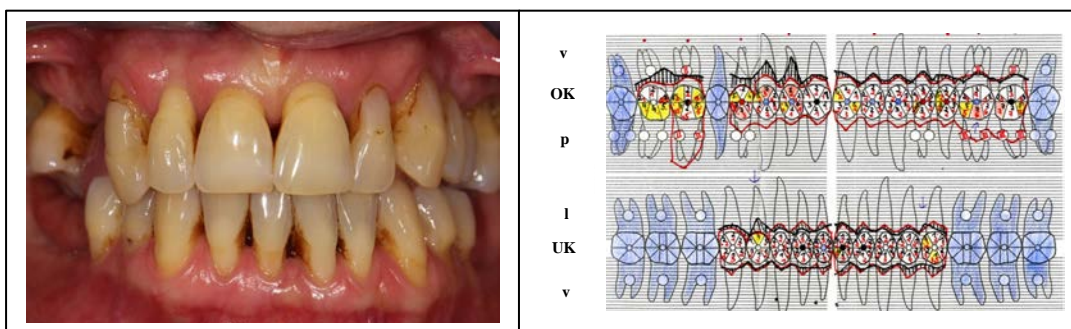
- Beginn während Pubertät
- Markante Serumantikörper gegen infizierende Bakterien
- Lokalisierter Befall der ersten Molaren/Inzisivi mit approximalen Attachmentverlust ( $\geq 4$ mm) an mindestens zwei bleibenden Zähnen, von denen einer ein erster Molar sein muss und von bis zu zwei weiteren Zähnen, die keine ersten Molaren oder Inzisivi sind

Spezifische Kennzeichen der generalisierten AgP :

- Patienten meist jünger als 30 Jahre
- Schwache Serumantikörper gegen infizierende Bakterien
- Schubhafter Verlauf von Attachmentverlust und Knochenzerstörung
- Generalisierter approximaler Attachmentverlust ( $> 4$ mm) an mindestens drei Zähnen außer den ersten Molaren und Inzisivi



**Abb.2:** Klinisches Bild und Parodontalstatus eines Patienten mit GAgP. Mineralisierte Plaque war nicht vorhanden und die Gingiva wies mäßige Entzündungszeichen auf.



**Abb.3:** Klinisches Bild und Parodontalstatus eines Patienten mit GChP mit Akkumulation mineralisierter Plaque, Knochenabbau und moderat entzündeter Gingiva.

Folgende Hauptmerkmale müssen für die ChP erfüllt sein (DGP Klassifikation der PAR- Erkrankungen 2013):

Klinische Kennzeichen:

- Überwiegend bei Erwachsenen
- Destruktion steht mit lokalen Reizfaktoren in Zusammenhang
- Variable Muster parodontalpathogener Mikroorganismen
- Subgingivaler Zahnstein häufig
- Vorwiegend langsame Progression
- Aktivitätsschübe können vorkommen
- Kann modifiziert sein durch und/oder assoziiert mit systemischen Krankheiten (DM, ischämische Herz-Kreislauf-Erkrankungen/Atherosklerose und HIV)
- Kann modifiziert werden durch Rauchen, sozioökonomische Faktoren, Stress hinsichtlich Schwere und/oder Ausmaß der ChP kann eine lokalisierte (LChP) und eine generalisierte (GChP) Form unterschieden werden
- Attachmentverluste > 5mm an weniger als 30% der Zahnflächen entsprechen einer schweren LChP

- liegen gleichzeitige Attachmentverluste von > 3mm an mehr als 30% der Zahnflächen vor so handelt es sich um eine moderate GChP in Kombination mit einer schweren LChP

Dennoch bleibt auch die aktuelle Klassifikation in ihrer Auslegung und Praxistauglichkeit umstritten. Vor allem im klinischen Bild der GAgP und GChP kommt es zu Überschneidungen in den Zuordnungskriterien, die eine eindeutige Abgrenzung der beiden Hauptformen voneinander erschwert (Kebschul et al., 2013). Einen neuen Ansatz zur Klassifikation schwerer Parodontalerkrankungen erstellten Kebschul und Mitarbeiter 2014 auf Basis von genomischen Profilen (Kebschul et al., 2014). Die Resultate dieser Studie weisen darauf hin, dass verschiedene Genexpressionssignaturen aus Biopsien parodontal erkrankter Gingiva in phänotypische Unterschiede übersetzt werden können. Dies könnte die Grundlage für eine neue, auf genetische Risikofaktoren der PA basierende, Klassifizierung sein.

### **1.3 Der Rezeptor für Advanced Glycation Endproducts - RAGE**

#### **1.3.1 Einführung**

Der Rezeptor für glykosiierte Endprodukte (RAGE) ist ein 35 kDa schwerer Multiligandenzephor der Immunglobulin-Superfamilie (Schmidt et al., 1994). Er wird auf der Oberfläche von Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen, Neuronen und zahlreichen anderen Zellen exprimiert von denen bekannt ist, dass sie eine Rolle bei der Entstehung chronischer Erkrankungen wie DM, Morbus Alzheimer (AD), Entzündungen oder Arteriosklerose spielen (Bierhaus et al., 2001).

1992 erfolgte nach Studien an bovinen Lungengewebe die Erstbeschreibung des Rezeptors durch Neeper et al. (Neeper et al., 1992). Das menschliche RAGE-Gen liegt innerhalb des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC)-Klasse-III-Region auf dem Chromosom 6p21.3 und besteht aus 11 Exons, die durch 10 Introns verflochten sind. Die Gesamtlänge der cDNA beträgt etwa 1,5 kb die teilweise mit dem PBX2 (Pre-B-cell leukemia transcription factor 2) Gen überlappt (Sugaya et al. 1994; Neeper et al., 1992). Von den circa 30 bekannten Polymorphismen im RAGE-Gen sind die meisten Single Nucleotide Polymorphismen (SNP) (Hudson et al., 2002).

RAGE zählt zur Gruppe der PPRs, welche überwiegend durch neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und Zellen des angeborenen Immunsystems, exprimiert werden. Sie sind in der Lage bestimmte Muster von Pathogenen als Pathogen Associate Molecular Patterns zu erkennen. Dazu zählen verschiedene bakterielle Zellwandproteine wie Lipopolysaccharide (LPS), Lipopeptide oder Peptidoglykane. RAGE regt nach Stimulation durch seine Liganden

und darauffolgende NF- $\kappa$ B Aktivierung die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und deren Rezeptoren an.

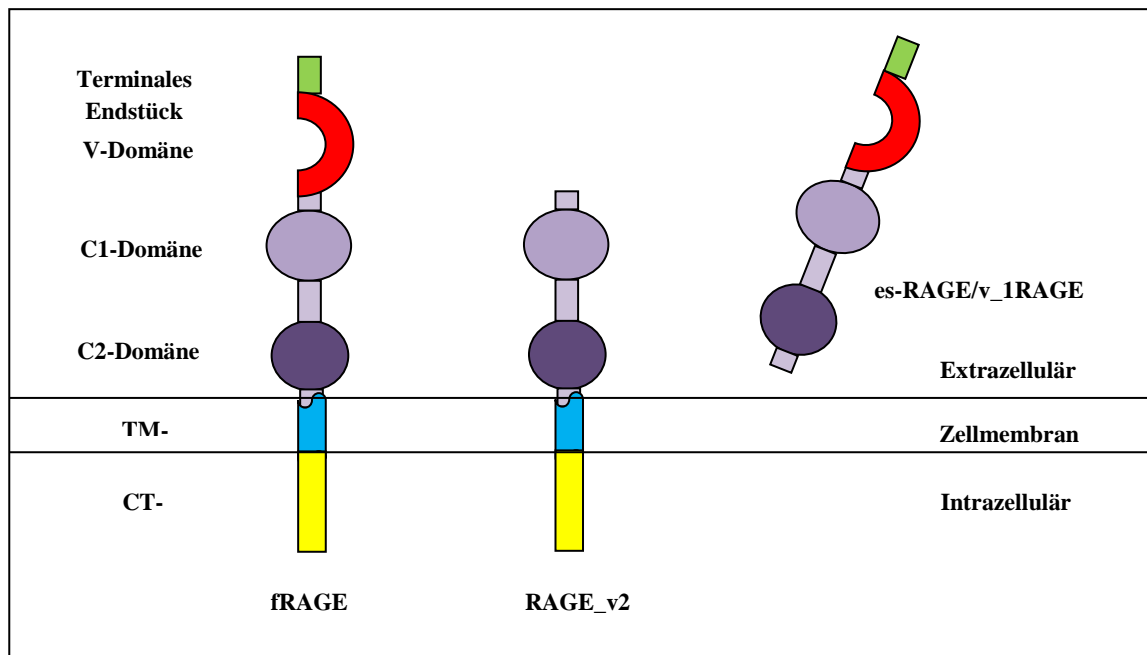
Eine Klasse von RAGE-Liganden umfasst sogenannte Advanced Glycation Endproducts (AGEs). AGEs werden in Geweben von Patienten mit Diabetes mellitus, Nierenversagen, Amyloidosen und an Orten von oxidativem Stress akkumuliert (Schmidt et al., 1996). RAGE interagiert neben AGEs auch mit Amphoterin (HMGB1), S100-Proteinen oder Proteinen mit  $\beta$ -Faltblattstrukturen (Schmidt et al., 1996). Es wird angenommen, dass die Wechselwirkung zwischen RAGE-Liganden und ihrem Rezeptor zu einer proinflammatorischen Genaktivierung führt (Bierhaus et al., 2001).

### **1.3.2 Struktureller Aufbau und Expression des Rezeptors**

Grundsätzlich ist RAGE aus 3 Einheiten aufgebaut: einem extrazellulären Teil, einer Transmembranhelix (TM), welche den Rezeptor in der Zellmembran verankert, und einem 43 Aminosäuren langen zytosolischen Endstück (CT). Die zytosolische Domäne vermittelt die Initiati-on der Signaltransduktionskaskade. Der extrazelluläre Teil umfasst drei Immunglobulin (Ig)-artige Domänen. Zum einen handelt es sich dabei um eine terminal gelegene V-Domäne, dieser variable Teil ist für die Bindung der Liganden zuständig, und zwei konstanten C-Domänen (C1 und C2), welche den konstanten Domänen der Igs ähneln und den Komplex stabilisieren (Schmidt et al., 2005).

Die Erstbeschreibung von RAGE-Spleiß-Varianten, und deren Fähigkeit, lösliche Isoformen zu bilden, erfolgte durch Malherbe et al. im Jahr 1999 (Malherbe et al., 1999). Spätere Studien führten zur Identifizierung von mehreren unterschiedlichen Spleiß-Varianten und Nomenklaturen von RAGE. Hudson et al. erstellten 2007 eine vollständige Klassifizierung und Identifizierung der Spleiß-Varianten inklusive ihrer biologischen Relevanz (Hudson et al., 2007). In dieser Studie zeigte sich, dass die meisten der Spleiß-Versionen von RAGE zur Entfernung der Transmembran-Domäne geführt haben, um lösliche Varianten (soluble RAGE/sRAGE) herzustellen. Zu den häufigsten Isoformen zählen: 1. RAGE in voller Länge (full-length-RAGE/fRAGE), 2. endogen lösliches RAGE (esRAGE/RAGE\_v1) und 3. N-terminal verkürztes RAGE (RAGE\_v2) (Srikrishna et al., 2010). fRAGE und RAGE\_v2 liegen als membranständiger Rezeptor vor, esRAGE in sezernierbarer Form ohne transmembrane Domäne (Abb.4). Die Synthese der verschiedenen Isoformen (fRAGE/RAGE\_v2/esRAGE) erfolgt durch alternatives mRNA-Spleißen oder enzymatische Spaltung (Han et al., 2011). N-terminal verkürztes RAGE bildet keine V-Domäne aus und kann daher keine Liganden binden (Srikrishna et al., 2010). Die Isoformen sRAGE/esRAGEs, sind Rezeptoren, denen der zytosolische Teil fehlt. Sie binden zwar Liganden identisch zum fRAGE, induzieren aber keine Zellaktivierung (Hofmann et al., 1999; Schmidt et al., 2000). Sie könnten hypothetisch eine medikamentöse Intervention

bei RAGE-assoziierten Erkrankungen darstellen. Hierzu wurden AGE-RAGE-Blockierversuche am Tiermodell durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden das exogen verabreichtes sRAGE zirkulierende AGEs erfassen und eliminieren kann (Yamagishi et al., 2010) und dass RAGE-Blockaden oder der Einsatz von löslichen RAGEs im Tiermodell sich günstig auf diabetische Nephropathien, parodontale Erkrankungen, Allergien vom verzögerten Typ sowie Atherosklerose auswirken (Park et al., 1998; Lalla et al., 2000, Schmidt et al., 2000; Kislinger et al., 2001). Bisher liegen keine Daten über den Einsatz von sRAGE als humanes Therapeutikum vor.



**Abb.4:** Struktureller Aufbau von RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) und seine häufigsten Isoformen. Modifiziert nach Srikrishna et al., 2010; Kalea et al., 2011

### 1.3.3 RAGE und seine Liganden

An RAGE können mehrere Liganden binden. Einer der häufigsten Liganden und Namensgeber des Rezeptors sind die "Advanced Glycation Endproducts". AGEs zählen zu einer heterogenen Gruppe von Stoffen, die durch nichtenzymatische Glykierung im Rahmen der Maillard-Reaktion (Bräunungsreaktion in der Lebensmittelchemie) entstehen (Hübschmann et al., 2006). Dabei reagieren reduzierende Kohlenhydrate mit Aminogruppen von Proteinen, Lipiden und Nucleinsäuren. Sie entstehen im Rahmen von Alterungsprozessen und durch langfristige Hyperglykämie. Glykation kann exogen oder endogen erfolgen. Exogene AGE-Bildung und Aufnahme erfolgt durch die Nahrung oder das Rauchen. In Extrakten von Tabak und Tabakrauch finden sich ebenfalls reaktive Kohlenhydrate die sich mit Serum- und Gefäßwandproteinen zu AGEs verbinden können. In einer Studie konnte in Bezug auf diese Erkenntnis belegt werden, dass der AGE-Serumspiegel bei Rauchern signifikant erhöht ist (Cerami et al., 1997).



Endogene Glykation ist ein normaler Stoffwechselprozess der vor allem im Blutkreislauf stattfindet. Die AGE-Bildung kann über ein normales Maß erhöht sein. Problematisch ist hierbei eine Anhäufung von AGEs mit dem Lebensalter. Insbesondere bei einem erhöhten Glucosespiegel im Blut kann es zu einer Schädigung von Zellen und Geweben kommen. RAGE zeigt außer der AGE-Bindung eine Affinität zu zahlreichen anderen Liganden (Tab.1).

**Tab.1:** weitere RAGE-Liganden

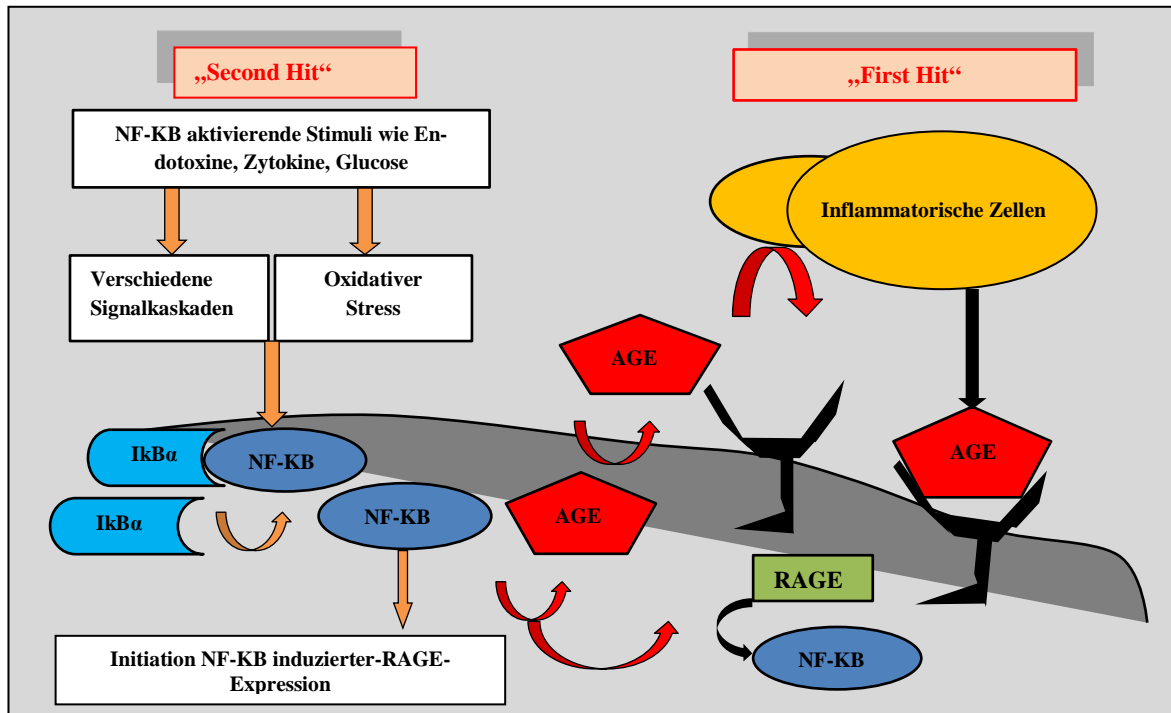
<b>RAGE Liganden</b>	<b>Funktion</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ HMGB1(Amphoterin)</li> </ul>	High Mobility Group Protein B1 dient als körpereigener Alarmstoff und wird bei Nekrose von körpereigenen Zellen freigesetzt. Es ist an der Immunabwehr, Tumorentstehung und zahlreichen rheumatischen Erkrankungen beteiligt (Bianchi et al., 2005; Klune et al. 2008).
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ S100 Proteine</li> <li>- S100b</li> <li>- S100A7/Psoriasin</li> <li>- 100A15/ Koebnerisin</li> <li>- S100P</li> </ul>	<p>Mitglieder der S100-Familie von Proteinen und Kalziumbindende Proteine, welche im Zytoplasma und Zellkern vieler Zellen lokalisiert sind. Sie spielen eine Rolle bei der Regulation von Zellzyklus und –Differenzierung. S100 Gene umfassen mindestens 20 Mitglieder, die sich als Cluster auf Chromosom 1q21 befinden (Entrez Gene).</p> <p>Kommt nur im Hirngewebe vor, wird durch Astrozyten exprimiert und ist Glia spezifisch. Es ist im erwachsenen Organismus bei Schädigung des Nervensystems erhöht und wird als Serummarker der zerebralen Schädigung bei Schädel-Hirn-Verletzungen eingesetzt (Wang et al., 2008).</p> <p>Mitglieder der S100-Familie von Proteinen.</p> <p>Sind an der Regulation von zellulären Prozessen wie Zellzyklus und Differenzierung beteiligt.</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Amyloid-β-Protein (Amyloid-beta 40 (Aβ40) und Amyloid-beta 42 (Aβ42) )</li> </ul>	Beta-Amyloidpeptide wirken antimikrobiell und werden im Organismus bei Stoffwechselvorgängen kontinuierlich erzeugt (Soscia et al., 2010). Aβ40 und Aβ42 gelten als neurotoxisch, beide sind als Ablagerungen in Gehirn und Blutgefäßen von Patienten mit Morbus Alzheimer und Down-Syndrom zu finden (Masters et al., 1985). Bei Personen mit früh einsetzender familiärer Alzheimer-Krankheit findet man erhöhte Plasma - (Aβ) 40 und -Aβ42 Level (AD) (Mayeux et al., 2003).

<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Mac-1 (Integrin <math>\alpha M\beta 2</math>)</li> </ul>	<p>Ist ein Komplement-Rezeptor (CR3- bestehend aus CD11b und CD18) und auf humanen Granulozyten (meist neutrophilen), NK-Zellen und Makrophagen lokalisiert. Die Bindung fremder Zellen an den Rezeptor bewirkt deren Phagozytose und Zerstörung. Eine Hochregulation von Mac-1 in Gegenwart von bestimmten Faktoren wie IL-2 kann zu einer Verlängerung der Lebensdauer der Immunzellen führen, während die Anwesenheit von TNF-<math>\alpha</math> die Apoptose und das selektive Entfernen der Zelle induziert (Todd et al.,1996; Schlesinger et al., 1990).</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Phosphatidylserin</li> </ul>	<p>Zählt zur Gruppe der Phospholipide und ist Bestandteil der Zellmembran bei Bakterien und höheren Organismen.</p>

### 1.3.4 RAGE und seine nachgeschaltete Signaltransduktion

Nach der Bindung von AGE an seinen Rezeptor kommt es im Zellinneren zur p38 MAP-Kinase-abhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Bierhaus et al., 2005; Goldin et al., 2006). Nach seiner Aktivierung bindet NF- $\kappa$ B an spezifische DNA-Sequenzen und begünstigt somit die Transkription verschiedener Zielgene. Diese Gene kodieren für Proteine, welche bei Entzündungsvorgängen, der Karzinogenese sowie der Apoptose, dem programmierten Zelltod, eine Rolle spielen. Auffällig ist die gesteigerte Expression des Rezeptors selbst (positive feedback-loop) als Antwort auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Dieser selbstverstärkende Effekt ist Folge einer durch RAGE-Liganden induzierten nachhaltigen Aktivierung von NF- $\kappa$ B aufgrund eines ansteigenden Levels von de novo synthetisierten NF- $\kappa$ Bp65 (Bierhaus et al., 2001). Die NF- $\kappa$ B-Bindung an den RAGE Promotor scheint dabei ursächlich an der Hochregulation der RAGE-Expression beteiligt zu sein (Li et al., 1997). An Stellen akkumulierter AGEs im Gefäßsystem findet sich folglich eine erhöhte Expression des Rezeptors in den Endothel- und glatten Muskelzellen der Gefäßwände.

Schmidt et al. vertreten dabei ein Zwei-Phasen-Modell der zellulären Störung [(Schmidt et al., 2000), Abb.5]. Die Bindung von RAGE und seinen Liganden kann als „First Hit“ bezeichnet werden. Dabei wird die Präsenz der Liganden im Gewebe durch unzureichende endogene Clearance-Mechanismen begünstigt. Der „Second Hit“ wird schließlich durch zusätzliche Akkumulation von modifizierten Lipoproteinen, eindringenden bakteriellen Pathogenen, ischämischen Stress und andere Faktoren vermittelt (Schmidt et al., 2000).



**Abb.5:** Funktionsschema RAGE modifiziert nach Bierhaus et al., 2005 “Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products.“

RAGE wandelt die akute zelluläre Aktivierung in eine nachhaltige zelluläre Antwort um. Die Aktivierung von NF-κB erfolgt durch eine Vielzahl von Reizen und hat eine erhöhte Genexpression von NF-κB-regulierten Genen zur Folge. Der RAGE Promotor selbst wird durch NF-κB gesteuert, und die Hochregulation des Rezeptors bewirkt eine steigende Anzahl von Bindungsstellen für RAGE-Liganden wie AGEs, HMGB1 und S100-Proteine. Die Bindung dieser Liganden führt wiederum zu einer RAGE-abhängigen, nachhaltigen NF-κB Aktivierung und damit zu einer gesteigerten zellulären Entzündungsreaktion.

### 1.3.5 RAGE und Allgemeinerkrankungen

Die Kenntnis über die Genese chronisch entzündlicher Erkrankungen und deren Komplikationen wächst stetig an. In diesen Zusammenhang wird dem Rezeptor RAGE eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung von Gewebsschädigungen bei chronischen Entzündungen zugeschrieben (Hofmann et al., 1999; Bierhaus et al., 2005). AGEs und deren Rezeptor (RAGE) spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) und DM (Taguchi et al., 2000). AGEs initiieren diabetische mikro- und makrovaskuläre Komplikationen indem sie Proteine der extrazellulären Matrix strukturell und funktionell (Kreuzvernetzung von Proteinen z.B. Kollagen) verändern (Barlovic et al., 2011). Darüber hinaus wird die AGEs/(HMGB-1)-RAGE-Interaktion mit dem Auftreten von Herzinsuffizienz, abdominalen Aortenaneurysmen und Arteriosklerose in Verbindung gebracht (Taguchi et al., 2000). Eine erhöhte RAGE Expression (als Rezeptor für Amyloid-β-Protein auf Neuronen, Mikroglia, Astrozyten und Endothel-

zellen) wurde in Gehirnarealen bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit (AD) beobachtet (Yan et al., 2009). Weiterhin wird vermutet, dass RAGE eine wichtige Rolle in der Tumorbilogie spielt (Logsdon et al., 2007).

### **1.3.6 Die Rolle von RAGE bei Parodontitis**

Bei der Parodontitis handelt es sich um eine entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates deren Pathogenese von vielen Faktoren beeinflusst wird. Am besten ist die Assoziation von RAGE und Parodontitis bei Patienten mit Diabetes mellitus untersucht. Leitbild des metabolischen Syndroms stellt die chronische Hyperglykämie dar, welche durch eine gestörte Insulinsekretion und/oder-wirkung verursacht wird. Dies fördert die Entstehung von AGEs und deren Anhäufung im Zellplasma aber auch im Parodont von erkrankten Personen (Salvi et al., 2008). AGEs können durch verringerte Löslichkeit, Elastizität und enzymatische Affinitäten in langlebigen Proteinen, wie Kollagen (Dunn et al. 1989, McCance et al. 1993) in Zellen und Geweben zu einer veränderten Wachstumsdynamik führen, sich in der extrazellulären Matrix anhäufen und den Zelltod initiieren und dadurch möglicherweise die Entzündungsreaktion bei Parodontitis fördern (Stitt, 2001; Wautier und Guillausseau 2001).

In vitro und in vivo Studien haben gezeigt, dass AGEs zu irreversiblen Vernetzungen in langlebigen strukturellen Matrixproteinen wie Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin (Wautier, J.L. und Guillausseau, P.J 2001) führen können. Fortgeschrittene Glykierungsendprodukte führen außerdem zu Verdickung und Veränderung der funktionellen Eigenschaften der Basalmembran, die unter anderem aus Kollagen Typ IV besteht, und können dadurch den Austausch von Zellen, Sauerstoff sowie Stoffwechselprodukten in den Geweben beeinflussen (Mott et al., 1997; Shinoda et al.1992). Binden AGEs an ihren Rezeptor auf immuninflammatorischen Zellen (Monozyten/Makrophagen, T-Lymphozyten, CD4+, CD8+) werden weitere pathogenetische Effekte ausgelöst. So kann die Freisetzung von Entzündungsmolekülen aus diesen Zellen und damit das Fortschreiten der Parodontitis verstärkt werden (Hudson et al. 2003; Vlassara et al. 1988). Die AGE-RAGE Interaktion auf Endothelzellen (EZ) führt zu oxidativem Stress und verstärkt die Ausschüttung von Adhäsionsmolekülen (vascular cell adhesion molecule VCAM-1). Die VCAM-1-Expression und die erhöhte Expression von CD18 aus Monozyten (CD11b) fördert die Anheftung von Entzündungszellen an die Gefäßinnenwände und die Diapedese dieser Zellen ins parodontale Gewebe (Wautier et al. 2001, Schmidt et al. 2003).

Direkt gewebserstörende Effekte rufen AGEs durch die Freisetzung von Enzymen wie Kollagenasen hervor, die die extrazelluläre Matrix abbauen (Nah et al. 2007). So haben Lalla et al. den Einfluss der AGE-Wirkung auf parodontale Erkrankungen an *P. g.*-infizierten Mäusen im Tiermodell aufzeigen können (Lalla et al.1998, 2000). Dabei führte die Neutralisation von AGE mittels sRAGE zur gehemmten Synthese von Entzündungszellen (TNF-alpha und IL-6) und

Matrixmetalloproteinasen, sowie zu einer Reduktion des Alveolarknochenverlusts (Lalla et al. 2000).

Diese Ergebnisse zeigen, welche zentrale Rolle die AGE-RAGE Interaktion bei einer gestörten Wundheilung bei chronischen Erkrankungen wie DM spielt. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die Rezeptor-Blockade eine gezielte Strategie zur wirksamen Wundheilung, möglicherweise auch bei Parodontitis, darstellen könnte (Goova et al., 2001).

### **1.3.7 Polymorphismen im RAGE-Gen**

Die Ätiologie komplexer Erkrankungen ist gekennzeichnet durch eine additive Wirkung genetischer Veränderungen in einer Vielzahl von Genen. Auch die PA wird als komplexe Erkrankung betrachtet, deren Phänotyp sowohl durch die individuell genetische Ausstattung des Menschen als auch durch Umwelteinflüsse (Gen-Umweltinteraktion) bestimmt wird (Yoshi et al., 2007). Man vermutet, dass ähnlich zu anderen komplexen Erkrankungen wie DM oder AD, zwischen 10 und 50 Genen an der Entstehung der PA beteiligt sind (Laine et al., 2012).

Über Generationen sind für viele Gene des Menschen Polymorphismen (Sequenzvariationen) entstanden. Unter einem Polymorphismus wird das Auftreten einer Genvariation in einer Population verstanden. Dabei muss die Allelfrequenz für das variante Allel zu mindestens einem Prozent in der Bevölkerung vorkommen, andernfalls spricht man von einer Mutation (BGG, 2004).

Durch Genpolymorphismen können Proteine in ihrer Funktion verändert sein (z.B. Ausfall oder Austausch von Aminosäuren, Leserasterverschiebungen, Splicingmutationen). Sequenzvarianten bei denen es zu einem Austausch eines einzelnen Basenpaares (Nukleotids) im Gen kommt, werden als Punktmutation oder Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) bezeichnet. Sie zählen zu den häufigsten Polymorphismen und werden mit einer Frequenz von 1 zu 1000 Basenpaaren (bp) beobachtet. SNPs können einen Menschen anfälliger für bestimmte Krankheiten machen. Treten SNPs in kodierenden oder regulatorisch wichtigen Genregionen (z.B. im Promotor) auf, kann es zur Erhöhung oder Verminderung der Transkriptionsrate des Gens und damit zu einer veränderten Verfügbarkeit des biologisch wirksamen Proteins kommen. So kann die Proteinfunktion einerseits völlig unbeeinträchtigt bleiben, andererseits kann es über verschiedene Zwischenstufen bis zur vollständigen Funktionsveränderung des Proteins kommen.

Auch Polymorphismen im RAGE-Gen, deren Erstbeschreibung durch Hudson 2001 erfolgte (Hudson et al., 2001b), könnten daher potentielle Risikoindikatoren für Parodontitis darstellen. Es gibt über 50 SNPs im RAGE-Gen, zu ihnen zählen die Polymorphismen der Promotor-Region (c.-374T>A/rs1800624 und c.-429C>T/rs1800625) und eine 63 Basenpaare umfassende Deletion (-407 bis -345). Diesen ist gemeinsam, dass sie die Genexpression von RAGE beeinflussen (Torres et al., 2011). Zusätzlich befindet sich im Exon 3 des RAGE-Gens eine Missense

Variation (G82S/rs2070600) in einer mutmaßlichen Liganden-Bindungsstelle. Dieser SNP wurde mit der Dysregulationen in der Immunantwort (z.B. Hautveränderungen bei DM), aber auch der RAGE-Expression assoziiert (Kim et al., 2009; Torres et al., 2011).

Des Weiteren scheint der Polymorphismus rs2070600 das Risiko für die Entstehung von Magenkrebs und AD zu erhöhen (Gu et al., 2008; Li et al., 2010). RAGE spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Progression von Gefäß- (Kalea et al., 2011) sowie von chronisch entzündlichen Erkrankungen. RAGE und seine Liganden werden in Geweben von Immun- und Entzündungsherden reichlich akkumuliert und ihre Interaktion fördert die Hochregulation proinflammatorischer Zytokine, von Adhäsionsmolekülen und MMPs.

## 2 Zielstellung

Primärer Faktor in der Ätiologie der Parodontitis ist das Vorhandensein des Biofilms und der darin kolonisierten parodontopathogenen Bakterien auf mineralisierten Zahnoberflächen. Zudem können sekundäre Faktoren wie Rauchen und Stress Ausdehnung und Schwere einer Parodontitis verstärken. Neben den Verhaltensrisiken hat die individuelle genetische Konstitution des Wirts einen zusätzlichen Einfluss auf den Verlauf der Parodontitis.

Zahlreiche Studien haben über einen engen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von PA und der individuellen genetischen Konstellation berichtet, wobei Zwillingsstudien dabei die aussagekräftigsten Modelle darstellen (Loos et al., 2003). So können Genpolymorphismen die Suszeptibilität des Wirts für PA modulieren.

In einer Vielzahl von Studien wurde der Einfluss von SNPs auf das Auftreten von ChP und AgP untersucht (Stabholz et al., 2000). In Bezug auf die Parodontitis sind vor allem genetische Polymorphismen von Interesse, die sich auf Kandidatengene beziehen, die für Mediatoren der Immunantwort kodieren. Um Kandidatengene von komplexen, polygenen Erkrankungen zu überprüfen, sind besonders SNP-Analysen des vermutlich involvierten Gens geeignet.

In der vorliegenden Arbeit sollte erstmals überprüft werden, ob die genetischen Sequenzvariationen c.-429C>T (rs1800625) und c.-374T>A (rs1800624) sowie die 63-bp-Deletion (-407 bis -345) und der G82S-Polymorphismus (G82S-SNPs/rs2070600) im RAGE-Gen eine Assoziation zur Präsenz einer GAgP, GChP und/oder dem Vorkommen von parodontalen Leitkeimen (*A. a.*, *P. g.*, *T. d.*, *T. f.* und *P. i.*) aufweisen.

Da für die Polymorphismen eine veränderte RAGE-Expression bereits nachgewiesen wurde vermuten wir, dass Patienten mit entzündlichen parodontalen Erkrankungen (GAgP, GChP) eine veränderte Genotyp- bzw. Allelverteilung im Vergleich zu parodontal gesunden Probanden aufzeigen. Sollte ein Polymorphismus im RAGE Gen als parodontaler Risikoindikator bestätigt werden, könnten betroffene Patienten frühzeitig identifiziert werden und ihnen eine entsprechend individuelle Prophylaxe angeboten werden.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Patienten der Studie, Ein- und Ausschlusskriterien**

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

Für diese Studie wurden 234 Probanden untersucht, wobei die Test- und Kontrollprobanden Kaukasier deutscher Herkunft waren und untereinander kein Verwandtschaftsverhältnis bestehen durfte. Die Diagnosestellung erfolgte modifiziert nach dem neuen Klassifikationssystem der Parodontalerkrankungen (Armitage, 1999). Jeder Studienpatient wurde vor der Untersuchung und Probeentnahme schriftlich und mündlich über das Ziel dieser Studie informiert und hat eine Einverständniserklärung zur Verwendung seiner Daten in anonymisierter Form unterschrieben. Die genetische Untersuchung der Parodontitispatienten und parodontitisfreien Kontrollen wurden von der Ethikkommission der Martin-Luther-Universität genehmigt. Die Studie wurde nach den Richtlinien der Deklaration von Helsinki (Oktober 2000) und Empfehlungen für good laboratory practice (OECD, 1999) bzw. good clinical practice (FDA, 2003) durchgeführt.

Alle Patienten und Kontrollprobanden wurden persönlich oder unter Aufsicht von apl. Prof. Dr. S. Reichert von der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg untersucht.

##### **3.1.2 Einschlusskriterien**

Für die Diagnostik von Patienten mit generalisierter chronischer Parodontitis galt:

- Attachmentverlust  $\geq 4$ mm von mindestens 30% der Zähne
- das Ausmaß des Attachmentverlusts war konsistent zur diagnostizierten Menge an bakteriellen Auflagerungen
- im Röntgenbild wurde mehr horizontaler als vertikaler Knochenverlust diagnostiziert

Für die Diagnostik von Patienten mit generalisierter aggressiver Parodontitis galt:

- Erkrankungsbeginn vor dem 35igsten Lebensjahr (wenn zum Zeitpunkt der Untersuchung der Patient älter als 35 Jahre war, wurde die Diagnose aggressive Parodontitis gestellt, wenn aus anamnestischen Angaben oder alten Röntgenbildern eindeutig hervorging, dass der Erkrankungsbeginn vor diesem Zeitpunkt lag)
- Attachmentverlust  $\geq 4$ mm von mindestens 30% der Zähne, mindestens 3 Zähne waren zusätzlich zu den ersten Molaren und Inzisivi betroffen
- das Ausmaß des Attachmentverlusts war inkonsistent zu den diagnostizierten bakteriellen Auflagerungen und in vielen Fällen auch zum Lebensalter des Patienten



- Im Röntgenbild wurden mehr vertikale als horizontale proximale Knochendefekte gefunden.

Für die Diagnostik von parodontitisfreien Kontrollprobanden:

- mindestens 30 Jahre alt
- keinen Attachmentverlust  $\geq 3,5$ mm infolge von Parodontitis.
- Attachmentverlust infolge traumatischen Zähneputzens, überkonturierter Füllungs- bzw. Kronenränder oder primärer endodontischer Läsionen wurden nicht als Parodontitisfall gewertet. Ebenso waren Pseudotaschen, z.B. an endständigen Molaren, kein Ausschlusskriterium.

### **3.1.3 Ausschlusskriterien**

Von unserer Studie wurden Probanden, welche nicht eindeutig zu einer der 3 oben genannten Gruppen zugeordnet werden konnten, ausgeschlossen. Weitere Ausschlusskriterien waren die Einnahme von Antibiotika weniger als 6 Monate vor der Untersuchung, die Einnahme von Medikamenten, die die Immunabwehr und die Entzündungsneigung des Parodonts beeinflussen könnten bzw. zu Gingivahyperplasien führten sowie das Vorliegen von Allgemeinerkrankungen, für die eine Assoziation zur Parodontitis oder den in dieser Studie untersuchten Genpolymorphismen bekannt ist. Des Weiteren wurden Schwangere und Probanden, bei denen sechs Monate vor der Therapie ein subgingivales Scaling durchgeführt wurde, von der Studie ausgeschlossen.

### **3.1.4 Erfassung der klinischen Daten**

Im Befundblatt wurde zu den persönlichen Angaben wie Name und Alter, ein kurzer allgemeiner Gesundheitsstatus erhoben (Herz-Kreislauf-, Stoffwechsel-, und Infektionserkrankungen, Allergien, Medikamenteneinnahme, Schwangerschaft). Die Probanden wurden nach einer eventuellen familiären Häufung der Parodontalerkrankung befragt, wobei ausschlaggebend war, ob Familienangehörige ersten Grades, also Eltern und Geschwister, frühzeitigen Zahnverlust durch Parodontitis erlitten hatten. Ebenso wurde ein Raucherstatus erhoben, wobei die Studienteilnehmer in 2 Kategorien, Raucher und Nichtraucher, eingeordnet wurden. Raucher wurden nach der Anzahl der täglich gerauchten Zigaretten befragt. Bei der Auswertung galten Probanden, die aktuell mindestens eine Zigarette pro Tag rauchten oder weniger als 12 Monate vor der Untersuchung mit dem Rauchen aufgehört hatten, als Raucher. Wurde dagegen mit dem Rauchen bereits mindestens 12 Monate vor Untersuchungsbeginn aufgehört, so wurden die Probanden der Gruppe der Nichtraucher zugeordnet.

Im klinischen Teil des Befundblattes wurde der Parodontalstatus des Studienteilnehmers erfasst. Zunächst wurden die fehlenden Zähne bestimmt (M= Anzahl fehlender Zähne ohne Weisheitszähne). Anschließend wurden in Sechspunktmessung die Sondiertiefe (PD= Distanz Taschenfundus bis marginale Gingiva) sowie der klinische Attachmentverlust (CAL= Distanz Schmelz-Zement-Grenze bis Taschenfundus) mit einem Parodontometer (PCPUNC 156, Hu-Friedy, Chicago, USA) in Millimereinteilung bestimmt. Etwa 30 Sekunden nach erfolgter Sondierung wurde notiert, ob eine Sondierblutung vorliegt. In die Mittelwertberechnung gingen jeweils die höchsten Werte für PD und CAL pro Zahn ein. Zur Bestimmung der Ausdehnung der Parodontitis wurde der prozentuale Anteil von Zähnen mit PD bzw. CAL von <4mm, 4-6mm und > 6mm erfasst. Außerdem wurde der prozentuale Anteil von Zähnen mit Sondierblutung (BOP) berechnet. Zur Beurteilung der Mundhygiene wurde der Approximale Plaque Index (API) (Lange et al. 1977) bestimmt. Dazu wurde mit einem Plaquerevelator (Mira-2-Ton, Hager & Werken, Duisburg, Deutschland) die Plaque innerhalb der Approximalräume des I. und III. Quadranten von oral sowie des II. und IV. Quadranten von vestibulär angefärbt. Nach einmaligem Ausspülen wurde bewertet, ob an den untersuchten Stellen Plaque vorlag oder nicht. Das Ergebnis wurde anschließend in Prozent angegeben (Anzahl positiver Messpunkte/Anzahl vorgenommener Messungen x 100).

## **3.2 Methode**

### **3.2.1 Genomische Untersuchungen**

### **3.2.2 Blutentnahme**

Es wurden bei allen Studienprobanden ca. 9 ml Blut nach Venenpunktion entnommen und in einer EDTA-Monovette (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) für die spätere DNA-Isolation kühl gelagert.

### **3.2.3 Genotypisierung**

#### **DNA-Isolation**

Die DNA Isolation aus dem EDTA-Blut erfolgte mittels eines kommerziellen QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland). Dabei wurden 200µl Blut in ein 1,5ml Tube pipettiert und nach Zugabe von 20µl Proteinase K und 200µl Puffer AL 15 min bei 56°C schüttelnd inkubiert. Nach kurzem Zentrifugieren (Heraeus, Hanau, Deutschland) wurden 200µl Ethanol hinzugegeben und der Ansatz auf die Mitte eines Säulchens pipettiert, um das Tube dann noch einmal für 1 min bei 8000rpm zu zentrifugieren. Das Säulchen wurde nun auf ein neues Sammeltube gesetzt und die DNA mit 500µl Puffer AW1, anschließend mit 500µl AW2 gewaschen und für 3 min bei 13000rpm zentrifugiert. Nachdem das Säulchen nun trocken war, wurde die

DNA mit 200µl sterilem Aqua dest. nach 5minütiger Inkubation durch Zentrifugation (1min, 13000rpm) von der Säule eluiert. Die gelöste DNA wurde bei -20°C gelagert.

### Die Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion gestattet es, definierte DNA-Abschnitte exponentiell zu vermehren. Somit können auch geringe Mengen Ausgangs-DNA vervielfältigt werden. Die Proben durchliefen mehrmals hintereinander die drei Reaktionsschritte der Denaturierung, des Annealings und der Elongation. Für die PCR wurden ein sogenannter Forward- und ein Reverse Primer (beides DNA-Oligonukleotide) verwendet, die mit den Randbereichen des zu amplifizierenden DNA-Fragments komplementär sind und so mit diesen hybridisieren konnten.

Für den spezifischen Nachweis der Polymorphismen wurden die in Tab.2 aufgeführten Primer eingesetzt.

**Tab.2:** Für den PCR-Nachweis verwendete Primer

<b>Polymorphismus</b>	<b>Primer</b>	<b>PCR-Produkt</b>
1. c.- 374T>A-SNPs (rs1800624)	Forward-Primer/RAGE 5 <b>3'-TCA GAG CCC CCG ATC CTA TTT-5'</b>	345bp
2. c.- 429C>T-SNPs (rs1800625)	Reverse-Primer/RAGE 6 <b>5'-GGG GGC AGT TCT CTC CTC-3'</b>	
3. 63bp-Deletion (- 407 bis -345bp)		
4. G82S-SNPs (rs2070600)	Forward-Primer/RAGE 1 <b>3'-GGC CAA GGC TGG GGT TGA AGG-5'</b>  Reverse-Primer/RAGE 2 <b>5'-GTA AGC GGG GCT CCT GTT GCA -3'</b>	397bp

### Pipettieren der PCR-Ansätze

Für die PCR (Ansatz 25 µl) wurden 12,5 µl 2xMaster Mix (Promega, Mannheim, Deutschland), 0,5µl (10pmol/µl) Forward-Primer/RAGE, 0,5µl (10pmol/µl) Reverse-Primer/RAGE (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland), 10,5 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl (50ng/µl) genomische DNA, entsprechend dem Pipettierschema Tab.3, gemischt. Für jede Präparationsreihe wurde eine Nullkontrolle ohne DNA mitgeführt. Die PCR wurde im Thermocycler unter dem in Tab.4 zusammengefassten Protokoll durchgeführt.

**Tab.3:** Pipettierschema für einen Ansatz

<b>2xMastermix in µl</b>	12,5
<b>Forward-Primer (10 pmol/µl) in µl</b>	0,5
<b>Reverse-Primer (10 pmol/µl) in µl</b>	0,5
<b>H<sub>2</sub>O in µl</b>	10,5
<b>Genomische DNA (50ng/µl) in µl</b>	1

**Tab.4:** Thermocyclerparameter für die Bestimmung der 4 untersuchten Genpolymorphismen

<b>PCR-Programm</b>	Temperatur	Zyklenzahl	Zyklendauer
<b>Denaturierung</b>	94°C		2min
<b>Denaturierung</b>	92°C	15 Zyklen	40sec
<b>Annealing</b>	54°C		40sec
<b>Elongation</b>	72°C		1min
<b>Delay</b>	72°C		
<b>Denaturierung</b>	92°C	25 Zyklen	40sec
<b>Annealing</b>	49°C		40sec
<b>Elongation</b>	72°C		1min
<b>Delay</b>	72°C		1sec
<b>Abschließende Elongation</b>	72°C		5min

#### Genotypisierung der Polymorphismen mittels RFLP (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus) und Längenpolymorphismus

Über RFLP können spezifische genetische Veränderungen nachgewiesen werden, die krankheitsverursachend sein können. Ein sehr wichtiges Hilfsmittel dabei sind die Restriktionsendonukleasen, bakterielle Enzyme, die eine spezifische DNA-Sequenz erkennen und die DNA hier schneiden.

Befindet sich ein Polymorphismus innerhalb dieser Erkennungssequenz, so wird nur eine der beiden polymorphen Nukleotidpositionen geschnitten, die andere nicht. Dieser Vorgang wird Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP) genannt. Mittels RFLP wurde die Genotypisierung der SNPs c.-374T>A, c.-429C>T und G82S durchgeführt.

Die 63bp-Deletion konnte über den Nachweis unterschiedlich langer PCR-Fragmente detektiert werden. Die Identifikation erfolgt als Längenpolymorphismus. Für alle Polymorphismen wurde die Trennung der DNA-Fragmente unter Anwendung der Agarosegelelektrophorese in der

Elektrophoresekammer (Peqlab, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Nach Einbringen des DNA-Gemisches in die Slots eines 2%igen Trägergels [1g Sekam-Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland), 50ml 0.5xTBE, 50µl Ethidiumbromid] wandern die DNA-Fragmente durch Anlegen eines elektrischen Feldes (80V, 20min). In diesem entwickelt jedes Molekül eine spezifische Wanderungsgeschwindigkeit, abhängig von seiner Größe, Form und Nettoladung, sowie der angelegten Spannung, wobei sich kürzere Fragmente schneller als längere im Gel bewegten. Da die Nukleotide der DNA negative Ladungen tragen, wandern sie in einem elektrischen Feld zur Anode (positive Elektrode). Das Ergebnis sind im Gel sichtbare Banden. Jeweils in den ersten Slot des Gels wurden 0,3µg einer kommerziell erhältlichen 100bp-DNA-Leiter (Carl-Roth-GmbH, Karlsruhe, Deutschland) pipettiert, eine Mischung verschiedener DNA-Stränge bekannter Basenpaarlänge. So konnten die Längen der einzelnen Fragmente bestimmt und der jeweils vorliegende Polymorphismus identifiziert werden.

Der fluoreszierende Farbstoff Ethidiumbromid lagerte sich während des Gellaufs in die DNA ein und visualisierte die DNA-Banden nach beendeter Elektrophorese unter dem UV-Transilluminator (AGS, Heidelberg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 320 nm (Abb. 6-9).

Pipettieren der RFLP-Ansätze:

Dem Ansatz für den Restriktionsverdau (25 µl) wurden, neben dem bereits darin enthaltenen PCR-Produkt, zusätzlich 2,5µl 10 x Puffer (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) zugegeben. Außerdem erfolgten je nach Polymorphismus die Zugabe des Restriktionsenzym 4U Tsp509I (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) und der Verdau im PCR-Gerät für 8h bei 65°C, bzw. AluI (0,4µl, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) für 8h bei 37°C.

Für die vorliegenden Polymorphismen wurden die in Tab.5 aufgeführten Restriktionsenzyme verwendet.

**Tab.5:** Verwendetes Restriktionsenzym zum Nachweis des jeweiligen Polymorphismus

<b>Polymorphismus</b>	<b>Restriktionsenzym</b>
c.-374T>A-SNPs	Tsp509I
c.-429C>T-SNPs	AluI
Gly82Ser-SNPs	AluI

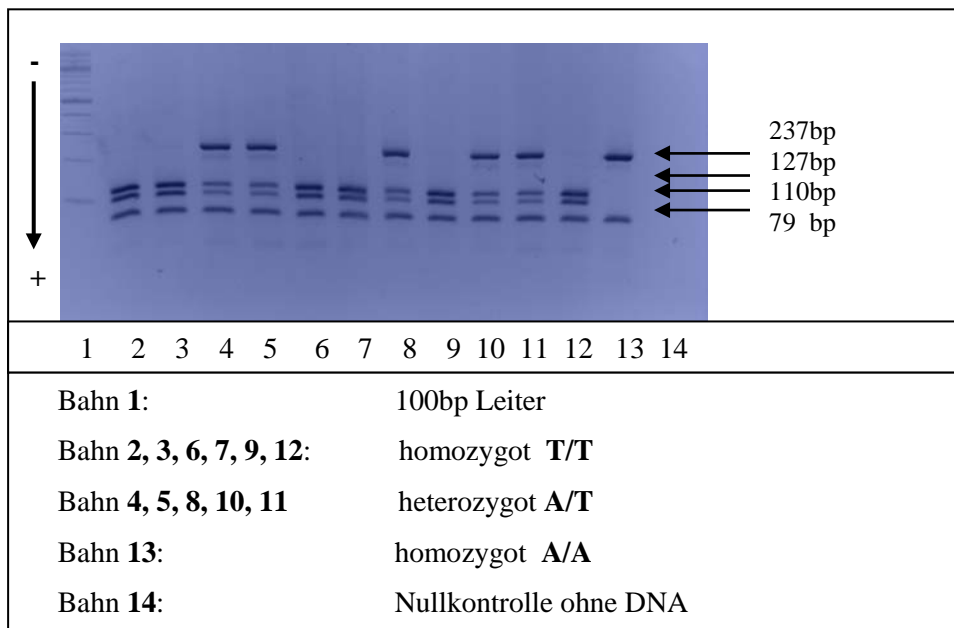
Nach Spaltung des PCR-Produkts mit den Restriktionsenzymen entstanden Produkte unterschiedlicher Längen (Tab.6). Je nach Allel wurde das Fragment geschnitten oder es blieb ungespalten.

**Tab.6:** Genotypen und Fragmentlängen der geschnittenen und ungeschnittenen PCR-Produkte

<b>Polymorphismus</b>	<b>PCR Produkt (unverdaut)</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Fragmentlängen (verdaut)</b>
c.-374T>A-SNPs  (rs1800624)	345bp	Homozygot (A/A)	237bp,79bp und 29bp
		Heterozygot (A/T)	237bp,127bp,110bp,79b und 29bp
		Homozygot (T/T)	127bp,110bp,79bp und 29bp
c.-429C>T-SNPs  (rs1800625)	345bp	Homozygot (T/T)	345bp
		Heterozygot (C/T)	345bp, 215bp und 130bp
		Homozygot (C/C)	215bp und 130bp
63bp-Deletion  (-407 bis -345bp)	345bp	Homozygot ohne Deletion (II)	345bp
		Heterozygot (ID)	345bp und 282bp
		Homozygot mit Deletion (DD)	wurde bisher noch nicht beschrieben und konnte in dieser Studie ebenfalls nicht identifiziert werden
G82S-SNPs  (rs2070600)	397bp	Homozygot (G/G) (Aminosäuren: G/G, Basen: G/G)	248bp und 149bp
		Heterozygot (G/S) (Aminosäure: G/S, Basen: A/G)	248bp, 181bp, 149bp und 67bp
		Homozygot (S/S) (Aminosäure: S/S, Basen: A/A)	181bp, 149bp und 67bp

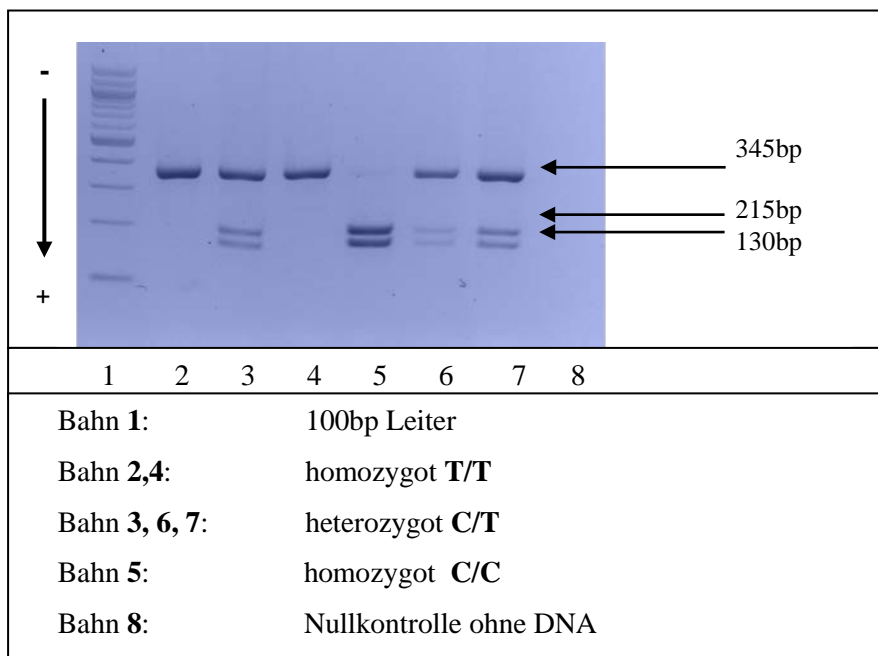
A: Adenin; C: Cytosin; D: Deletion; G: Glycin; I: Insertion; S: Serin; T: Thymin

Abbildung 6 zeigt exemplarisch die Banden von 12 Patienten zum Nachweis des c.374T>A-SNPs unter UV-Licht.



**Abb.6:** Gelbild zum Nachweis des c.-374T>A-SNPs

Abbildung 7 zeigt exemplarisch die Banden von 6 Patienten zum Nachweis des c.429C>T-SNPs unter UV-Licht.



**Abb.7:** Gelbild zum Nachweis des c.-429C>T-SNPs

Abbildung 8 zeigt exemplarisch die Banden von 5 Patienten zum Nachweis des G82S-SNPs Genotypisierung auf einem Agarosegel unter UV-Licht.

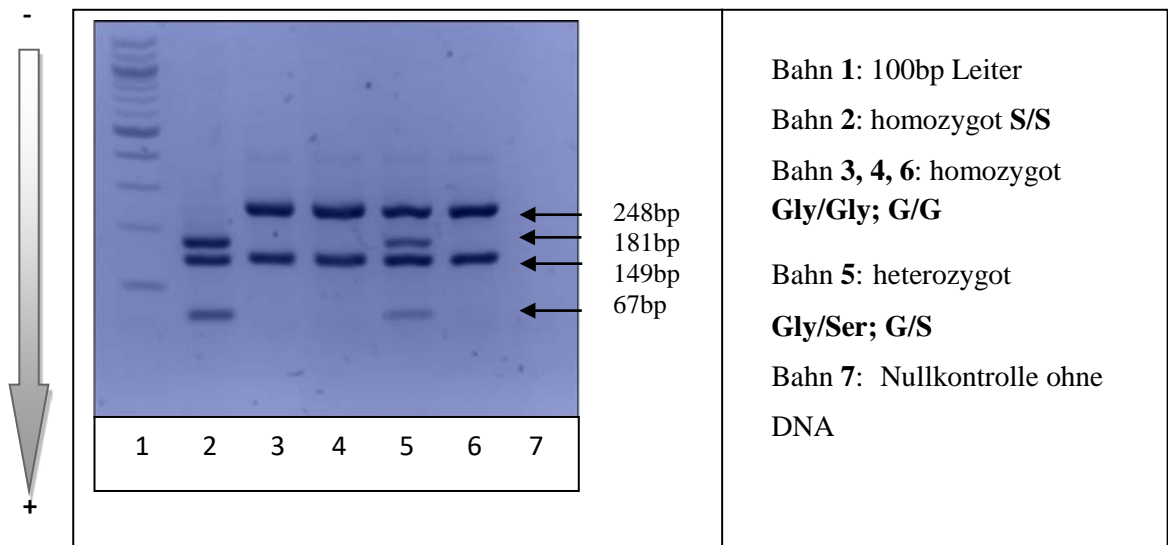


Abb.8: Gelbild zum Nachweis des G82S-SNPs

Abbildung 9 zeigt exemplarisch die Banden von 5 Patienten zum Nachweis der 63bp-Deletion unter UV-Licht.

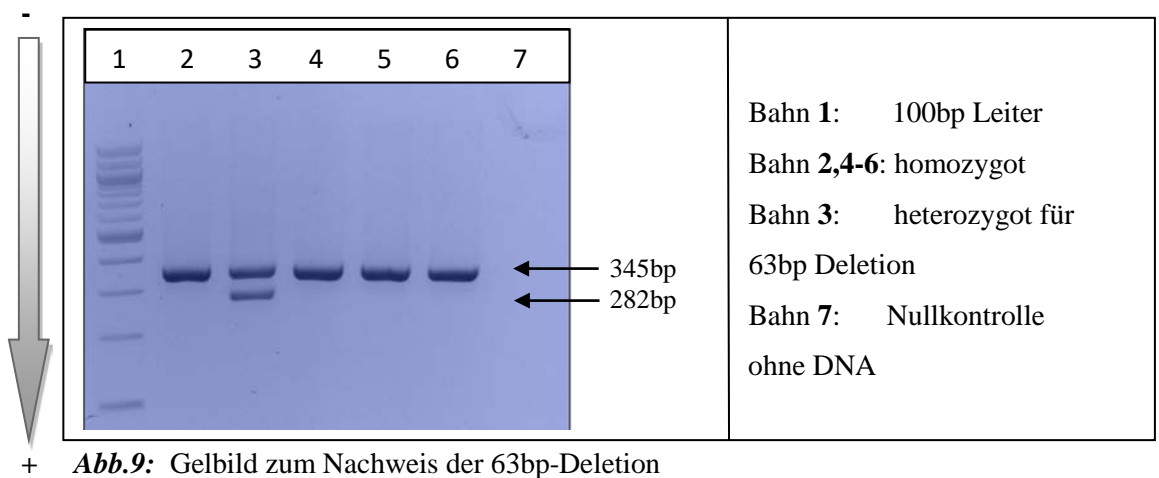


Abb.9: Gelbild zum Nachweis der 63bp-Deletion

### 3.2.4 Subgingivale Bestimmung parodontopathogener Keime

Die Identifikation der 5 Markerkeime *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. a.*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*), *Prevotella intermedia* (*P. i.*), *Tannerella forsythia* (*T. f.*) und *Treponema denticola* (*T. d.*) für die Parodontitis erfolgte mittels des kommerziell erhältlichen molekulardiagnostischen micro-IDent<sup>®</sup> Tests (HAIN Lifescience, Nehren, Deutschland).



### Probenentnahme für den molekularbiologischen Nachweis parodontaler Markerkeime

Zur Entnahme der subgingivalen Plaqueproben wurde bei jeder Testperson die jeweils tiefste Tasche pro Quadrant identifiziert. Danach erfolgte an den Testzähnen eine supragingivale Plaqueentfernung und relative Trockenlegung mit Watterollen. Die subgingivale Plaque wurde mittels einer sterilen endodontischen Papierspitze entnommen, die dazu schnell bis auf den Taschenfundus eingeführt wurde und dort für 20 sec. verblieb. Anschließend wurden die vier Proben eines Patienten in einem Eppendorfröhrchen gepoolt. Die Mittelwerte für Sondiertiefe ( $PD_{\text{bakt.}}$ ) und Attachmentverlust ( $CAL_{\text{bakt.}}$ ) an den Probeentnahmestellen wurden registriert. Das Eppendorfröhrchen wurde kühl gelagert und die Isolation der DNA erfolgte innerhalb von sieben Tagen.

### DNA-Isolation der mikrobiellen Plaque

Die bakterielle DNA wurde mittels QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Hierbei wurden die Papierspitzen mit 180  $\mu\text{l}$  ATL-Puffer und 20  $\mu\text{l}$  Proteinase K für 10 min bei 70 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 200  $\mu\text{l}$  AL-Puffer hinzugegeben, um noch einmal 5 min bei 95 °C zu inkubieren. Die im Puffer gelöste DNA wurde auf eine Säule (QIAamp spin column) pipettiert und zweimal mit jeweils 500  $\mu\text{l}$  der Puffer AW1 und AW2 gewaschen. Abschließend wurde die bakterielle DNA in 400  $\mu\text{l}$  AE-Puffer gelöst und bei -20 °C gelagert.

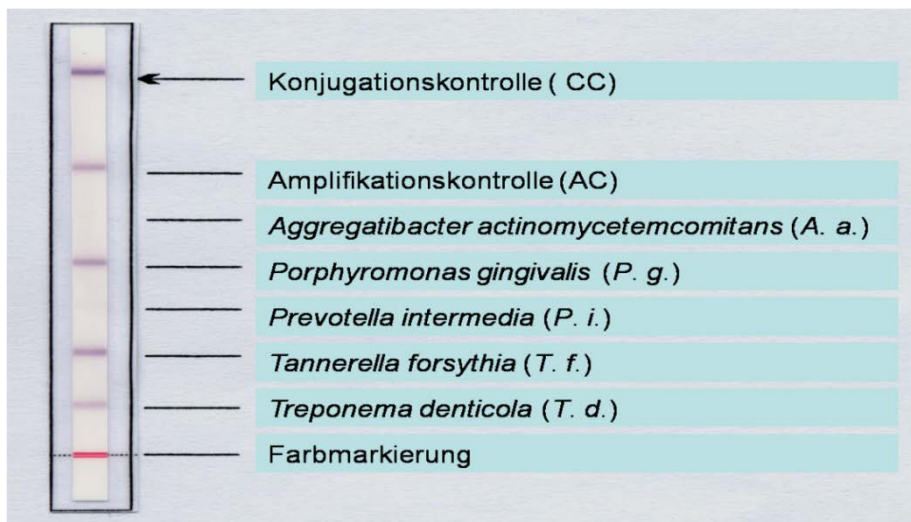
### PCR

Für die Amplifikation der DNA der fünf parodontopathogenen Markerkeime wurde der micro-IDent<sup>®</sup> Test verwendet (HAIN Lifescience, Nehren, Deutschland), wobei 35  $\mu\text{l}$  Mastermix (bestehend aus Puffer, biotinylierter Primer und DNA als Positivkontrolle), 2 U Taq-Polymerase (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und 5  $\mu\text{l}$  der isolierten DNA-Lösung gemixt wurden. Die PCR erfolgte im Thermocycler nach folgendem Programmierungsprotokoll: 5 min bei 95 °C; 10 Zyklen: 30 s 95 °C, 2 min 58 °C; 20 Zyklen: 25 s 95 °C, 40 s 53 °C, 40 s 70 °C; 8 min 70 °C.

### Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte gemäß den Herstellerangaben der Firma HAIN Lifescience. 20  $\mu\text{l}$  des PCR-Produkts und 20  $\mu\text{l}$  der Denaturierungslösung wurden in eine Inkubationswanne pipettiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 1 ml auf 45 °C vorgewärmter Hybridisierungspuffer wurde hinzugegeben und ein mit spezifischen Gensonden beschichteter Membranstreifen so in die Wanne gelegt, dass er vollständig von der Flüssigkeit bedeckt war. Nun wurde die Wanne für 30 min bei 45 °C im Schüttelwasserbad (Eppendorf, Hamburg Deutschland) inkubiert. Danach wurde der Hybridisierungspuffer vollständig entfernt und die Membran mit

1 ml Stringent Waschlösung 15 min bei 45 °C im Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. Nachdem die Stringent-Waschlösung entfernt wurde, wurde der Membranstreifen für 1 min unter ständiger Bewegung mit 1 ml Rinse-Lösung gewaschen, um dann für 30 min mit 1 ml verdünntem Konjugat inkubiert zu werden. Die Lösung wurde abgeschüttet und der Membranstreifen zweimal je 1 min mit 1 ml Rinse-Lösung und einmal mit 1 ml Aqua dest. auf einem Horizontalschüttler gewaschen und wieder abgeschüttet. Nun wurde 1 ml verdünnte Substratlösung zum Membranstreifen hinzu pipettiert und lichtgeschützt ohne Schütteln 3-20 min inkubiert. Die Substratreaktion wurde durch zweimaliges kurzes Waschen mit Aqua dest. gestoppt. Auf saugfähigem Papier wurde der Streifen getrocknet, um dann mit Hilfe des dem Kit beiliegenden Auswertungsbogens die Zuordnung der Banden treffen zu können (Abb.10). Der Nachweis der Bakterien erfolgte visuell über die Farbreaktion mittels alkalischer Phosphatase. Im Test waren zusätzlich zwei Positivkontrollen für die PCR (AC) und die Hybridisierung (CC) enthalten.



**Abb.10:** Darstellung der Hybridisierungsreaktion im molekularbiologischen Nachweisverfahren parodontaler Markerkeime am Beispiel einer Patientenprobe.

Es wurden *P.g.*, *T.f.* und *T.d.* nachgewiesen. Die Nachweisgrenze für *A.a.* liegt bei  $10^3$  genome equivalents (Genomäquivalenten) und für alle anderen Markerbakterien bei  $10^4$  genome equivalents (Eick und Pfister 2002). Ein Studienproband wurde dann als Bakterien-positiv gezählt, wenn die Nachweisgrenze erreicht oder überschritten wurde (Ja/Nein-Entscheidung). Auf eine mögliche zusätzliche semiquantitative Auswertung wurde jedoch aufgrund der geringen Objektivierbarkeit verzichtet.

### 3.2.5 Statistische Auswertung

Für die Genotyp-Phänotyp-Assoziationsuntersuchungen wurde als Hypothese sowohl ein rezessives, ein dominantes, als auch ein codominantes genetisches Modell geprüft.

Für den c.-429 C>T Polymorphismus wurde beispielsweise ein T-rezessives (TT vs. CT+TT), ein T-dominantes (TT+CT vs. CC) und ein codominantes Modell (TT vs. CT vs. TT) ausgewertet. Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms SPSS® für

Windows Version 22 (IBM, New York, USA) durchgeführt. Metrische Daten wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung und mittels Levene-Test auf Varianzhomogenität geprüft. Für die Untersuchung von unabhängigen Stichproben wurde der t-Test nach Student oder einfaktorielle Anova bei Vorliegen einer Normalverteilung sowie der U-Test nach Mann-Whitney bzw. der Kruskal-Wallis-H-Test für nicht normalverteilte Variablen genutzt. Kategoriale Daten wurden in Kontingenztabellen mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson mit Yates-Korrektur analysiert. Betrug die erwartete Häufigkeit in einer Gruppe  $< 5$  wurde Fisher's Exakt-Test angewandt. Die binäre logistische Regression (schrittweise vorwärts) wurde verwendet, um den Einfluss des jeweiligen genetischen Polymorphismus auf die Entstehung einer Parodontitis und die subgingivale Besiedlung mit parodontopathogenen Bakterien unter Berücksichtigung etablierter Kofaktoren für Parodontitis oder Keimbesiedlung zu untersuchen (adjustierte Odds Ratio). Generell wurde  $p \leq 0,05$  als statistisch signifikant festgelegt. Die Berechnung der Hardy-Weinberg-Verteilung der untersuchten Genotypen erfolgte mit Hilfe des Programms Excel von Microsoft®-Office.

### **3.3 Chemikalien und Geräte**

#### genomische Untersuchung

##### a) DNA-Isolation

#### **Chemikalien**

QIAamp DNA Blood Mini Kit

Ethanol

#### **Firmen**

Qiagen, Hilden (Deutschland)

Roth, Karlsruhe (Deutschland)

##### b) Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

#### **Chemikalien**

2x Master Mix

(50 U/ml Taq Polymerase in Reaktionspuffer

pH 8,5, 400  $\mu$ M dATP, 400  $\mu$ M dGTP, 400

$\mu$ M dCTP, 400  $\mu$ M, dTTP, 3 mM  $MgCl_2$ )

#### **Firma**

Progenia, Mannheim (Deutschland)

Primer für c.-374T>A (rs 1800624), c.-429C>T (rs1800625) und 63bp Deletion (-407 bis -345)

**Chemikalien**

Forward-Primer:

5`-TCA GAG CCC CCG ATC CTA TTT-3`

Reverse-Primer:

3`-GGG GGC AGT TCT CTC CTC-5`

**Firmen**

Invitrogen, Darmstadt (Deutschland)

Invitrogen, Darmstadt (Deutschland)

Primer für G82S SNP (rs207600)

**Chemikalien**

Forward-Primer:

3`-GGC CAA GGC TGG GGT TGA AGG-5`

Reverse-Primer:

5`-GTA AGC GGG GCT CCT GTT GCA-3`

**Firmen**

Invitrogen, Darmstadt (Deutschland)

Invitrogen, Darmstadt (Deutschland)

c) Restriktionsspaltung

**Chemikalien/Enzyme**

Restriktionsendonuklease für den c.-374T>A  
SNP (rs1800624)

- Tsp509I

Restriktionsendonuklease für den G82S Poly-  
morphismus (rs207600) und den c.-429C>T  
SNP (rs1800625)

- Alu I

**Firmen**

England Biolabs, Frankfurt (Deutschland)

England Biolabs, Frankfurt (Deutschland)

d) Gelelektrophorese

**Chemikalien**

1g Sekam-Agarose

100bp-Leiter

0,5xTBE-Puffer (45 mM Tris-HCl,

45 mM, Boräure, 0,5mM EDTA, pH 8,3)

50µl Ethidiumbromid

**Firmen**

Biozym, Hessisch Oldendorf (Deutschland)

Gibco BRL, Eggenstein (Deutschland)

Roth, Karlsruhe (Deutschland)

Amersham-Pharmacia, Freiburg (Deutschland)

## subgingivale Bestimmung parodontopathogener Keime

### a) DNA-Isolation

#### **Chemikalien**

QIAamp DNA Mini Kit

#### **Firma**

Qiagen, Hilden (Deutschland)

### b) PCR

#### **Chemikalien**

micro-IDent®

(Mastermix, Puffer, biotinylierte Primer)

Taq-Polymerase

MgCl<sub>2</sub>

Aqua dest.

#### **Firmen**

HAIN Lifescience, Nehren (Deutschland)

Eppendorf, Hamburg (Deutschland)

Eppendorf, Hamburg (Deutschland)

### c) Hybridisierung

#### **Chemikalien**

micro-IDent®

Denaturierungspuffer, Hybridisierungspuffer,

Membranstreifen, Stringent Waschlösung,

Rinse-Lösung)

Aqua dest.

#### **Firma**

HAIN Lifescience, Nehren (Deutschland)

Alle aufgeführten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

#### **Geräte**

Zentrifuge Biofuge pico

Thermomixer 5436

Thermocycler Gradient (mit Heizdeckel)

Gelelektrophoresekammer

Horizontalelektrophorese Multiphor II

#### **Firmen**

Heraeus, Hanau (Deutschland)

Eppendorf, Hamburg (Deutschland)

Eppendorf, Hamburg (Deutschland)

EasyCast Peqlab, Erlangen (Deutschland)

Amersham-Pharmacia, Freiburg (Deutschland)

UV-Transilluminator	AGS, Heidelberg (Deutschland)
Blue Power Quick (Stromversorger)	Serva, Heidelberg (Deutschland)
Vortex Genie2	Bender & Hobein GmbH, Bruchsal (Deutschland)
Digitalkamera, Canon EOS 40D	Canon Deutschland GmbH, Krefeld (Deutschland)

## 4 Ergebnisse

### 4.1. Statistische Untersuchung der Studienprobanden

#### **4.1.1 Betrachtung demografischer Parameter in Abhängigkeit von der parodontalen Diagnose**

Beim Vergleich der Patientengruppe mit der parodontitisfreien Kontrollgruppe konnten hinsichtlich der Geschlechterverteilung und des Raucherstatus keine statistisch signifikanten Unterschiede gefunden werden. Die Patientengruppe mit aggressiver Parodontitis war mit einem durchschnittlichen Altersunterschied von 6 Jahren signifikant jünger im Vergleich zur Kontrollgruppe. In beiden Patientengruppen kam eine Parodontitis innerhalb der Familie signifikant häufiger vor. Mehr Parodontitispatienten als Kontrollprobanden berichteten in der Anamnese über einen frühzeitigen Zahnverlust durch Zahnlockerung unter Verwandten ersten Grades (Tab. 7).

**Tab.7:** Demografische Daten der Studienprobanden in Abhängigkeit von der parodontalen Diagnose

	<b>GAgP n=81</b>	<b>GChP n=68</b>	<b>GAgP+GChP n=149</b>	<b>K n=85</b>
<b>Altersmittelwert (Jahre) ± Standardabweichung</b>	<b>40,4 ± 9,8*</b>	48,9 ± 9,6	44,3 ± 10,6	46,7 ± 10,8
<b>Frauen (%)</b>	63,0	63,2	63,1	54,1
<b>Raucher (%)</b>	34,6	25,0	30,2	21,2
<b>familiäre Häufung (%) **</b>	<b>56,0***</b>	<b>41,9***</b>	<b>49,6***</b>	9,5

GAgP: generalisierte aggressive Parodontitis, GChP: generalisierte chronische Parodontitis, K: parodontitisfreie Kontrollgruppe

\*  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur parodontitisfreien Kontrollgruppe (Mann-Whitney-U-Test)

\*\*familiäre Häufigkeit der Parodontitis; nach anamnestischer Angabe, wenn Familienmitglied ersten Grades frühzeitigen Zahnverlust durch Zahnlockerung erlitt

\*\*\*  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur parodontitisfreien Kontrollgruppe (exakter Test nach Fisher)

#### **4.1.2 Vergleich klinisch-parodontologischer Daten unter Berücksichtigung der parodontalen Diagnose**

Bei der Beurteilung der klinischen Parameter waren der Approximale Plaque Index (API), mit Ausnahme der bei den GAgP-Patienten erhobene, die Sondierblutung (BOP), Sondiertiefe (PD) und der klinische Attachmentverlust (CAL) bei Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Der prozentuale Anteil von Zähnen mit Sondertiefen bzw. einem Attachmentverlust von 4-6mm und >6mm lag in beiden Patientengruppen bei ca. 90% und erwartungsgemäß signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Tab.8).

**Tab.8:** Klinische Daten in Abhängigkeit von der parodontalen Diagnose

	<b>GAgP</b> <b>n=81</b>	<b>GChP</b> <b>n=68</b>	<b>GAgP+GChP</b> <b>n=149</b>	<b>K</b> <b>n=85</b>
<b>API<sub>±</sub>SD (%)</b>	52,2 <sub>±</sub> 28,9	<b>61,8<sub>±</sub>25,5*</b>	<b>56,6<sub>±</sub>27,8*</b>	47,3 <sub>±</sub> 21,4
<b>BOP<sub>±</sub>SD (%)</b>	<b>78,9<sub>±</sub>22,6*</b>	<b>70,3<sub>±</sub>26,6*</b>	<b>74,9<sub>±</sub>23,9*</b>	46 <sub>±</sub> 23,9
<b>PD<sub>±</sub>SD (mm)</b>	<b>5,7<sub>±</sub>1,4*</b>	<b>5,2<sub>±</sub>1,2*</b>	<b>5,5<sub>±</sub>1,3*</b>	2,6 <sub>±</sub> 0,7
<b>CAL<sub>±</sub>SD (mm)</b>	<b>6,5<sub>±</sub>1,5*</b>	<b>6,0<sub>±</sub>1,5*</b>	<b>6,2<sub>±</sub>1,5*</b>	3,0 <sub>±</sub> 0,8
<b>PD<sub>bakt.±</sub>SD (mm)</b>	<b>7,5<sub>±</sub>1,5*</b>	<b>6,9<sub>±</sub>1,6*</b>	<b>7,2<sub>±</sub>1,6*</b>	3,1 <sub>±</sub> 0,4
<b>CAL<sub>bakt.±</sub>SD(mm)</b>	<b>8,4<sub>±</sub>1,8*</b>	<b>7,6<sub>±</sub>1,9*</b>	<b>8,1<sub>±</sub>1,9*</b>	3,3 <sub>±</sub> 0,5
<b>Anzahl fehlender Zähne<sub>±</sub>SD</b>	<b>3,7<sub>±</sub>3,9*</b>	<b>4,1<sub>±</sub>3,3*</b>	<b>3,9<sub>±</sub>3,6*</b>	2,6 <sub>±</sub> 2,8

API: approximaler Plaque Index, SD: Standardabweichung, BOP: Sondierblutung, PD: Sondier-tiefe, CAL: klinischer Attachmentverlust, <sub>bakt.</sub>: bakterielle Entnahmestelle, GAgP: generalisierte aggressive Parodontitis, GChP: generalisierte chronische Parodontitis, K: parodontitisfreie Kontrollgruppe

\*  $p \leq 0,05$ ; signifikant im Vergleich zur parodontitisfreien Kontrollgruppe (Mann-Whitney-U-Test)

#### 4.1.3 Auftreten subgingivaler Parodontopathogene in den einzelnen parodontalen Diagnosegruppen

In beiden Patientengruppen wurden bei mehr Probanden die parodontopathogenen Bakterien (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*) im Vergleich zur parodontitisfreien Kontrollgruppe nachgewiesen (Tab.9). Nur die Anzahl *A. actinomycetemcomitans* positiver CP-Patienten unterschied sich dabei nicht signifikant von der Anzahl *A. actinomycetemcomitans* positiver Kontrollprobanden.

**Tab.9:** Prozentualer Anteil von Probanden mit positivem Bakteriennachweis in Abhängigkeit von der parodontalen Diagnose.

	<b>GAgP</b> <b>n=81</b>	<b>GChP</b> <b>n=68</b>	<b>GAgP+GChP</b> <b>n=149</b>	<b>K</b> <b>n=85</b>
<b><i>A. actinomycetemcomitans</i> (%)</b>	<b>40,7*</b>	32,4	<b>36,9*</b>	18,8
<b><i>P. gingivalis</i> (%)</b>	<b>76,5*</b>	<b>86,8*</b>	<b>81,2*</b>	23,5
<b><i>P. intermedia</i> (%)</b>	<b>61,7*</b>	<b>61,8*</b>	<b>61,7*</b>	32,9
<b><i>T. forsythia</i> (%)</b>	<b>86,4*</b>	<b>97,1*</b>	<b>91,3*</b>	68,2



<i>T. denticola</i> (%)	85,2*	98,5*	91,3*	64,7
roter Komplex <i>P.g.</i> + <i>T.f.</i> + <i>T.d.</i> (%)	70,4*	82,4*	75,8*	23,5

GAgP: generalisierte aggressive Parodontitis, GChP: generalisierte chronische Parodontitis, K: parodontitisfreie Kontrollgruppe, \*:signifikant im Vergleich zur parodontitisfreien Kontrollgruppe (Chi<sup>2</sup>-Test mit Yates Korrektur oder exakter Test nach Fisher bei erwarteten Fallzahlen ≤5).

## 4.2 Parodontale Erkrankungen und Genetik

### 4.2.1 Der c.-374T>A Polymorphismus

### 4.2.2 Statistische Untersuchung zur Assoziation des c.-374T>A Polymorphismus im RAGE-Gen

Unter allen Studienteilnehmern konnte der homozygote Genotyp TT, der homozygote Genotyp AA, und der heterozygote Genotyp AT nachgewiesen werden. Für die Genotyp-Assoziationsuntersuchungen wurden ein T-rezessives (TT vs. AT+AA), ein T-dominantes (TT+AT vs. AA) und ein codominantes (TT vs. AT vs. AA) genetisches Modell geprüft. Bei der statistischen Analyse ergaben sich ausschließlich für das T-dominante Modell signifikante Unterschiede. Parodontitispatienten (GAgP und GAgP+GChP) waren signifikant häufiger Träger der Genotypen TT und AT als parodontitisfreie Kontrollen (Abb.11). Dies konnte auf Ebene der Allelverteilung bestätigt werden (Abb.12).

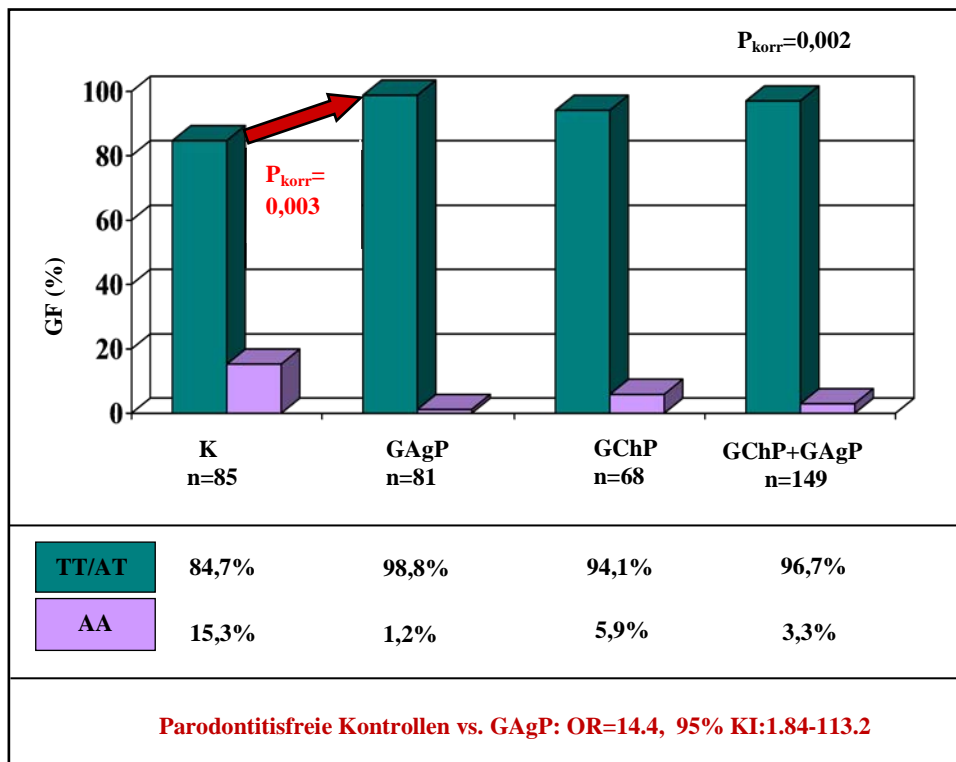
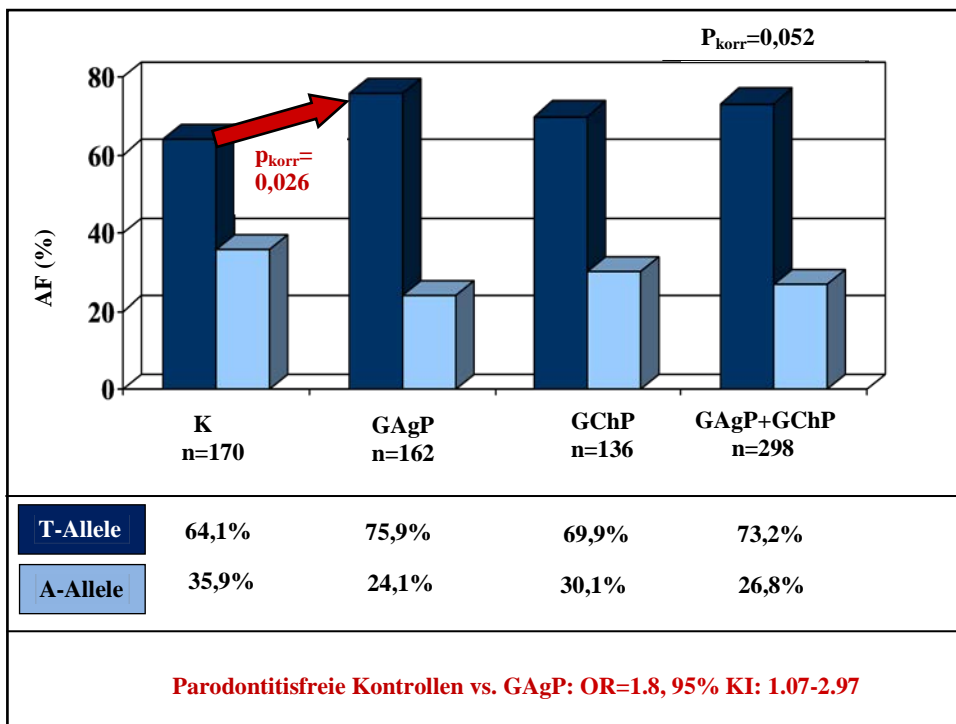


Abb.11: Genotypverteilung des c.-374T>A Polymorphismus in den einzelnen Studiengruppen



**Abb.12:** Allelverteilung des c.-374T>A Polymorphismus in den einzelnen Studiengruppen

#### 4.2.3 Binäre logistische Regression (schrittweise vorwärts): Assoziation des T-Allels des c.-374T>A Polymorphismus auf die Prävalenz von aggressiver Parodontitis

In der logistischen Regression konnte unter Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, Raucherstatus sowie API das T-Allel als unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten einer GAgP bestätigt werden (Tab.10). Weder der AA- und AT Genotyp, noch der zusammengefasste AA+AT Genotyp waren in der binären logistischen Regression zum Auftreten von aggressiven und chronischen Parodontalerkrankungen (GAgP, GChP, GAgP+GChP vs. parodontitisfreie Kontrollen) statistisch signifikant assoziiert.

**Tab.10:** Binäre logistische Regression (schrittweise vorwärts) zur Überprüfung der Assoziation des T-Allels des c.-374T>A Polymorphismus zur Prävalenz einer GAgP unter der Berücksichtigung der Kofaktoren Alter, Geschlecht, Rauchen, API

Signifikante Variable	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert	Odds Ratio	Konfidenzintervall (95 %)
<i>Variablen im Modell:</i>					
<b>Alter</b>	0,060	0,012	< 0,001	1,06	1,04 - 1,09
<b>T-Allel</b>	0,578	0,260	<b>0,026</b>	1,78	1,07 - 2,97
<i>Variablen außerhalb des Modells:</i>					
<b>API</b>			0,064		
<b>Raucher</b>			0,097		
<b>Geschlecht (♂)</b>			0,208		

### 4.3 Weitere Polymorphismen im RAGE-Gen in Assoziation zur Parodontitis

Neben dem c.-374T>A Polymorphismus wurden die RAGE-Polymorphismen c.-429C>T und G82S untersucht. Für den G82S Polymorphismus konnte kein Träger des Genotyps SS identifiziert werden, jedoch wurden Träger des GS- und GG-Genotyp ermittelt. Für den c.-429C>T Polymorphismus wurde ein T-rezessives (TT vs. CT+CC), ein T-dominantes (TT+CT vs. CC), als auch ein codominantes (TT vs. CT vs. CC) genetisches Modell analysiert. Weder die untersuchten Genotypen der Polymorphismen c.-429C>T - und G82S noch deren Allele waren zum Auftreten von aggressiven und chronischen Parodontalerkrankungen (GAgP, GChP, GAgP+GChP vs. parodontitisfreie Kontrollen) statistisch signifikant assoziiert (Tab.11).

**Tab.11:** Häufigkeiten und Signifikanzen der Genotyp- und Allelfrequenzen des c.429C>T- und G82S Polymorphismus unter Berücksichtigung der parodontalen Diagnose

	<b>GAgP</b>	<b>GChP</b>	<b>Patientengruppe GAgP+GChP</b>	<b>K</b>
<b>Genotypverteilung</b>				
	n=81	n=68	n=149	n=85
<b>c.-429C&gt;T</b>				
TT(%)	64,2	66,2	65,1	64,7
CT(%)	35,8	32,4	34,2	32,9
CC(%)	0	1,5	0,7	2,4
Signifikanz	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	
CC/CT vs.TT	35,8 vs.64,2	33,8 vs. 66,2	34,9 vs. 65,1	35,3 vs. 64,7
Signifikanz	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	
<b>G82S</b>				
GG(%)	95,1	95,6	95,3	94,1
GS(%)	4,9	4,4	4,7	5,9
Signifikanz	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	
<b>Allelverteilung</b>				
	n=162	n=136	n=298	n=170
<b>c.-429C&gt;T</b>				
C(%)	82,1	82,4	82,2	81,2
T(%)	17,9	17,6	17,8	18,8
Signifikanz	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	
<b>G82S</b>				
G(%)	97,5	97,8	97,7	56,5
S(%)	2,5	2,2	2,3	3,5
Signifikanz	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	

GAgP: generalisierte aggressive Parodontitis, GChP: generalisierte chronische Parodontitis, K: parodontitisfreie Kontrollgruppe, n.s.: nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe

## **4.4 Demographie und Genetik**

### **4.4.1 Vergleich der Genotypen und Allele des c.-374T>A, c.-429C>T und des G82S - Polymorphismus hinsichtlich der demografischen Daten (Alter, Geschlecht, Raucherstatus und familiäre Häufung von frühzeitigem Zahnverlust)**

Träger der einzelnen Genotypen der RAGE Polymorphismen c.-374T>A und c.-429C>T unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich des Alters, der Geschlechtszugehörigkeit des Raucherstatus und der familiären Häufigkeit von frühzeitigem Zahnverlust infolge Zahnlockerung. In der Gruppe der Patienten mit GAgP, in der Gesamtpatientengruppe (GAgP+GChP) sowie in der Gesamtstudiengruppe waren Träger des S Allels (S vs. G [100% vs. G 32,9%; **p=0,013**]) bzw. des GS-Genotyps des G82S Polymorphismus (GS vs. GG [100% vs. 31,2%; **p=0,012**]) signifikant häufiger Raucher.

## **4.5 Klinik und Genetik**

### **4.5.1 Vergleich klinisch-parodontologischer Daten unter Berücksichtigung der Genotypen- und Allelverteilung des c.-374T>A Polymorphismus**

Im Vergleich zu Individuen die Träger des c.-374 - AA-Genotyps waren, hatten in der Gesamtstudiengruppe Probanden die die Genotypen AT oder TT exprimierten signifikant höhere Werte für Sondierblutung (BOP), Sondiertiefe (PD und PD bakt.) und klinischen Attachmentverlust (CAL und CAL bakt.). Alle anderen klinischen Daten waren in Abhängigkeit von der Genotypverteilung nicht signifikant unterschiedlich. Bei Gegenüberstellung der Allele wiesen Träger des T-Allels signifikant höhere BOP-Werte auf als A-Allel Träger.

### **4.5.2 Vergleich klinisch-parodontologischer Daten unter Berücksichtigung der Genotyp- und Allelverteilung des c.- 429C>T Polymorphismus**

In der Gruppe der Patienten mit GChP hatten Träger des CT- oder CC-Genotyps im Unterschied zu den TT-Merkmalsträgern signifikant höhere Werte für den klinischen Attachmentverlust (TT 5,6mm vs. CT+CC 6,6mm; **p=0,015**). Patienten mit GAgP die die Genotypen CT oder CC exprimierten hatten dagegen signifikant niedrigere Werte für PD als TT-Merkmalsträger (TT 7,8mm vs. CT+CC 6,9mm; **p=0,016**) und CAL (TT 8,7mm vs. CT+CC 7,9mm; **p=0,033**). Bezogen auf die Allelfrequenzen zeigten auch hier Träger des C-Allels mit GAgP signifikant niedrigere Werte an den bakteriellen Messstellen (PD) im Vergleich zu T-Allel Trägern (C-Allel 6,9mm vs. T-Allel 7,6mm; **p=0,034**).

### **4.5.3 Vergleich klinisch-parodontologischer Daten unter Berücksichtigung der Genotypen- und Allelverteilung des G82S Polymorphismus**

In allen Patientengruppen und unter den parodontitisfreien Kontrollprobanden konnten keine Genotyp- bzw. Allel abhängigen signifikanten Unterschiede hinsichtlich der klinischen Parameter API, BOP, PD und CAL evaluiert werden.

## **4.6 Bakterien und Genetik**

### **4.6.1 Auftreten subgingivaler Bakterien unter Berücksichtigung der Genotyp- und Allelverteilung des c.-374A>T- und c.-492C>T Polymorphismus, sowie des G82S Polymorphismus**

Die Anzahl von Individuen, bei denen die parodontopathogenen Bakterien *A. a.*, *P. g.*, *P. i.*, *T. f.*, *T. d.* und Bakterien des roten Komplexes, d.h. gleichzeitiger Nachweis von *P. g.*, *T. f.* und *T. d.* nachgewiesen wurden, unterschied sich in allen Patientengruppen und in der Kontrollkohorte nicht signifikant in Abhängigkeit von der genetischen Konstellation aller untersuchten Polymorphismen (c.-374T>A, c.-429C>T, G82S).

## **4.7 Die 63 bp Deletion (delta 63)**

Homozygote DD-Träger wurden bisher noch nicht beschrieben und konnten in dieser Studie ebenfalls nicht identifiziert werden. Der heterozygote ID-Genotyp zur 63 bp Deletion wurde bei einer parodontitisfreien Probandin (Alter: 42 Jahre) und bei einer Patientin mit GAgP (Alter: 26 Jahre) nachgewiesen. Alle anderen Probanden waren Träger des homozygoten II-Genotyps. Aufgrund der Tatsache, dass kein DD-Träger und nur zwei ID-Genotypen ermittelt werden konnten, wurde hier auf eine statistische Auswertung verzichtet. (ID=Insertion-Deletion; II=Insertion-Insertion; DD=Deletion-Deletion)

## **4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse**

In der vorliegenden Studie wurden der c.-374T>A-, c.-492C>T-SNP, der G82S Polymorphismus und die 63bp Deletion hinsichtlich der Genotyp- und Allelverteilung untersucht und eine mögliche Assoziation zum Auftreten einer GChP und GAgP evaluiert.

Im T-dominanten Modell ergaben sich für den c.-374T>A-SNP signifikante Unterschiede zwischen den Patientengruppen (GAgP und GAgP+GChP) und Kontrollprobanden. Patienten mit Parodontitis waren signifikant häufiger Träger des T-Allels bzw. des TT- oder AT-Genotyps. Diese Differenz war insbesondere auf die GAgP-Gruppe zurückzuführen, da bei alleiniger Betrachtung der GChP-Gruppe keine Signifikanz auftrat.

In der logistischen Regression konnte unter Berücksichtigung von Alter, Geschlecht und Raucherstatus sowie API das T-Allel als unabhängiger Risikoindikator für das Auftreten einer GAgP bestimmt werden.

In der Gesamtstudiengruppe hatten Träger der Genotypen AT oder TT höhere klinische Daten für BOP, PD, CAL und PD und CAL an den Entnahmestellen für die mikrobiologischen Proben. Dies ist auf die bereits erwähnte Assoziation dieser Genotypen zur Parodontitis, insbesondere der GAgP, zurückzuführen.

Eine signifikante Assoziation des c.-374T>A Polymorphismus zum Nachweis parodontaler Markerbakterien konnte nicht nachgewiesen werden.

Weder die untersuchten Genotypen der Polymorphismen c.-492C>T-SNP und G82S, noch deren Allele waren statistisch signifikant zur Prävalenz schwerer generalisierter Parodontalerkrankungen (GAgP und GAgP+GChP) und dem Auftreten von parodontalen Leitkeimen assoziiert. Für die 63 bp-Deletion wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet, da nur ein ID-Genotyp und kein DD-Träger detektiert werden konnten.

## 5 Diskussion

### 5.1 Einflussfaktoren in der Pathogenese der Parodontitis

Chronisch entzündliche Erkrankungen wie PA sind durch eine komplexe Ätiologie und Pathogenese gekennzeichnet. Als primärer Faktor für Entstehung einer PA gilt die Präsenz und Aktivität der subgingivalen Bakterien im Biofilm. Allerdings führt allein die Anwesenheit parodontalpathogener Bakterien nicht zwangsläufig zu Entstehung einer PA. Neben exogenen Faktoren (wie Rauchen oder Stress), die die Entstehung entzündlicher Erkrankungen fördern, ist die individuelle Entzündungsreaktion des Wirts auf den bakteriellen Reiz für die Destruktion des parodontalen Gewebes mitentscheidend.

Die familiäre Häufung von schweren Parodontitiden, sowie der Vergleich der Konkordanz bei ein- bzw. zweieiigen Zwillingen hinsichtlich alveolären Knochenabbaus, PD, CAL und der Anzahl der von CAL betroffenen Zahnflächen, deuten ebenfalls auf eine genetische Disposition in der Ätiologie schwerer Parodontitiden hin (Michalowicz et al., 1991; Michalowicz 2000; Hodge und Michalowicz 2001).

In einer über 15 Jahre geführten Langzeitstudie („Sri-Lanka-Studie“) zeigten Løe und Mitarbeiter auf, dass eine unzureichende Mundhygiene und die daraus resultierende Gingivitis nicht in jedem Fall zu einer schweren PA führten (Løe et al., 1986).

Sie untersuchten 480 Arbeiter (Männer im Alter von 14 bis 46 Jahren) von zwei Teeplantagen in Sri Lanka. Diese Population führte keine konventionellen Mundhygienemaßnahmen durch und hatte keine Möglichkeit zu regelmäßigen zahnärztlichen Kontrollen. Alle Studienteilnehmern zeigten eine massive Plaqueakkumulation, starke Zahnstein- und Konkrementbildung sowie entzündliche Veränderungen der Gingiva. Trotz der Omnipräsenz der bakteriellen Plaque bildete sich ein typisches Verteilungsmuster parodontaler Erkrankungen heraus. Mehr als 80% der Probanden entwickelten eine moderate PA. Demgegenüber standen zwei Pole, 8% der Arbeiter entwickelten eine schnell verlaufende aggressive PA und 11% der Probanden zeigten keine PA-Symptome. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die Entstehung und der Verlauf einer PA von genetischen Faktoren beeinflusst werden kann, dass es Patienten mit hoher Parodontitissuszeptibilität gibt, aber auch Probanden die scheinbar resistent auf die mikrobielle Plaque reagieren.

Auf der Suche nach genetischen Risikoindikatoren für Parodontitis scheinen Polymorphismen in inflammatorischen Kandidatengenen, die eine Rolle in der Regulation der Immunantwort spielen (z.B. Zytokinpolymorphismen oder Polymorphismen an Immunrezeptoren) (Laine et al., 2009), eine Rolle zu spielen. Werden direkte Zusammenhänge zwischen einem Polymorphismus und dem Auftreten einer Erkrankung evaluiert, könnte dies zur Entwicklung von individualisierten Prophylaxe- und Therapiestrategien beitragen und bei der Identifikation von Risikopatienten hilfreich sein.

Durch Genpolymorphismen verursachte Veränderungen innerhalb der genomischen DNA-Sequenz können zu funktionellen Störungen auf RNA- oder Proteinebene führen, beispielsweise zu einer verminderten bzw. verstärkten Expression des entsprechenden Proteins. Bedingt durch die veränderte Verfügbarkeit des biologisch aktiven Enzyms oder Rezeptors werden möglicherweise komplexe Regulationsmechanismen in der Immunantwort beeinträchtigt und damit die Manifestation von Erkrankungen befördert.

Auch der Rezeptor für fortgeschrittene Glykierungsendprodukte übt einen wesentlichen Einfluss auf immunologische Abwehr- und Entzündungsprozesse aus (Krantz, 2010). Über die Bindung von Liganden wie AGEs oder S100/Calgranulinen kommt es zu einer RAGE-abhängigen, nachhaltigen NF- $\kappa$ B Aktivierung. Neben der Expression zahlreicher proinflammatorischer Zytokine steuert NF- $\kappa$ B den RAGE-Promotor und führt zu Hochregulation der RAGE-Expression. Dies führt zu einer steigenden Anzahl von Bindungsstellen für RAGE- und damit zu einer gesteigerten zellulären Entzündungsreaktion.

Für Polymorphismen im RAGE-Gen wurde ebenfalls nachgewiesen, dass diese mit einer veränderten RAGE-Expression assoziiert sind. Es ist deshalb zu vermuten, dass SNPs im RAGE-Gen ebenfalls eine Rolle in der Ätiologie und Pathogenese der PA spielen könnten.

In der vorliegenden Studie sollte zum einen überprüft werden, ob funktionell relevante Polymorphismen im RAGE-Gen zur Präsenz einer GAgP bzw. GChP assoziiert sind. Zum anderen sollte die Assoziation zu klinisch-parodontalen Parametern wie BOP, PD und CAL und der subgingivalen bakteriellen Besiedlung innerhalb der Studiengruppen analysiert werden.

Bei der vorliegenden Arbeit handelte es sich um eine genetische Assoziationsstudie (Fall-Kontroll-Studie). Mittels statistischer Analysen wurde untersucht, ob die Allel- oder Genotypfrequenz für die untersuchten Polymorphismen in einer Patientenpopulation signifikant größer oder kleiner im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe ist.

## **5.2 Parodontaler Befund und Klassifizierung der Probanden inklusive demografischer Parameter**

Für diese Studie wurden 81 Patienten mit GAgP und 68 Patienten mit GChP ausgewählt. Die Diagnosestellung erfolgte modifiziert nach dem neuen Klassifikationssystem der Parodontalerkrankungen (Armitage, 1999; DGParo 2002). Die Klassifikationskriterien wurden modifiziert, um anhand der verfügbaren klinischen Daten eine bessere Differenzierung zwischen GChP und GAgP treffen zu können. Für die GAgP waren ein früher Erkrankungsbeginn (vor dem 35. Lebensjahr) sowie ein Missverhältnis der Akkumulation mineralisierter Plaque zu dem Ausmaß



des Attachmentverlusts ausschlaggebend. Während bei der GChP definitiv bakterielle Auflagerungen vorlagen, die im Einklang mit dem klinischen Attachmentverlust lagen. Patienten mit GAgP berichteten häufig in der Anamnese über parodontale Abszess-Bildung, schnellen Verlauf der Erkrankung und vielfach erfolglose Therapieversuche. Da sowohl Probanden mit GAgP als auch Probanden mit GChP über eine familiäre Häufung der PA berichteten, wurde dieses Kriterium nicht zur Unterscheidung herangezogen. Es ist jedoch bekannt, dass sich beide Erkrankungen (GAgP und GChP) nicht absolut sicher voneinander unterscheiden lassen. Auch der mikrobiologische Befund ist dafür (noch) nicht geeignet. Somit sind Fehldiagnosen auch nicht sicher auszuschließen. Deshalb wurde, neben den separaten Gruppen GAgP und GChP, auch eine Gesamtparodontitisgruppe (GAgP+GChP) gebildet, welche in die statistische Auswertung einging.

In die Untersuchung wurden keine Patienten mit lokalisierter AgP (LAgP) aufgenommen, da die LAgP möglicherweise genetisch different zur GAgP ist (Armitage und Cullinan 2010).

Das Alter der Kontrollprobanden wurde auf mindestens 30 Jahre festgelegt. Damit wurde das Risiko vermindert, dass diese Probanden noch zu einem späteren Zeitpunkt eine AgP entwickeln würden. Trotzdem ist die Entstehung einer PA bei Probanden der Kontrollgruppe zu einem späteren Zeitpunkt möglich (Erkrankungspotenz). Längsschnittstudien könnten dieses Risiko ausschließen, wurden aber im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt (Timmerman und van der Weijden, 2006). Bei der Interpretation der Ergebnisse ist dies aber zu berücksichtigen.

Sowohl die Patientengruppe mit GAgP als auch mit GChP berichteten signifikant häufiger (bis zu 5fach), im Vergleich zu Probanden der Kontrollgruppe, über frühzeitigen Zahnverlust infolge Zahnlockerung bei Verwandten 1. Grades. Diese Beobachtung könnte einerseits auf den Einfluss genetischer Risikofaktoren innerhalb von Familien hinweisen, andererseits beeinflussen auch die in der Familie geteilten Verhaltensweisen hinsichtlich Ernährung, Mundhygiene und Umweltfaktoren die Ätiologie der Parodontitis (Shearer et al., 2011).

### **5.3 Klinische Daten der Probanden**

Alle klinischen Parameter für Mundhygiene, Entzündung und Attachmentverlust (API, BOP, PD und PD<sub>bakt</sub>, CAL und CAL<sub>bakt</sub>) waren in den Patientengruppen mit GAgP und GChP im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Allein der API von Patienten mit GAgP unterschied sich nicht signifikant von dem der Probanden in der Kontrollgruppe. Trotzdem zeigten Patienten mit GAgP massiven CAL. Wenngleich der modifizierte API nach Anfärben allein die supragingivale Plaqueakkumulation anzeigt, bestätigt dieses Ergebnis die Beobachtung, dass bei der GAgP ein Missverhältnis zwischen dem Ausmaß der Gewebsdestruktion und der Menge der bakterieller Auflagerung vorliegt (Armitage 1999b).

#### **5.4 Mikrobiologische Analyse der subgingivalen Plaque in den Studiengruppen**

Als primärer Faktor in der Ätiologie der Parodontitis gilt der orale Biofilm mit den darin enthaltenen parodontopathogenen Mikroorganismen. Zu den am häufigsten mit dem Auftreten von Parodontitiden assoziierten Bakterienarten zählen *A. a.*, *P. g.*, *T. d.*, *T. f.* und *P. i.* (Sokransky und Haffajee, 1994).

Die mikrobiologische Analyse aller Probanden der Patientengruppe mit GAgP und GChP zeigte eine erwartungsgemäß erhöhte bakterielle Besiedlung mit den oben genannten Markerkeimen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine Ausnahme bildet das Bakterium *A.a.*, denn es wurde nur bei Patienten mit GAgP signifikant häufiger aus dem Sulcus gingivae isoliert, nicht aber bei Patienten mit GChP im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies deutet auf eine wesentliche Beteiligung des Bakteriums in der Ätiologie der GAgP hin (Schacher et al., 2007). Trotzdem ist an dieser Stelle nochmals anzuführen, dass mit den heute zur Verfügung stehenden mikrobiologischen Testsystemen eine GAgP und GChP nicht sicher voneinander abzugrenzen sind (Mobelli et al., 2002).

Alle in dieser Studie untersuchten parodontopathogenen Markerkeime traten, wenn auch signifikant seltener, auch bei den Testpersonen der Kontrollgruppe auf. Entscheidend für die Entwicklung einer Parodontitis scheint daher vielmehr das hochspezifische Zusammenspiel zwischen den Erregern und deren tatsächlich exprimierten Virulenzfaktoren zu sein. Bei *A.a.* z. B. existieren verschiedenen Stämme des Bakteriums *A.a.*, welche unterschiedlich virulent sind. So ist *A. a.* Serotyp b beispielsweise wesentlich virulenter als Serotyp a. Weiterhin ist die Freisetzung der Virulenzfaktoren von der Gesamtkomposition des Biofilms und dem lokalen Taschenmilieu abhängig. Letztlich kann die individuelle lokale Entzündungs- und Immunantwort des Wirts, welche zu einem nennenswerten Anteil von genetischen Faktoren beeinflusst ist (Borrell und Papapanou 2005), differieren und damit Individuen für die Entwicklung einer Parodontitis prädisponieren.

#### **5.5 Biologische Plausibilität für die Untersuchung von SNPs im RAGE-Gen**

Die in dieser Studie untersuchten RAGE-Genpolymorphismen könnten von funktioneller Bedeutung in der Pathogenese der PA sein. Vor allem SNPs in der Promotorregion (c.-374T>A und c.-492C>T) führen zu Differenzen in der RAGE-Genexpression (Krantz 2010b). Die möglicherweise damit einhergehende veränderte Verfügbarkeit von immunologisch relevanten Proteinen könnte die Suszeptibilität für die Entwicklung einer PA beeinflussen.

Weiterhin ist anzuführen, dass die untersuchten Polymorphismen zu anderen Infektionserkrankungen (Sepsis und Aspergillose) und Allgemeinerkrankungen, für die eine Beziehung zur PA bekannt ist, assoziiert sind.

So wird für die rheumatoide Arthritis (RA) und Parodontitis ein Zusammenhang in der Pathogenese diskutiert. Als Bindeglied zwischen beiden Erkrankungen wird das parodontopathogene Bakterium *P. gingivalis* angesehen, das in der subgingivalen Plaque vorkommt. *P. g.* verfügt über eine eigene Peptidylarginindeiminase und kann eigene, aber auch humane Peptide citrullinieren und damit Autoimmunprozesse gegen diese Peptide generieren. Dies könnte die Entwicklung einer RA befördern (Scher und Abramson, 2013; Mikuls et al., 2014). Studien um Hofmann und Mitarbeiter haben gezeigt, dass RAGE und seine proinflammatorischen S100/Calgranulin Liganden in Gelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), welche Träger des G82S Polymorphismus sind, verstärkt akkumuliert werden. Dadurch kann es zu einer gesteigerten Immun- und Entzündungsreaktion in den betroffenen Geweben kommen (Hofmann et al., 2002).

In beiden Fällen, PA und RA, handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung, die sowohl Autoimmun- als auch entzündliche Komponenten aufweisen, und komplexen genetischen, umweltbedingten und epigenetischen Einflüssen unterliegen. Somit ist anzunehmen, dass Polymorphismen, die mit entzündlichen Gelenkerkrankungen wie RA assoziiert sind, ebenfalls indikativ für Parodontitis sind.

Polymorphismen im RAGE-Gen spielen zudem eine zentrale Rolle in der Ätiologie diabetesassoziierter Folgeerkrankungen wie Dermatosen, Retino-, Neuro- und Nephropathien. DM zählt außerdem zu den bekannten Risikofaktoren für die Entwicklung einer PA. Beide Krankheiten beeinflussen sich bidirektional, das heißt, bei einem gut eingestellten glykämischen Index ähnelt der Zustand des Parodonts dem von Nichtdiabetikern. Mit zunehmender Verschlechterung der glykämischen Einstellung nehmen Prävalenz und Schweregrad der Parodontitis zu (Tervonen et al., 1993; Lim et al., 2007). Bei vergleichbarer bakterieller Reizstärke entwickeln Individuen mit DM eine schnellere und stärkere Entzündungsreaktion als Personen ohne DM (Salvi et al., 2005). Für den unbehandelten DM Typ II ist das Risiko als Folgeerkrankung eine Parodontitis zu entwickeln, um das Dreifache erhöht (Emrich et al., 1991).

Lalla et al., (2006) haben in einer Kohortenstudie Patienten mit vergleichbarem Schweregrad der PA mit bzw. ohne DM Typ I untersucht. Sie konnten zeigen, dass die Immunantwort des Wirts für den unterschiedlichen Entzündungsgrad der PA bei Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern verantwortlich ist (Lalla et al., 2006).

In einer bislang einzigen Studie von Holla und Mitarbeitern wurde der Zusammenhang von Polymorphismen im RAGE-Gen [1704 G/T-SNP (rs184003) und G82S] zum Auftreten von PA bei kaukasischen Patienten mit ChP untersucht (Holla et al., 2001). Dabei war der 1704 G/T-SNP mit einer erhöhten Empfindlichkeit für die Entwicklung einer ChP, unabhängig davon ob ein DM vorlag oder nicht, assoziiert. Der 1704 G/T-SNP (rs184003) ist im Intron des RAGE-Gens lokalisiert, seine funktionelle Bedeutung ist bisher unbekannt.

Weitere Assoziationen bestehen zwischen RAGE-Genpolymorphismen und der Entwicklung von Karzinomen wie dem kolorektalen Karzinom (Quian et al., 2014) und dem Pankreaskarzinom (Krechler et al., 2010).

In der vorliegenden Assoziationsstudie wurde nicht nur der parodontale Status, sondern auch die mikrobiologische Analyse der subgingivalen Plaque berücksichtigt. Dies ist ein Vorteil im Vergleich zu anderen Assoziationsstudien, da auch die Kolonisation von parodontopathogenen Bakterien genetischen Einflüssen unterliegen kann (Nibali et al., 2009).

In der statistischen Auswertung wurden neben bivariaten Vergleichen multivariate Analysen durchgeführt. Durch die Berücksichtigung etablierter, die PA beeinflussender Faktoren (Alter, Geschlecht, Raucherstatus, subgingivale Keimbesiedlung) konnten adjustierte Odds Ratios generiert werden.

### **5.6 Auswertung des c.-374 T>A - und c.-429 C>T Polymorphismus**

Eine mögliche Assoziation der c.-374 T>A- und c.-429 C>T-SNPs im RAGE-Gen zur PA wurde in dieser Studie erstmalig untersucht. Im Ergebnis dieser Arbeit konnten Übereinstimmungen zu anderen Assoziationsstudien ermittelt werden (Tab.12), in denen sich das T-Allel des c.-374T>A-SNP ebenfalls als Risikoindikator bewiesen hat. Für den c.-374 T>A Polymorphismus konnte in der vorliegenden Studie eine signifikante Assoziation des AT und TT-Genotyps bzw. des T-Allels zum Auftreten von GAgP evaluiert werden. Bei Patienten mit GChP ergaben sich tendenziell ähnliche Resultate, die jedoch nicht signifikant waren. Unter der Annahme, dass die untersuchten Polymorphismen generell für schwere Formen der Parodontitis von Bedeutung sein könnten, wurden beide Patientengruppen (GAgP+GChP) zusammengeschlossen. In dieser Gruppe wurden signifikant häufiger Träger des AT- bzw. TT-Genotyps identifiziert ( $p_{\text{kor}}=0,002$ , OR=5,2, KI=1,78-15,15). Dies ist wahrscheinlich im Wesentlichen auf den Einfluss der Genotypverteilung in der GAgP-Gruppe zurückzuführen. Auf Ebene der Allelverteilung konnten diese Ergebnisse bestätigt werden, wobei das T-Allel als unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung einer GAgP, nach Einbeziehung etablierter Kofaktoren für PA, identifiziert werden konnte.

Der c.-429C>T Polymorphismus im RAGE-Gen war hingegen nicht signifikant zum Auftreten von GAgP und GChP assoziiert. Die Assoziation des SNP zu den klinischen Parametern (CAL, PD<sub>bakt</sub>, CAL<sub>bakt</sub>) weist auf die komplexe Ätiologie der PA hin.

Beide SNPs (c.-374T>A -und c.-429C>T) sind von Hudson und Mitarbeitern erstmals im Jahre 2001 beschrieben worden. In dieser Studie wurde bei DM Typ II-Patienten die gewebespezifische Transkriptionsaktivität der Promotorpolymorphismen mit Hilfe des Reporters Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) gemessen. Sowohl für den c.-374T>A -und c.-429C>T-

SNP, als auch für die 63bp-Deletion ergab sich eine erhöhte CAT-Expression (Hudson et al., 2001). Die Ergebnisse einer Studie von Petrovic und Mitarbeitern 2003 wiesen dagegen keine Assoziation der Polymorphismen zum Auftreten von diabetischer- und proliferativer Retinopathie bei Probanden mit DM Typ II nach (Petrovic et al., 2003).

Als protektiver Faktor für die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen bei Kaukasiern (infolge eines DM Typ II), wurde vor allem der AA-Genotyp des c.-374T>A-SNP identifiziert (Picheth et al., 2007). Bei Probanden mit normalen Glukosemetabolismus kann das A-Allel des c.-374T>A-SNP einen protektiven Einfluss auf den arteriellen Blutdruck und die Elastizität der arteriellen Gefäße ausüben (Engelen et al., 2010).

Das c.-429 C-Allel begünstigt bei Patienten mit Zystischer Fibrose das Auftreten einer reduzierten Lungenfunktion (Beucher et al., 2012).

Die Deletion von 63 Basenpaaren (-407 bis -345) beugt marginal dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen bei chinesischen DM Typ II Patienten mit Nephropathie vor (Poon et al., 2010).

**Tab.12:** Assoziation der c.-374T>A - und c.-429C>T - Polymorphismen und der 63 bp Deletion im RAGE-Gen zu chronisch entzündlichen- und Infektionserkrankungen

<b>Autor und Jahr</b>	<b>Assoziation</b>	<b>Anzahl der Studienteilnehmer</b>	<b>Population</b>
Hudson et al., 2001	c.-374 T>A (A-Allel) + c.-429 C>T (C-Allel)  Assoziation zu Retinopathie (DRP) bei DM Typ II	106 mit DM Typ II und DRP 109 mit DM Typ II ohne DRP 113 Gesunde Kontrollen	Engländer
Globocnik et al., 2003	c.-374 T>A + c.-429 C>T  Genotypen nicht zu DRP und proliferativer RP (PRP) bei DM Typ II	116 mit DM Typ II und DRP gegen 70 mit DM Typ II ohne DRP  76 mit DM Typ II und PRA gegen 70 mit DM Typ II ohne PRP	Kaukasier
Kirbis et al., 2004	c.-374 T>A + c.-429 C>T  Genotypen nicht zum Auftreten von Koronaren Herzerkrankungen (CAD) bei DM Typ II assoziiert	168 CAD-Patienten mit DM Typ II  241 CAD-Patienten ohne DM Typ II	Kaukasier/ Slowenier
Picheth et al., 2007	c.-374 T>A ( AA-Genotyp)  Positiv Protektiv für kardiovaskuläre Läsionen bei DM Typ II	98 CAD-Patienten mit DM Typ II  148 CAD-Patienten ohne DM Typ II	Euro- Brasilianer

Santos et al., 2010	c.-374 T>A + c.-429 C>T  Allele nicht zum Auftreten einer Gestationsdiabetes (GD) assoziiert	600 ohne GD  150 mit GD	Euro-Brasilianer
Engelen et al., 2010	c.-374 T>A (A-Allel)  Protektiv assoziiert mit Blutdruck und arterieller Steifheit bei normalen Glucosemetabolismus (GM)	1291 Patienten  44% GM normal 23% GM beeinträchtigt 33% DM Typ II	Holländer
Däbritz et al., 2011	c.-374 T>A (A-Allel)  Protektiv assoziiert bei Entstehung von Morbus Crohn (CD)	421 CD Patienten gegen 549 Gesunde Kontrollen	Deutsche
		317 CD Patienten 218 Gesunde Kontrollen	Amerikaner
Wang et al., 2014	c.-374 T>A + c.-429 C>T  A-Allel ist protektiv zu Morbus Crohn (CD) assoziiert	312 CD Patienten 479 Gesunde Kontrollen	Chinesen
Beucher et al., 2012	c.-429 C>T  C-Allel mit reduzierter Lungenfunktion bei Patienten mit Zystischer Fibrose (ZF) assoziiert	967 ZF Patienten	Kaukasier / Franzosen
Zeng et al., 2012	c.-429 C>T (TT Genotyp)  Positiv zu Sepsis und Multiorganversagen bei Polytrauma	728 Patienten mit Polytrauma	Asiaten/ Chinesen

DM: Diabetes mellitus DRP: diabetische Retinopathie PRP: proliferative Retinopathie  
CAD: koronare Herzerkrankungen CD: Morbus Crohn ZF: Zystische Fibrose

### **5.7 Auswertung des G82S Polymorphismus**

In der vorliegenden Studie wurde keine Assoziation des G82S Polymorphismus zum Auftreten von GAgP und GChP gefunden. Diese Resultate stimmen mit Ergebnissen einer Studie an kaukasischen GChP-Patienten um Holla und Mitarbeiter (Holla et al., 2001) überein (Tab.13).

Im Gegensatz dazu zeigten andere Arbeitsgruppen einen Zusammenhang des G82S Polymorphismus zu weiteren chronisch entzündlichen Erkrankungen (Tab.13).

Die Forschergruppe um Hofmann berichtete 2002 über eine gesteigerte Entzündungs- und Immunantwort in Verbindung mit dem G82S Polymorphismus bei rheumatischer Arthritis im murinen Modell (Hofmann et al., 2002). In einer darauffolgende Studie von Steenvoorden und Mitarbeitern konnte diese Assoziation nicht bestätigt werden (Steenvoorden et al., 2006). Aller-

dings wiesen Caroll et al. ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse unter kaukasische Patienten mit RA nach (Caroll et al., 2007). Auch korrelierte der SS-Genotyp des G82S Polymorphismus mit der Entwicklung einer diabetischen Retinopathie und dem sRAGE-Level im Serum von DM Typ II- Patienten (Nakamura et al., 2007; Yang et al., 2013).

**Tab.13:** Assoziation des G82S Polymorphismus im RAGE-Gen zu chronisch entzündlichen Erkrankungen

<b>Autor und Jahr</b>	<b>Assoziation</b>	<b>Anzahl der Studienteilnehmer</b>	<b>Population</b>
Holla et al., 2001	Allele und Genotypen sind nicht zum Auftreten von GChP assoziiert	101 Patienten mit GChP 162 Patienten ohne PA	Kaukasier
Steenvoorden et al., 2006	Allele sind nicht zum Auftreten RA assoziiert	377 Patienten mit RA 535 Patienten ohne RA	Holländer
Caroll et al., 2007	S-Allel  Assoziiert mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse im Rahmen einer RA	232 Patienten mit RA	Amerikaner (94% Kaukasier)
Yoshioka et al., 2005	S-Allel  nicht zum Auftreten von DM Typ II assoziiert	268 DM Typ II 98 Kontrollen	Japaner
Zhang et al., 2009	S-Allel  Assoziiert mit DRP bei DM Typ II	340 DM Typ II ohne DRP 166 DM Typ II mit DRP 182 normaler GM	Chinesen
Yang et al., 2013	SS-Genotyp  mit DRP bei DM Typ II und einem erhöhten sRAGE-Level assoziiert	1040 DM Typ II 374 DM Typ II mit DRP 668 DM Typ II ohne DRP	Chinesen
Li et al., 2014	S-Allel  Risikofaktor für das Auftreten einer Chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD)	216 mit COPD 239 Gesunde Kontrollen	Asiaten/Chinesen

RA: rheumatoide Arthritis DM: Diabetes mellitus DRP: diabetische Retinopathie GM: Glukosemetabolismus COPD: Chronisch obstruktiven Lungenerkrankung

## **5.8 Schlussfolgerung, Limitation und Ausblick**

Im Ergebnis der vorliegenden Studie konnte in der gesamten Studiengruppe für die Mutations-träger der 63bp Deletion (63 delta), des c.-429C>T Polymorphismus und des G82S Poly-morphismus im RAGE-Gen keine Assoziation zur Parodontitis bzw. zur Präsenz parodontalpa-thogener Leitkeime nachgewiesen werden. Diese drei untersuchten Polymorphismen im RAGE-Gen sind somit weder indikativ für Parodontitis noch für eine Besiedlung mit parodontalen Leitkeimen.

Für den c.-374T>A Polymorphismus konnte dagegen gezeigt werden, dass Träger des T-Allels, unter Berücksichtigung weiterer parodontaler Risikofaktoren, ein erhöhtes Risiko (2fach) für die Ausprägung einer generalisierten GAgP besitzen. Eine mögliche Ursache dafür könnte eine be-einträchtigte Immunantwort, möglicherweise zurückführbar auf eine T-Allel-assoziierte verrin-gerte Promotoraktivität und damit veränderte Verfügbarkeit immunologisch relevanter Proteine, sein. Der c.-374T>A-SNP zeigte keine Assoziation zur subgingivaler Keimbesiedlung. Obwohl in den einzelnen Diagnosegruppen für den API keine signifikanten Werte ermittelt wurden, hatten Träger der AT/TT Genotypen erhöhte Werte für BOP, PD, PD<sub>bakt</sub>, CAL und CAL<sub>bakt</sub>, was auf eine gesteigerte Entzündungsbereitschaft in der Gesamtstudienkohorte hinweist .

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das T-Allel im c.-374T>A SNP des RAGE-Gen einen Einfluss auf die Ausprägung einer GAgP bei Kaukasiern hat. Diese Studie kann die Beteiligung von genetischen Varianten in inflammatorischen Kandidatengen an der Ätiologie der GAgP bestätigen.

Die Aussagekraft genetischer Assoziationsstudien kann durch mehrere Faktoren beeinträchtigt sein. Dies sind vor allem die Größe der Test- und Kontrollgruppe, die Definition von „er-krankt“ und „nicht erkrankt“, die Erkrankungspotenz der als gesund eingestuftten Probanden sowie die ethnische Zugehörigkeit der Kohorten. Beim Vergleich der bei Probanden aus Mittel-deutschland gewonnenen Ergebnisse mit Resultaten aus anderen Studien ist zu berücksichtigen, dass die Prävalenz von SNPs genetischen Einflüssen unterliegt. Eine Extrapolation der Ergeb-nisse auf andere Kohorten ist nur mit Einschränkungen möglich.

Bisher gibt es nur eine Assoziationsstudie von Holla und Mitarbeitern zum G82S Polymorphi-smus im RAGE-Gen bei Patienten mit ChP (Holla et al., 2001), so dass sich die vorliegende Stu-die nicht an bekannten Fallzahlgrößen orientieren konnte. Deshalb ist nicht auszuschließen, dass nicht signifikante Resultate in größeren Studiengruppen Signifikanz erlangen könnten (Schäfer et al., 2014). Es ist sinnvoll, die vorliegenden Ergebnisse durch weitere Studien mit einem grö-ßeren Probandengut zu bestätigen. Dies ist nur durch Multizenterstudien zu leisten. In genom-weiten Assoziationsstudien sollte die Bedeutung von weiteren Genpolymorphismen in der Pa-thogenese einer Parodontitis untersucht werden.



## **6 Zusammenfassung**

Als primär ätiologischer Faktor der PA gilt das Vorhandensein der mikrobiellen Plaque. Wie bei den meisten multifaktoriellen Erkrankungen beeinflusst die individuelle Immunantwort die Pathogenese der PA. Diese wird unter anderen durch die Beteiligung verschiedener Gene, Gen-Gen-Interaktionen und dem Einfluss von Umweltfaktoren auf die Gene, moduliert.

Bei der individuellen Regulation der Genexpression vieler Proteine spielen SNPs in der Promotorregion der Gene eine wichtige Rolle. Für das RAGE-Gen wurden mehrere funktionell wichtige SNPs beschrieben (unter anderem der c.-374T>A-SNP und c.-492C>T-SNP). Diese Polymorphismen beeinflussen die Transkriptionsrate oder ändern die Proteinsequenz und gehen mit einer erhöhten RAGE-Genexpression einher.

RAGE-Liganden wie AGEs oder S100/Calgranuline stimulieren in verschiedenen Geweben die RAGE-Expression über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und begünstigen, durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-6, eine gesteigerte und lang andauernde Entzündungsreaktion.

Dieser Hintergrund lässt vermuten, dass genetische Polymorphismen im Promoter des RAGE-Gens indikativ für PA bzw. die Zusammensetzung des subgingivalen Biofilms sein könnten.

Ein Ziel dieser Studie bestand darin mögliche Assoziationen des c.-374T>A- (rs1800624) und c.-492C>T-SNPs (rs1800625), des G82S-SNPs (rs2070600) und der 63bp-Deletion im RAGE-Gen zur PA zu evaluieren. Des Weiteren sollten mögliche Assoziationen zum Nachweis parodontalpathogener Leitbakterien gefunden werden.

Für die vorliegende Studie wurden 234 untereinander nicht verwandte Kaukasier deutscher Herkunft untersucht. Das Studienkollektiv setzte sich aus 149 Probanden, davon 81 an GAgP und 68 an GChP erkrankten Patienten, zusammen. Ihnen wurde eine parodontitisfreie Kontrollgruppe von 85 Studienteilnehmern gegenübergestellt. Die Diagnosestellung erfolgte modifiziert nach dem aktuellen Klassifikationssystem für Parodontalerkrankungen (DGParo 2002).

Die genomische Untersuchung erfolgte nach Entnahme venösen Blutes und DNA-Präparation. Mittels RFLP wurde die Genotypisierung der SNPs c.-374T>A, c.-429C>T und G82S durchgeführt.

Die 63bp-Deletion konnte ohne Restriktionsspaltung über den Nachweis unterschiedlich langer PCR-Fragmente detektiert werden.

Die Bestimmung der parodontalpathogenen Leitkeime *A. a.*, *P. g.*, *T. d.*, *T. f.* und *P. i.* erfolgte über einen kommerziell erhältlichen mikrobiologischen Test (micro-IDent<sup>®</sup> Test, HAIN Lifescience, Nehren, Deutschland).

Für den c.-374T>A Polymorphismus im RAGE-Gen konnte unter Annahme eines T-dominanten genetischen Modells bei bivariater Analyse eine signifikante Assoziation des AT- und TT-Genotyps bzw. des T-Allels zur aggressiven Parodontitis evaluiert werden. In der mul-

tivariaten Analyse wurde das T-Allel als unabhängiger Risikofaktor bestätigt. Ursache für diese gezeigten Assoziationen könnte eine veränderte Immunabwehr, zurückführbar auf eine T-Allel-assoziierte verringerte Promotoraktivität sein. Das Ergebnis lässt vermuten, dass das T-Allel des RAGE-Genpolymorphismus unter Kaukasiern deutschen Ursprungs einen Risikoindikator für aggressive Parodontitis darstellt. In der Gesamtstudiengruppe des c.-374T>A-SNPs wurden zudem für Träger der AT/TT Genotypen erhöhte BOP-, PD-, PD<sub>bakt</sub>-, CAL- und CAL<sub>bakt</sub>-Werte ermittelt. Dies könnte auf eine generell erhöhte Entzündungsbereitschaft bei Trägern dieser Genotypen hindeuten. Eine Assoziation zu parodontalen Leitkeimen konnte dagegen nicht gezeigt werden.

Für den c.-429C>T -und G82S Polymorphismus konnte keine Assoziation zum Auftreten von GAgP und GChP sowie zum Auftreten von parodontalen Leitkeimen ermittelt werden.

Zur weiteren Aufklärung der Ätiologie parodontaler Erkrankungen sollte in genomweiten Assoziationsstudien nach weiteren parodontalen Kandidatengenomen geforscht werden, deren Bedeutung in funktionellen Analysen bestätigt werden sollte.

## 7 Literaturverzeichnis

Alexiou P, Chatzopoulou M, Pegklidou K, Demopoulos VJ (2010) RAGE: a multi-ligand receptor unveiling novel insights in health and disease. *Curr Med Chem.* 17(21):2232-52.

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

Arun KV, Talwar A, Kumar TS (2011) T-helper cells in the etiopathogenesis of periodontal disease: A mini review. *J Indian Soc Periodontol* 15(1):4-10.

Barlovic DP, Soro-Paavonen A, Jandeleit-Dahm KA (2011) RAGE biology, atherosclerosis and diabetes. *Clin Sci (Lond).* 121(2):43-55.

Beucher J, Boëlle PY, Busson PF, Muselet-Charlier C, Clement A, Corvol H; French C F Modifier Gene Study Investigators (2012) AGER -429T/C is associated with an increased lung disease severity in cystic fibrosis. *PLoS One* 7(7):e41913.

Bianchi ME, Agresti A (2005) HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 15(5): 496–506.

Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Klötting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt AM, Stern DM, Häring HU, Schleicher E, Nawroth PP (2001) Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* 50 (12): 2792–808.

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. *J Mol Med* 83: 876–886.

Borrell LN, Papapanou PN (2005) Analytical epidemiology of periodontitis. *J Clin Periodontol* 32 Suppl 6:132-58.

Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, Lu Y, Lalla E, Rong LL, Goova MT, Moser B, Kislinger T, Lee DC, Kashyap Y, Stern DM, Schmidt AM (2002) RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 26;106(22):2827-35.

Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 2004 47:1115–1123, DOI 10.1007/s00103-004-0931-3 Genetische Polymorphismen (Sequenzvariationen) von Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen und ihre Bedeutung in der Umweltmedizin Mitteilung der Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“<sup>©</sup> Springer Medizin Verlag 2004 Empfehlung des Robert Koch-Instituts, S.1-9.

Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE (2014) Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000 64(1):57-80.

Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S, Lee A, Al-Abed Y, Vlassara H, Bucala R, Cerami A (1997) Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(25):13915-20.

Cochran DL (2008) Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol* 279(8 Suppl):1569-76. doi: 10.1902/jop.2008.080233.

Däbritz J, Friedrichs F, Weinlage T, Hampe J, Kucharzik T, Lügering A, Broeckel U, Schreiber S, Spieker T, Stoll M, Foell D (2011) The functional -374T/A polymorphism of the receptor for advanced glycation end products may modulate Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300(5):G823-32.

Darveau RP, Tanner A, Page RC (1997) The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol* 2000 14:12-32.

Dunn JA, Patrick JS, Thorpe SR, Baynes JW (1989) Oxidation of glycated proteins: age dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine in lens proteins. *Biochemistry* 28(24):9464-8.

Eick S, Pfister W (2002) Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 29(7):638-44.

Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. (1991) Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 62(2):123-31.

Engelen L, Ferreira I, Gaens KH, Henry RM, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, 't Hart LM, van Greevenbroek MM, van der Kallen CJ, Blaak EE, Feskens EJ, Ten Cate H, Stehouwer CD, Schalkwijk CG (2010) The association between the -374T/A polymorphism of the receptor for advanced glycation endproducts gene and blood pressure and arterial stiffness is modified by glucose metabolism status: the Hoorn and CoDAM studies. *J Hypertens* 28(2):285-93.

Entrez Gene (2008) S100B S100 calcium binding protein B.

Ford PJ, Gamonal J, Seymour GJ (2010) Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000 53:111-23.

Gaffen SL, Hajishengallis G (2008) A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *J Dent Res* 87(9):817-28.

Genco RJ, Ho AW, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA (1999) Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J Periodontol* 70(7):711-23.

Genco RJ, Borgnakke WS (2013) Risk factors for periodontal disease. *Periodontol* 2000 62(1):59-94.

Globocnik Petrovic M, Steblovnik K, Peterlin B, Petrovic D (2003) The -429 T/C and -374 T/A gene polymorphisms of the receptor of advanced glycation end products gene are not risk factors for diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes. *Klin Monbl Augenheilkd* 220(12):873-6.

Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA (2006) Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 114(6):597-605.

Goova MT, Li J, Kislinger T, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, Nowygrod S, Wolf BM, Caliste X, Yan SF, Stern DM, Schmidt AM (2001) Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. *Am J Pathol* 159: 513-525.

Graswinckel JE, van der Velden U, van Winkelhoff AJ, Hoek FJ, Loos BG (2004) Plasma antibody levels in periodontitis patients and controls. *J Clin Periodontol* 31(7):562-8.

Gu H, Yang L, Sun Q, Zhou B, Tang N, Cong R, Zeng Y, Wang B (2008) Gly82Ser polymorphism of the receptor for advanced glycation end products is associated with an increased risk of gastric cancer in a Chinese population. *Clin Cancer Res* 14(11):3627-32.

Hajishengallis G (2010) Complement and periodontitis. *Biochem Pharmacol* 80(12):1992-2001.

Han SH, Kim YH, Mook-Jung I (2011) RAGE: the beneficial and deleterious effects by diverse mechanisms of actions. *Mol Cells* 31(2):91-7.

Hannig C., Hannig M. (2009) The oral cavity—a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig* 13: 123–139.

Hart TC, Kornman KS (1997) Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000 14:202-15.

Hart, T.C., Shapira, L., Van Dyke, T.E (1994) Neutrophil defects as a risk factor for periodontal disease. *J Periodontol* 65; 521-529.

Henderson B, Poole S, Wilson M (1996) Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol Rev* 60(2): 316–341.

Henderson B, Wilson M, Sharp L, Ward JM (2002) *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Med Microbiol* 51(12):1013-20.

Hodge P, Michalowicz B (2001) Genetic predisposition to periodontitis in children and young adults. *Periodontol* 2000 26:113-34.

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(7):889-901.

Hofmann MA, Drury S, Hudson BI, Gleason MR, Qu W, Lu Y, Lalla E, Chitnis S, Monteiro J, Stickland MH, Bucciarelli LG, Moser B, Moxley G, Itescu S, Grant PJ, Gregersen PK, Stern DM, Schmidt AM (2002) RAGE and arthritis: the G82S polymorphism amplifies the inflammatory response. *Genes Immun* 3(3):123-35.

Hollá LI, Kanková K, Fassmann A, Bucková D, Halabala T, Znojil V, Vaněk J (2001) Distribution of the receptor for advanced glycation end products gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis: a preliminary study. *J Periodontol* 72(12):1742-6.

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 (6): 1505–11.

Hudson BI, Hofmann MA, Bucciarelli L, Wendt T, Moser B, Lu Y, Qu W, Stern DM, D'Agati V, Du Yan S, Yan SF, Grant PJ, Schmidt AM (2002) Glycation and diabetes: the RAGE connection. *Current Science* 25; 83(12): 1515-1521.

Hudson BI, Bucciarelli LG, Wendt T, Sakaguchi T, Lalla E, Qu W, Lu Y, Lee L, Stern DM, Naka Y, Ramasamy R, Yan SD, Yan SF, D'Agati V, Schmidt AM (2003) Blockade of receptor for advanced glycation endproducts: a new target for therapeutic intervention in diabetic complications and inflammatory disorders. *Arch Biochem Biophys* 419: 80-88.

Hudson BI, Carter AM, Harja E, Kalea AZ, Arriero M, Yang H, Grant PJ, Schmidt AM (2008) Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J* 22(5):1572-80.

Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE (2006) Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care* 29(6):1420-32.

Jepsen S, Kerschull M, Deschner J (2011) Relationship between periodontitis and systemic diseases. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 54(9):1089-96.

Kalea, AZ, Schmidt AM, Hudson BI (2011) Alternative splicing of RAGE: roles in biology and disease. *Frontiers in Bioscience* 16, 2756-2770.

Kerschull M, Guarnieri P, Demmer RT, Boulesteix AL, Pavlidis P, Papapanou PN (2013) Molecular differences between chronic and aggressive periodontitis. *J Dent Res* 92(12):1081-8.

Kerschull M, Demmer RT, Grün B, Guarnieri P, Pavlidis P, Papapanou PN (2014) Gingival tissue transcriptomes identify distinct periodontitis phenotypes. *J Dent Res* 93(5):459-68.

Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JM, Schuren FH, Montijn RC, ten Cate JM, Crielaard W (2008) Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res* 87:1016-1020.

Kikkert R, Bulder I, de Groot ER, Aarden LA, Finkelman MA (2007) Potentiation of Toll-like receptor-induced cytokine production by (1->3)-beta-D-glucans: implications for the monocyte activation test. *J Endotoxin Res* 13(3):140-9.

Kim OY, Jo SH, Jang Y, Chae JS, Kim JY, Hyun YJ, Lee JH (2009) G allele at RAGE SNP82 is associated with proinflammatory markers in obese subjects. *Nutr Res* 29(2):106-13.

Kirbis J, Milutinović A, Steblovník K, Teran N, Terzić 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. *Coll Antropol* 28(2):611-6.

Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiar TR, Tsung A (2008) HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol Med* 14 (7-8): 476–84.

Kolenbrander PE, London J (1993) Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 175(11):3247-52.

Kolenbrander, PE (2000) Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetics systems. *Annual Review of Microbiology* 54: 413–437.

Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TG Jr, Higginbottom FL, Duff GW (1997) The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 24(1):72-7.

Krantz, Sven (2010) Janusgesicht Glucose. *Tretition* S.153, 171.

Krechler T, Jáchymová M, Mestek O, Zák A, Zima T, Kalousová M (2010) Soluble receptor for advanced glycation end-products (sRAGE) and polymorphisms of RAGE and glyoxalase I genes in patients with pancreatic cancer. *Clin Biochem* 43(10-11):882-6.

Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Schmidt AM (1998) A murine model of accelerated periodontal disease in diabetes. *J Periodontol* 69: 387-399.



- Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Spessot A, Qu W, Kislinger T, Lu Y, Stern DM, Schmidt AM (2000) Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest* 105: 1117–1124.
- Li J, Schmidt AM (1997) Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 272(26):16498-506.
- Li K, Dai D, Zhao B, Yao L, Yao S, Wang B, Yang Z (2010) Association between the RAGE G82S polymorphism and Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 117(1):97-104.
- Li Y, Yang C, Ma G, Gu X, Chen M, Chen Y, Zhao B, Cui L, Li K (2014) Association of polymorphisms of the receptor for advanced glycation end products gene with COPD in the Chinese population. *DNA Cell Biol* 33(4):251-8.
- Lim LP, Tay FB, Sum CF, Thai AC(2007) Relationship between markers of metabolic control and inflammation on severity of periodontal disease in patients with diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 2007 Feb; 34(2):118-23.
- Löe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E (1986) Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol* 13(5):431-45.
- Logsdon CD, Fuentes MK, Huang EH, Arumugam T (2007) RAGE and RAGE ligands in cancer. *Curr Mol Med* 7(8):777-89.
- Lue LF, Walker DG, Jacobsen S, Sabbagh M (2009) Receptor for Advanced Glycation End-products: Its Role in Alzheimer's Disease and Other Neurological Diseases. *Disclosures Future Neurology* 4(2):167-177.
- 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 Res Mol Brain Res* 71(2):159-70.
- Marazita ML, Burmeister JA, Gunsolley JC, Koertge TE, Lake K, Schenkein HA (1994) Evidence for autosomal dominant inheritance and race-specific heterogeneity in early-onset periodontitis. *J Periodontol* 65(6):623-30.

Marsh P, Martin MV (2003) *Orale Mikrobiologie*, S.79.

Marsh PD (2005) Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol* 32 Suppl 6:7-15.

Martínez-Maestre MÁ, González-Cejudo C, Machuca G, Torrejón R, Castelo-Branco C (2010) Periodontitis and osteoporosis: a systematic review. *Climacteric* 13(6):523-9.

Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(12):4245-9.

Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T (2003) Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 171(6):3154-62.

Mayeux R, Honig LS, Tang MX, Manly J, Stern Y, Schupf N, Mehta PD (2003) Plasma A[ $\beta$ ]40 and A[ $\beta$ ]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. *Neurology* 61(9):1185-90.

McCance DR, Dyer DG, Dunn JA, Bailie KE, Thorpe SR, Baynes JW, Lyons TJ (1993) Methylglyoxal reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* (6):2470-8.

Michalowicz BS, Aeppli DP, Kuba RK, Bereuter JE, Conry JP, Segal NL, Bouchard TJ Jr, Pihlstrom BL (1991) A twin study of genetic variation in proportional radiographic alveolar bone height. *J Dent Res* 70(11):1431-5.

Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, Califano JV, Burmeister JA, Schenkein HA (2000) Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol* 71(11):1699-707.

Miksits K, Grossgebauer K, Hahn H (1992) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer Verlag Berlin.

Mikuls TR, Payne JB, Yu F, Thiele GM, Reynolds RJ, Cannon GW, Markt J, McGowan D, Kerr GS, Redman RS, Reimold A, Griffiths G, Beatty M, Gonzalez SM, Bergman DA, Hamil-

ton BC 3rd, Erickson AR, Sokolove J, Robinson WH, Walker C, Chandad F, O'Dell JR (2014) Periodontitis and Porphyromonas gingivalis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 66(5):1090-100.

Miyasaki KT (1991) The neutrophil: Mechanisms of controlling periodontal bacteria. *J Periodontol* 62; 761-774.

Mombelli A, Casagni F, Madianos PN (2002) Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol* 3:10-21; discussion 37-8.

Monnier VM, Glomb M, Elgawish A, Sell DR (1996) The mechanism of collagen cross-linking in diabetes: a puzzle nearing resolution. *Diabetes* 45 Suppl 3:S67-72.

Mott JD, Khalifah RG, Nagase H, Shield CF 3rd, Hudson JK, Hudson BG (1997) Nonenzymatic glycation of type IV collagen and matrix metalloproteinase susceptibility. *Kidney Int* 52: 1302-1312.

Nah SS, Choi IY, Yoo B, Kim YG, Moon HB, Lee CK (2007) Advanced glycation end products increases matrix metalloproteinase-1, -3, and -13, and TNF-alpha in human osteoarthritic chondrocytes. *FEBS Lett* 581: 1928-1932.

Nakamura K, Yamagishi S, Adachi H, Kurita-Nakamura Y, Matsui T, Yoshida T, Sato A, Imaizumi T (2007) Elevation of soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in diabetic subjects with coronary artery disease. *Diabetes Metab Res Rev* 23(5):368-71.

Nakamura K, Yamagishi S, Adachi H, Kurita-Nakamura Y, Matsui T, Yoshida T, Imaizumi T (2007) Serum levels of sRAGE, the soluble form of receptor for advanced glycation end products, are associated with inflammatory markers in patients with type 2 diabetes. *Mol Med* 13(3-4):185-9.

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. *J Biol Chem* 267 (21): 14998-5004.

Nibali L, Donos N, Henderson B (2009) Periodontal infectogenomics. *J Med Microbiol* (Pt10):1269-74.

Offenbacher S, Collins JG, Yalda B, Haradon G (1994) Role of prostaglandins in high risk periodontitis patients. *ASM Press Washington DC* 203-214.

Offenbacher S, Katz VL, Fertik GS (1996) Periodontal infection as a risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol* 2:19-25.

Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ Jr, Chow WS, Stern D, Schmidt AM (1998) Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med* 4(9):1025-31.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE (2001) Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 183(12):3770-83.

Picheth G, Costantini CO, Pedrosa FO, Leme da Rocha Martinez T, Maltempi de Souza E (2007) The -374A allele of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene promoter is a protective factor against cardiovascular lesions in type 2 diabetes mellitus patients. *Clin Chem Lab Med* 45(10):1268-72.

Poon PY, Szeto CC, Chow KM, Kwan BC, Li PK; D (2010) Relation between polymorphisms of receptor for advanced glycation end products (RAGE) and cardiovascular diseases in Chinese patients with diabetic nephropathy. *Clin Nephrol* 73(1):44-50.

Pulendran B, Palucka K, Banchereau J (2001) Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science* 293(5528):253-6.

Qian F, Sun BL, Zhang WY, Ke J, Zhu J (2014) Gly82Ser polymorphism of the receptor for advanced glycation end-product (RAGE) potential high risk in patients with colorectal cancer. *Tumour Biol* 35(4):3171-5.

Quinn SM, Zhang JB, Gunsolley JC, Schenkein HA, Tew JG (1998) The influence of smoking and race on adult periodontitis and serum IgG2 levels. *J Periodontol* 69(2):171-7.

Rapp GE, Pineda-Trujillo N, McQuillin A, Tonetti M (2011) Genetic power of a Brazilian three-generation family with generalized aggressive periodontitis. *II Braz Dent J* 22(1):68-73.

Rateitschak KH, Wolf HF (2012) Farbatlant der Zahnmedizin 1 Parodontologie, S.37.

Reich M, Hannig C, Al-Ahmad A, Bolek R, Kümmerer K (2012) A comprehensive method for determination of fatty acids in the initial oral biofilm (pellicle) *J Lipid Res* 53(10): 2226–2230.

Salvi GE, Carollo-Bittel B, Lang NP (2008) Effects of diabetes mellitus on periodontal and periimplant conditions: update on associations and risks. *J Clin Periodontol* 35(8 Suppl):398-409.

Santos IC, Daga DR, Frigeri HR, Réa RR, Almeida AC, Souza EM, Pedrosa FO, Fadel-Picheth CM, Picheth G (2010) The functional polymorphisms -429T>C and -374T>A of the RAGE gene promoter are not associated with gestational diabetes in Euro-Brazilians. *Genet Mol Res* 9(2):1130-5.

Schacher B, Baron F, Rossberg M, Wohlfeil M, Arndt R, Eickholz P (2007) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as indicator for aggressive periodontitis by two analysing strategies. *J Clin Periodontol* 34(7):566-73.

Schaefer AS, Bochenek G, Manke T, Nothnagel M, Graetz C, Thien A, Jockel-Schneider Y, Harks I, Staufenbiel I, Wijmenga C, Eberhard J, Guzeldemir-Akcakanat E, Cine N, Folwaczny M, Noack B, Meyle J, Eickholz P, Trombelli L, Scapoli C, Nohutcu R, Bruckmann C, Doerfer C, Jepsen S, Loos BG, Schreiber S (2013) Validation of reported genetic risk factors for periodontitis in a large-scale replication study. *J Clin Periodontol* 40(6):563-72.

Schaefer AS, Jochens A, Dommisch H, Graetz C, Jockel-Schneider Y, Harks I, Staufenbiel I, Meyle J, Eickholz P, Folwaczny M, Laine M, Noack B, Wijmenga C, Lieb W, Bruckmann C, Schreiber S, Jepsen S, Loos BG (2014) A large candidate-gene association study suggests genetic variants at IRF5 and PRDM1 to be associated with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 41(12):1122-31.

Scher JU, Abramson SB (2013) Periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis*, and rheumatoid arthritis: what triggers autoimmunity and clinical disease? *Arthritis Res Ther* 15(5):122.

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. *J Clin Invest* 96: 1395-1403.

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. *Circ Res* 84(5):489-97.

Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM (2000) The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta* 1498(2-3):99-111.

Schmidt AM, Mora R, Cap R, Yan SD, Brett J, Ramakrishnan R, Tsang TC, Simionescu M, Stern D (1994) The endothelial cellbinding site for advanced glycation end products consists of a complex: an integral membrane protein and a lactoferrin-like polypeptide. *J Biol Chem* 269:9882–9888.

Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA. (1990) Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol* 144 (7): 2771–80.

Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD (1997) Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontol* 2000 14:158-72.

Seymour GJ, Gemmell E, Reinhardt RA, Eastcott J, Taubman MA (1993) Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: Cellular and molecular mechanisms. *J Periodontol Res.* 28:478–86.

Shearer DM, Thomson WM, Caspi A, Moffitt TE, Broadbent JM, Poulton R (2011) Intergenerational continuity in periodontal health: findings from the Dunedin family history study. *J Clin Periodontol* 38(4):301-9.

Shimazaki Y, Saito T, Yonemoto K, Kiyohara Y, Iida M, Yamashita Y (2007) Relationship of metabolic syndrome to periodontal disease in Japanese women: the Hisayama Study. *J Dent Res* 86(3):271-5.

Shinoda Y (1992) Immunohistochemical localization of type IV collagen and laminin in the gingival capillary basement membrane of the diabetic rat. *J Osaka Dent Univ* 26: 49-66.

Socransky SS, Haffajee AD (1994) Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol* 2000 5:7-25.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25(2):134-44.

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Duff GW (2000) Microbiological parameters associated with IL-1 gene polymorphisms in periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 27(11):810-8.

Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, Burton MA, Goldstein LE, Duong S, Tanzi RE, Moir RD (2010) The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One* 5(3):e9505. doi:10.1371/journal.pone.0009505.

Stathopoulou, PG (2010) Epithelial cell pro-inflammatory cytokine response differs across dental plaque bacterial species. *J Clin Perio* 37:24–29

Stitt AW (2001) Advanced glycation: an important pathological even in diabetic and age related ocular disease. *British Journal of Ophthalmol* 85, 746-753.

Sugaya K, Fukagawa T, Matsumoto KI, Mita K, Takahashi EI, Ando A, Inoko H, Ikemura T (1994) Three genes in the human MHC class II 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.

Srikrishna G, Hudson B (2010) AGER (advanced glycosylation end product-specific receptor). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*.

Ulrich P, Cerami A (2001) Protein glycation, diabetes and aging. *Recent Progress in Hormone Research* 56, 1-22.

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(6784):354-60.

Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF, Kitetsu S (2005) The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 32(4):369-74.

Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M (1998) Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. *Ann Periodontol* 1998; 3: 30–39.

ten Cate JM (2006) Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology*; 94(1):1-9.

Tervonen T, Oliver RC (1993) Long-term control of diabetes mellitus and periodontitis. *J Clin Periodontol* 20(6):431-5.

Timmerman MF, van der Weijden GA (2006) Risk factors for periodontitis. *Int J Dent Hyg* 4(1):2-7.

Todd R (1996) The continuing saga of complement receptor type 3 (CR3). *J Clin Invest* 98 (1): 1–2.

Tonetti MS (1998) Cigarette smoking and periodontal diseases: etiology and management of disease. *Ann Periodontol* 3(1):88-101.

Tonetti MS, Mombelli A (1999) Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol* 4(1):39-53.

Torres de Heens GL, Loos BG, van der Velden U (2010) Monozygotic twins are discordant for chronic periodontitis: clinical and bacteriological findings. *J Clin Periodontol* 37(2):120-8.

Trombelli L, Tatakis DN (2003) Periodontal diseases: current and future indications for local antimicrobial therapy. *Oral Dis* 9(Suppl) 1:11-5.

van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U (2002) *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 29(11):1023-8.

Vlassara H, Brownlee M, Manogue KR, Dinarello CA, Pasagian A (1988) Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science* 240: 1546-1548.

Wang DD, Bordey A (2008) The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* 86 (4): 342–67.



Wang ZT, Hu JJ, Fan R, Zhou J, Zhong J (2014) RAGE gene three polymorphisms with Crohn's disease susceptibility in Chinese Han population. *World J Gastroenterol* 20(9):2397-402.

Wautier JL, Guillausseau PJ (2001) Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. *Diabetes Metab* 27(5 Pt 1):535-42.

Wautier JL, Wautier MP (2001) Blood cells and vascular cell interactions in diabetes. *Clin Hemorheol Microcirc* 25: 49-53.

Weiss EI, Shanitzki B, Dotan M, Ganeshkumar N, Kolenbrander PE, Metzger Z (2000) Attachment of *Fusobacterium nucleatum* PK1594 to mammalian cells and its coaggregation with periodontopathogenic bacteria are mediated by the same galactose-binding adhesin. *Oral Microbiol Immunol* 15(6):371-7.

Yamagishi S, Matsui T (2010) Soluble form of a receptor for advanced glycation end products (sRAGE) as a biomarker. *Front Biosci (Elite Ed)* 1; 2:1184-95.

Yan SD, Bierhaus A, Nawroth PP, Stern DM (2009) RAGE and Alzheimer's disease: a progression factor for amyloid-beta-induced cellular perturbation? *J Alzheimers Dis* 16(4):833-43.

Yang L, Wu Q, Li Y, Fan X, Hao Y, Sun H, Cui Y, Han L (2013) Association of the receptor for advanced glycation end products gene polymorphisms and circulating RAGE levels with diabetic retinopathy in the Chinese population. *J Diabetes Res*: 264579.

Yang HW, Asikainen S, Doğan B, Suda R, Lai CH (2004) Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b to aggressive periodontitis: frequency in pure cultured isolates. *J Periodontol* 75(4):592-9.

Zeng L, Zhang AQ, Gu W, Zhou J, Zhang LY, Du DY, Zhang M, Wang HY, Yan J, Yang C, Jiang JX (2012) Identification of haplotype tag single nucleotide polymorphisms within the receptor for advanced glycation end products gene and their clinical relevance in patients with major trauma. *Crit Care* 16(4):R131.

Zhang X, Teng YT (2006) Interleukin-10 inhibits gram-negative-microbe-specific human receptor activator of NF-kappaB ligand-positive CD4<sup>+</sup>-Th1-cell-associated alveolar bone loss in vivo. *Infect Immun* 74(8):4927-31.

## 8 Thesen

1. Parodontitis (PA) wird als chronisch entzündliche Erkrankung verstanden. Der auslösende Reiz ist primär das Vorhandensein des subgingivalen Biofilms, wobei die individuelle Immunantwort des Patienten auf die parodontalpathogenen Mikroorganismen im Biofilm für den Verlauf der Entzündungsreaktion entscheidend ist.
2. Genpolymorphismen können die Empfänglichkeit des Wirts für die Entstehung einer Parodontitis verändern. RAGE aktiviert über verschiedene Signalkaskaden den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und vermittelt die Bildung von proinflammatorischen Proteinen, die Entzündungsprozesse und Abwehrreaktionen im Körper auslösen. Bestimmte Polymorphismen im RAGE-Gen [c.-374T>A (rs1800624), c.-429C>T (rs1800625), G82S (rs2070600), sowie die 63bp-Deletion (-407 bis -345bp Deletionspolymorphismus)] beeinflussen die RAGE Transkriptionsrate und damit die Proteinsynthese. Eine Assoziation dieser SNPs zur PA ist daher möglich.
3. Ziel dieser Studie war es deshalb zu überprüfen, ob eine Assoziation der Genpolymorphismen G82S (rs2070600), c.-374T>A (rs1800624) und c.-429C>T (rs1800625) sowie der 63bp-Deletion (-407 bis -345bp Deletionspolymorphismus) zur Parodontitis und/oder zu klinisch-parodontologischen Parametern vorliegt und ob eine Beziehung zum Nachweis parodontalpathogener Markerbakterien besteht.
4. Es wurden 81 Patienten mit generalisierter aggressiver Parodontitis (GAgP) (40,4 $\pm$ 9,8 Jahre; 63% Frauen) und 68 mit generalisierter chronischer Parodontitis (GChP) (48,9 $\pm$ 9,6 Jahre; 63,2% Frauen) in die Studie eingeschlossen. 85 Probanden (46,7 $\pm$ 10,8 Jahre; 54,1% Frauen) bildeten die Gruppe der parodontitisfreien Kontrollen. Die drei Genpolymorphismen sowie der Deletionspolymorphismus wurden mittels PCR und Restriktions-Fragment-Längen-Analyse ermittelt. Der Nachweis parodontalpathogener Bakterien erfolgte molekularbiologisch nach Amplifikation bakterienspezifischer DNA-Abschnitte über DNA-Sonden.
5. Für den c.-374T>A-SNP konnte unter allen Studienteilnehmern der homozygote Genotyp TT, der homozygote Genotyp AA, und der heterozygote Genotyp AT nachgewiesen werden. Bei der statistischen Analyse ergaben sich ausschließlich für das T-dominante Modell signifikante Unterschiede. Parodontitispatienten (GAgP und GAgP+GChP) wa-

ren signifikant häufiger Träger der Genotypen TT und AT als parodontitisfreie Kontrollen. Dies konnte auf Ebene der Allelverteilung bestätigt werden.

6. In der binären logistischen Regression konnte unter Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, Raucherstatus sowie API das T-Allel als unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten einer aggressiven Parodontitis (p-Wert: 0,026; OR: 1,78; 95% Konfidenzintervall: 1,07-2,97) bestätigt werden. Ursache dafür könnte eine beeinträchtigte Immunantwort, möglicherweise zurückführbar auf eine T-Allel- assoziierte verringerte Promotoraktivität sein.
7. Weder die untersuchten Genotypen der Polymorphismen c.-429C>T, G82S und des 63bp-Deletionspolymorphismus noch deren Allele waren zum Auftreten von aggressiven und chronischen Parodontalerkrankungen (GAgP, GChP, GAgP+GChP vs. parodontitisfreie Kontrollen) statistisch signifikant assoziiert.
8. Die Anzahl von Individuen, bei denen die parodontopathogenen Markerbakterien nachgewiesen wurden, unterschied sich in allen Patientengruppen und in der Kontrollkohorte nicht signifikant in Abhängigkeit von der genetischen Konstellation aller untersuchten Polymorphismen (c.374T>A, c.-429C>T, G82S).
9. Die Polymorphismen im RAGE-Gen stellen in der multifaktoriellen Ätiologie der Parodontitis keine Hauptfaktoren da. Aufgrund fehlender Strenge der Assoziation von SNPs im RAGE-Gen zur Parodontitis ist eine Genotypisierung zur Bestimmung des individuellen Parodontitisrisikos nach heutigem Kenntnisstand nicht geeignet.
10. Zur weiteren Aufklärung der Pathogenese parodontaler Erkrankungen sollte in genomweiten Assoziationsstudien nach weiteren parodontalen Kandidatengenomen geforscht werden, deren Bedeutung in funktionellen Analysen bestätigt werden sollten.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Diana Stosberg  
Geburtsdatum: 24.12. 1974  
Geburtsort: Karl-Marx-Stadt  
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder  
Nationalität: deutsch

### **Schulbildung**

09/1981 – 06/1990 POS Käthe-Kollwitz  
09/1990 – 06/1992 EOS Karl-Marx  
09/1998 – 06/2001 Abendgymnasium Chemnitz

### **Hochschulbildung**

10/2001 – 10/2006 Zahnmedizinstudium an der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg  
10/2001 – 02/2004 Vorklinisches Studium  
02/2004 Physikum  
10/2006 Staatsexamen in Zahnmedizin

### **Berufstätigkeit**

08/1992 – 05/1995 Ausbildung zur Zahnarzhelferin, ZAP DS. Jungnickel Chemnitz  
06/1995 – 10/2001 Zahnarzhelferin in der ZAP DS. Jungnickel Chemnitz  
02/2007 – 05/2009 Assistenz Zahnärztin in der ZAP Dr. Simon, Klinikum „St.Georg“, Leipzig  
03/2009 Geburt meiner Tochter Hannah  
05/2009 – 04/2010 Elternzeit  
05/2010 – 02/2011 Assistenz Zahnärztin in der ZAP Dr. Erbring in Halle (Saale)  
08/2011 Geburt meines Sohnes Justus  
10/2011 – 03/2013 Elternzeit  
03/2013 – 10/2014 Entlastungsassistentin ZAP Dr. Beyer-Dames und Beyer in Halle (Saale)  
Seit 10/2014 Entlastungsassistentin ZAP Dipl.-Stom. Gärtner in Halle (Saale)

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn apl. Prof. Dr. med. Stefan Reichert für die Überlassung dieses interessanten Themas, das sorgfältige Heranführen an die Thematik und seine fortwährende Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit. Weiterhin danke ich ihm für die kritische und konstruktive Durchsicht des Manuskriptes sowie für die wohlwollende Förderung während der Zusammenarbeit.

Frau PD Dr. rer. nat., rer. medic. habil. Susanne Schulz möchte ich vielmals für Ihre Hilfe und enge Zusammenarbeit bei der Durchführung des molekulargenetischen und statistischen Teils der Arbeit, ihre wertvollen Hinweise und Ratschläge, die fachliche und freundschaftliche Unterstützung während der Bearbeitung meines Dissertationsthemas danken.

Herrn Prof. Dr. med. dent. H.-G. Schaller danke ich für die Möglichkeit, an der Klinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie promovieren zu können, und die Betreuung dieser Studie.

Allen Probandinnen und Probanden dieser Studie möchte ich sehr herzlich für ihre Mithilfe danken, ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Peter Stosberg, der mir stets den nötigen Rückhalt und Freiraum für meine Vorhaben gegeben hat und mich in Phasen des Stillstands zum Weiterführen dieser Arbeit motiviert hat.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Weder diese noch eine andere Arbeit ist von mir im Rahmen eines Dissertationsverfahrens einer anderen Fakultät oder Universität vorgelegt worden.

Halle (Saale), den

### **Eigene Posterpräsentation und Vorträge**

D Stosberg, S Schulz, HG Schaller, S Reichert (2013): Der c.-374T>A Promotorpolymorphismus im RAGE-Gen bei Patienten mit aggressiver Parodontitis. 13.-14. Dezember 2013: Vortrag zum 2. Doktoranten Kongress der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 2013

D Stosberg, S Schulz, HG Schaller, S Reichert (2010) Der c.-374T>A Promotorpolymorphismus im RAGE-Gen bei Patienten mit aggressiver Parodontitis. Vortrag zum 9. Friedrich-Ludwig-Hesse-Symposium am 15.10.2010 in Leipzig

D Stosberg, S Reichert, J Klapproth, U Zimmermann, Y Reichert, JM Stein, C Gläser, HG Schaller, S Schulz (2010) The role of the c.-374T>A SNP in the promoter region of RAGE-gene in aggressive periodontitis. Gemeinsame DGP-ARPA-Herbst vom 17.09.201-18.09.2010 in Bonn, Poster 27. Abstract: Zeitschrift Parodontologie 2010, 321-322.

### **Eigene Veröffentlichungen**

D Stosberg, S Reichert, J Klapproth, U Zimmermann, Y Reichert, JM Stein, C Gläser, HG Schaller, S Schulz (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, Vol 13(03), Poster 551.