

**Aus der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

(Direktor: Prof. Dr. H.-G. Schaller)

**Die Bedeutung von Genpolymorphismen des Tumornekrosefaktors alpha bei
Patienten mit koronarer Herzkrankheit als Risikoindikatoren für
kardiovaskuläre Erkrankungen und entzündliche Parodontitiden**

Habilitation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium, rerum medicarum habilitatus

(Dr. rer. nat., rer. medic. habil.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg

von Dr. rer. nat. Susanne Schulz
geboren am 14.04.1971 in Halle (Saale)

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Søren Jepsen (Bonn)
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Rüdiger Christian Braun-Dullaeus (Magdeburg)

Tag der Vorlesung: 09. April 2014 in Halle

Tag der Verteidigung: 13. Mai 2014 in Halle

Für Helene und Liese

Referat

Zielsetzung In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung der genetischen Konstellation (c.-308G>A, c.-238G>A) des proinflammatorischen Zytokins, Tumornekrosefaktor alpha ($TNF\alpha$), als Risikoindikator für schwere Parodontitiden bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen und als prognostischer Marker für kardiovaskuläre Sekundärereignisse untersucht werden. **Methodik** Es wurden in einer klinischen Studie (Studie A) funktionelle Untersuchungen zur Rolle der $TNF\alpha$ -Polymorphismen (SNPs: c.-863C>A, c.-857C>T, c.-308G>A, c.-238G>A, P84L, IVS3 +51A>G, RFLP, SSCP) auf mRNA- (native Monozyten, kompetitive RT-PCR) und Proteinebene (Plasma, hsELISA) durchgeführt. In einer Fall-Kontrollstudie an 176 Patienten mit schwerer Parodontitis und 91 parodontal Gesunden wurde die Bedeutung der $TNF\alpha$ -SNP c.-308G>A und c.-238G>A als parodontale Risikoindikatoren untersucht (Studie B). In einer Longitudinalstudie wurden 1002 kardiovaskulären Patienten klinisch und genetisch ($TNF\alpha$ -Gen c.-308G>A, c.-238G>A) charakterisiert und nach einem Jahr mittels Fragebogen erneut evaluiert (Studie C). **Ergebnisse** Der AG-Genotyp des c.-238G>A Polymorphismus wird mit erhöhten mRNA-Expression in Monozyten assoziiert, wohingegen auf Proteinebene keine Assoziation zu genetischen Varianten im $TNF\alpha$ -Gen besteht (Studie A). Risikoindikatoren für eine schwere Parodontitis sind der GG-Genotyp und das G-Allel des c.-238G>A- und das A-Allel des c.-308G>A- $TNF\alpha$ -Polymorphismus (Studie B). Bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen ist die genetische Konstellation des $TNF\alpha$ -Gens (c.-308G>A, c.-238G>A) kein Risikoindikator für das Auftreten einer schweren Parodontalerkrankung (Studie C). Obwohl inflammatorische Prozesse und das $TNF\alpha$ im Speziellen bei der koronaren Herzkrankheit eine wichtige Rolle spielen, sind die $TNF\alpha$ -SNPs c.-308G>A und c.-238G>A keine prognostischen Marker für das Auftreten eines kardiovaskulären Sekundärereignisses (Myokardinfarkt, Schlaganfall, kardiovaskulärer Tod). **Schlussfolgerungen** Obgleich in Voruntersuchungen gezeigt worden war, dass SNPs im $TNF\alpha$ -Gen (c.-308G>A, c.-238G>A) mit dem Auftreten von schweren Parodontitiden assoziiert sind, wurde die genetische Konstellation nicht als parodontaler Risikoindikator bei kardiovaskulären Patienten bestätigt. Darüber hinaus besitzen diese $TNF\alpha$ -SNPs keine prognostische Relevanz für das Auftreten von kardiovaskulären Sekundärereignissen.

Schulz, Susanne: Die Bedeutung von Genpolymorphismen des Tumornekrosefaktors alpha bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit als Risikoindikatoren für kardiovaskuläre Erkrankungen und entzündliche Parodontitiden. Halle, Univ., Med. Fak., Habil., 132 Seiten, 2013

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Einleitung 1
1.1	Die biologische Funktion des humanen Tumornekrosefaktors alpha 1
1.1.1	Die Expression des humanen TNF α 1
1.1.2	TNF α vermittelte biologische Prozesse 3
1.2	TNF α als Krankheitsmodulator 7
1.3	TNF α und Parodontitis 8
1.3.1	Parodontitis als entzündliche Erkrankung 8
1.3.2	Die Bedeutung des TNF α in der Pathogenese der Parodontitis..... 9
1.4	TNF α und koronare Herzerkrankung 10
1.4.1	Die Rolle inflammatorischer Prozesse bei koronaren Herzerkrankungen 10
1.4.2	Die Wirkung des TNF α in der Pathogenese koronarer Herzerkrankungen 12
1.5	Wechselwirkungen zwischen parodontalen und kardiovaskulären Erkrankungen – mögliche Implikation des TNF α ... 14
1.5.1	Klinische Studien 14
1.5.2	Biologische Plausibilität des postulierten Zusammenhangs zwischen Parodontitiden und kardiovaskulären Erkrankungen 15
1.5.3	Systemische Inflammation als Schnittstelle zwischen Parodontitis und kardiovaskulären Erkrankungen - Bedeutung des TNF α 16
1.6	Genpolymorphismen in der Ätiologie multifaktorieller Erkrankungen 17
1.6.1	Bedeutung von polymorphen Besonderheiten im TNF α -Gen: Funktionelle Auswirkungen von SNPs im TNF α -Gen..... 17
1.6.2	Die TNF α -SNPs c.-308G>A und c.-238G>A und parodontale Erkrankungen 20
1.6.3	Die genetischen Varianten c.-308G>A und c.-238G>A im TNF α - Gen und deren Rolle bei koronaren Herzerkrankungen 21
2	Zielstellung 22
3	Patienten, Material und Methoden 23

3.1	Patienten	23
3.1.1	Koronarpatienten für funktionelle Voruntersuchungen zum TNF α auf transkriptorischer und translatorischer Ebene – Studie A.....	23
3.1.2	Parodontitispatienten und parodontitisfreie Kontrollprobanden für die Pilotstudie „Assoziation von Besonderheiten im Gen für TNF α bei Parodontitiden“- Studie B.....	25
3.1.3	Patienten mit koronarer Herzerkrankung für die Studie „Parodontitis als Risikofaktor für koronare Sekundärereignisse“ - Studie C.....	27
3.2	Material	29
3.2.1	Geräte	29
3.2.2	Chemikalien und Enzyme	29
3.2.3	Puffer.....	31
3.2.4	Oligonukleotide.....	31
3.3.	Methoden für funktionelle Voruntersuchungen zum TNF α auf transkriptorischer und translatorischer Ebene – Studie A.....	32
3.3.1	Genetische Untersuchungen zum TNF α	32
3.3.2	Funktionelle Untersuchungen auf transkriptorischer Ebene	34
3.3.3	Funktionelle Untersuchungen auf translatorischer Ebene	35
3.4	Methoden für die Pilotstudie „Assoziation von Besonderheiten des TNF α -Gens und Parodontitiden“ – Studie B.....	36
3.4.1	Nachweis parodontaler Leitkeime aus subgingivaler Plaque.....	36
3.4.2	Genetische Untersuchungen zum TNF α	37
3.5	Methoden für die Longitudinalstudie „Parodontitis als Risikofaktor für koronare Sekundärereignisse“ – Studie C	38
3.5.1	Nachweis parodontaler Leitkeime aus subgingivaler Plaque.....	38
3.5.2	Genetische Untersuchungen zum TNF α	38
3.6	Statistische Methoden	38
3.6.1	Statistische Auswertung der klinischen Studien.....	38
3.6.2	Fallzahlplanung für die Studie „Parodontitis als Risikofaktor für koronare Sekundärereignisse“ – Studie C	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Funktionelle Voruntersuchungen zum TNF α auf transkriptorischer und translatorischer Ebene – Studie A.....	40
4.1.1	Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene	40

4.1.2	Expressionsanalysen auf Ebene des TNF α -Proteinlevels.....	41
4.2	Pilotstudie „Assoziation von Besonderheiten im Gen für TNF α bei Parodontitiden“ – Studie B.....	44
4.2.1	Assoziationen zwischen genetischen Besonderheiten im TNF α -Gen und dem Auftreten von schweren Parodontitiden.....	44
4.2.2	Die Bedeutung der TNF α -SNPs c.-308G>A und c.-238G>A als Risikoindikatoren für klinische Marker schwerer Parodontitiden.....	49
4.3	Longitudinalstudie „Parodontitis als Risikofaktor für koronare Sekundärereignisse“ (ClinicalTrials.gov identifiziert: NCT01045070) – Studie C: Erfassung der Basisdaten	52
4.3.1	Klinische Charakterisierung der in die Studie eingeschlossenen Patienten mit koronarer Herzerkrankung	53
4.3.2	Einfluss der TNF α -SNPs c.-308G>A und c.-238G>A auf den Schweregrad einer Parodontitis bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung.....	56
4.3.3	Die Bedeutung der individuellen genetischen Konstellation für weitere parodontale und koronare Risikofaktoren.....	58
4.3.4	Zusammenhang zwischen Besonderheiten im Gen für TNF α und der subgingivalen Keimbildung	61
4.4	Auswertung des einjährigen Follow-ups – Studie C	63
4.4.1	Klinische Charakterisierung der Patienten entsprechend eines kardiovaskulären Sekundärereignisses	63
4.4.2	Die Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A im TNF α -Gen als mögliche Prädiktoren für ein kardiovaskuläres Sekundärereignis	66
5	Diskussion	72
5.1	Regulation des TNF α - Funktionelle Auswirkungen von polymorphen Besonderheiten im TNF α -Gen – Studie A.....	73
5.2	Die Bedeutung der SNPs c.-308G>A und c.-238G>A für das Auftreten von schweren Parodontitiden –Studie B	75
5.3	TNF α -SNPs c.-308G>A und c.-238G>A und parodontale Risikofaktoren	78
5.4	Longitudinalstudie „Parodontitis als Risikofaktor für koronare Sekundärereignisse“ – Studie C: Basisuntersuchungen	79
5.4.1	Differenzierung des Patientenkollektivs	79

5.4.2	Die Rolle der Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A als Risikoindikatoren für die Schwere einer parodontalen Erkrankung bei Koronarpatienten.....	81
5.4.3	Besonderheiten im Gen für TNF α und parodontale Risikofaktoren ..	82
5.5	Longitudinalstudie „Parodontitis als Risikofaktor für koronare Sekundärereignisse“ – Studie C: einjähriges Follow-up.....	84
5.5.1	Patientencharakterisierung entsprechend eines kardiovaskulären Sekundärereignisses	84
5.5.2	Die Bedeutung einer schweren Parodontalerkrankung und parodontalen Risikofaktoren als prognostischer Marker für kardiovaskuläre Sekundärereignisse	85
5.5.3	Polymorphe Besonderheiten im TNF α -Gen als Prädiktor für kardiovaskuläre Sekundärereignisse	86
6	Schlussfolgerungen	88
7	Zusammenfassung	91
8	Literaturverzeichnis	93
9	Anlagen	124
10	Thesen	130

Lebenslauf

Eidesstattliche Erklärung

Danksagung

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

<i>A. actinomy-</i>	
<i>cetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Abb.	Abbildungen
AP	aggressive Parodontitis
AP1	Aktivatorprotein 1 des Transkriptionsfaktors NFκB
Apo	Apolipoprotein
BMI	“Body Mass Index” (Körpergewichtsindex)
bp	Basenpaare
BSA	„bovine-serum-albumin“ (Rinderserumalbumin)
C	Vernetzungsgrad
CABG	„coronary artery bypass graft“, Koronararterien Bypass
<i>C. gingivalis</i>	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>
clAP	„cellular inhibitor of apoptosis“
<i>C. ochracea</i>	<i>Capnocytophaga ochracea</i>
CP	chronische Parodontitis
<i>C. rectus</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
<i>C. sputigena</i>	<i>Capnocytophaga sputigena</i>
CRP	C-reaktives Protein
DNA	“Deoxyribonucleic acid” (Desoxyribonukleinsäure)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	_{DL} -Dithiothreitol
<i>E. corrodens</i>	<i>Eikenella corrodens</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	“enzyme-linked immunosorbent assay” (Enzymimmuntest)
<i>E. nodatum</i>	<i>Eubacterium nodatum</i>
FACS	„fluorescence activated cell sorting“ (Zellsortierer)
FADD	„Fas-associated death domain protein“
FMLP	N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
g	Gramm; Konstante für die Erdbeschleunigung
HDL	„High Density“ Lipoproteine (Lipoproteine mit hoher Dichte)
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IL	Interleukin

IKK	Inhibitor der κ B Kinase
JNK	Jun-N-terminal Kinase
Kap.	Kapitel
LDL	„Low Density“ Lipoproteine (Lipoproteine mit geringer Dichte)
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
m	milli-
μ	mikro-
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MEKK	Mitogenaktivierte Kinase Kinase Kinase
MKK	Mitogenaktivierte Kinase Kinase
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	„messenger RNA“, Boten-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
n	nano-
NF κ B	„nuclear factor κ B“
n.s.	nicht signifikant
NYHA	„New York Heart Association“
OPG	Osteoprotegerin
oxLDL	oxidierte „Low Density“ Lipoproteine
p	pico-
PAAG	Polyacrylamidgel
PBS	„phosphat buffered saline“ (Phosphatpuffer)
PCR	„Polymerase chain reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>P. micros</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PTCA	perkutane transluminale Coronarangioplastie
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
RANK	Rezeptor-Aktivator des nukleären Faktors κ B
RANKL	Ligand des Rezeptor-Aktivators des nukleären Faktors κ B
RFLP	„restriction fragment length polymorphism“ (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus)
RIP	„receptor interactin protein“

RNA	“Ribonucleic acid” (Ribonukleinsäure)
rpm	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	“Ribosomal ribonucleic acid” (ribosomale Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription
SAFE	„survivor activating factor enhancement“
SD	„Standard deviation“ (Standardabweichung)
SNP	„small nuclear polymorphism“ (Polymorphismus)
SOCS3	„suppressor of cytokine signaling 3“
SPPL2B	“Signal peptide peptidase-like 2B”
SSCP	„single strand conformation polymorphism“ (Einzelstrang-Konformationspolymorphismus)
STAT3	„signal transducer and activator of transcription 3“
sTNF α	“soluble” (löslicher) Tumornekrosefaktor α
T	Totalacrylamidkonzentration
TACE	TNF α -converting enzyme
TAK	TGF β -aktivierte Kinase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
<i>T. denticola</i>	<i>Treponema denticola</i>
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
TE	Tris-EDTA-Puffer
<i>T. forsythia</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
TGF- β	„Transforming growth factor β “
TIMP	Gewebeinhibitoren der MMPs
tmTNF α	membrangebundener Tumornekrosefaktor α
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-R1	TNF-Rezeptor 1
TNF-R2	TNF-Rezeptor 2
TRADD	„TNF-receptor-associated death domain“
TRAF2	“TNF receptor associated factor 2“
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
U	„Units“ (Einheiten)
UV	Ultraviolett
V	Volumen
VCAM-1	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1
vs.	versus

1 Einleitung

1.1 Die biologische Funktion des humanen Tumornekrosefaktors alpha

Der Tumornekrosefaktor alpha ($\text{TNF}\alpha$) ist ein pleiotropes Zytokin, welches eine zentrale Rolle bei verschiedenen biologischen Vorgängen, insbesondere bei der Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems, als Regulator von Zellaktivierung, Zelldifferenzierung und Zelltod spielt. $\text{TNF}\alpha$ ist ein wichtiger Mediator der akuten und chronischen Entzündungsreaktion. Aus diesem Grund wird dem $\text{TNF}\alpha$ eine große Bedeutung bei der Manifestation, Prognose und Therapie einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen beigemessen.

1.1.1 Die Expression des humanen $\text{TNF}\alpha$

Das Gen für das humane $\text{TNF}\alpha$ ist ein *single copy* Gen, das auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6, Position 6p21.3, in unmittelbarer Nähe zum Haupthistokompatibilitätskomplex, einer hochpolymorphen Region des humanen Genoms, lokalisiert ist.

Eine Vielzahl polymorpher Varianten („single nucleotide polymorphism“ SNP) wurden innerhalb und in der Nähe des $\text{TNF}\alpha$ -Genlokus, insbesondere in der distalen Promotorregion identifiziert (Abbildung 1).

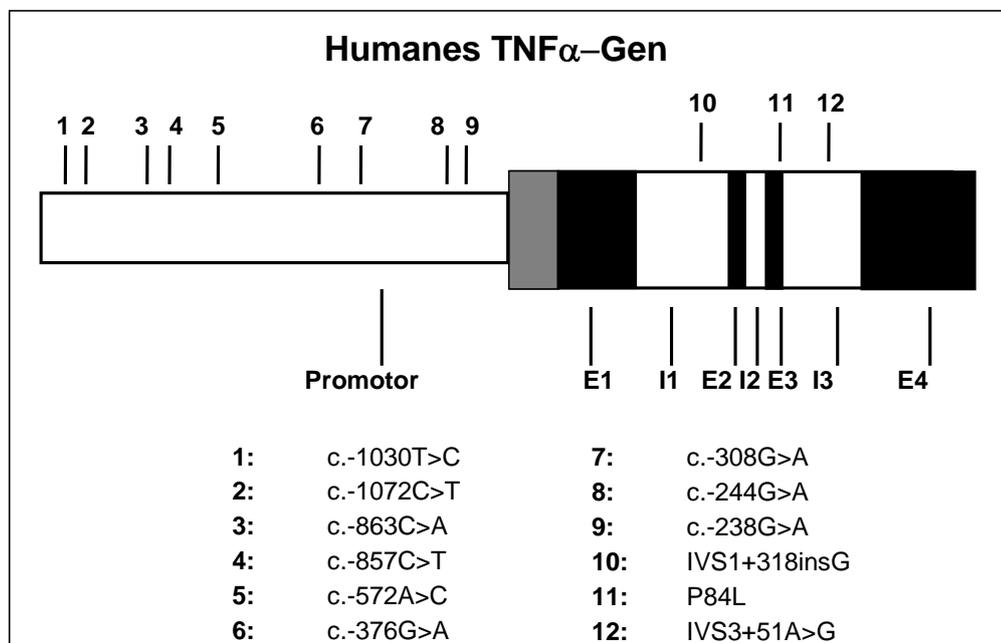


Abbildung 1. Schematische Darstellung des $\text{TNF}\alpha$ -Gens mit charakterisierten polymorphen Varianten [nach (1)]. (E: Exon, I: Intron).

Die kodierende Sequenz des TNF α -Gens umfasst etwa 3000 Basenpaare, vier Exons und drei Introns (2, 3). Die mRNA des humanen TNF α ist 1,5kb lang (4). TNF α wird als 233 Aminosäuren langes und 26kDa schweres Typ-II-Membranprotein exprimiert, welches spontan, intrazellulär, homotrimere Strukturen ausbildet (5). Bereits die membranständige Form des TNF α ist ein biologisch aktives Molekül (4, 6, 7). Dabei agiert TNF α sowohl als Ligand als auch als Rezeptor, welcher seine Antworten im Zell-Zell-Kontakt vermittelt (8). Das membranständige TNF α wird durch die Matrix-Metalloproteinase „TNF α -converting Enzyme“ (TACE) zwischen den Aminosäuren Alanin (Pos. 76) und Valin (Pos. 77) in seine lösliche Form proteolytisch gespalten. Die intrazelluläre Domäne wird weiter durch die „Signal peptide peptidase-like 2B“ (SPPL2B) prozessiert und in den Zellkern transportiert, wo es vermutlich die Ausschüttung von Zytokinen vermittelt (9). Das prozessierte 157 Aminosäuren lange und 17kDa schwere lösliche TNF α übt seine pleiotrope Wirkung als Homotrimer über die TNF-Rezeptoren 1 und 2 (TNF-R1 und TNF-R2) aus. Die extrazellulären Anteile beider Rezeptoren liegen ebenso als lösliche Moleküle im Serum vor und können über TNF α -Bindung, die akute Aktivität von TNF α mindern (10). In Abbildung 2 ist die Prozessierung von TNF α schematisch dargestellt. TNF α wird posttranslational modifiziert. Neben Kopplung von Myristinsäure über eine Amidbindung an die Lysine K19 und K20 (11), sind Thioveresterungen an Cystein C47 (12) beschrieben worden. Ebenso sind Konsensussequenzen für die Creatinkinase, Proteinkinase A und C sowie Tyrosinkinase identifiziert worden (13).

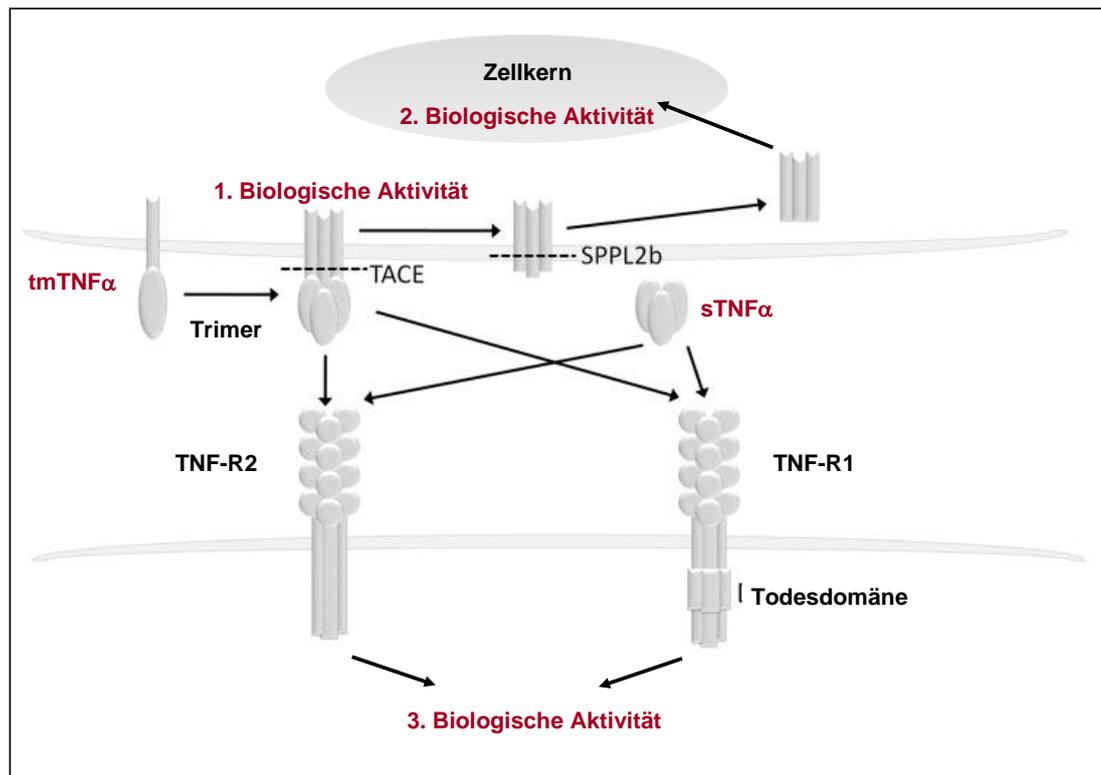


Abbildung 2: Prozessierung und biologische Aktivität von TNF α (nach (7)). Das lösliche TNF α (sTNF α) wird aus der membranständigen Vorläuferform (tmTNF α) durch das „TNF α -converting Enzyme“ (TACE) prozessiert. Mit Hilfe des „Signal peptide peptidase-like 2B“ (SPPL2B) wird die transmembranale Domäne weiter gespalten. Seine biologische Wirkung kann TNF α als homotrimeres, membranständiges Protein (1.), als prozessierte und zum Zellkern zurück transportierte Domäne (2.) und als homotrimeres, lösliches Protein (3.) ausüben.

1.1.2 TNF α vermittelte biologische Prozesse

TNF α wird von einer Vielzahl von humanen Zelltypen als Reaktion auf verschiedene Stimuli exprimiert. Die Synthese von TNF α erfolgt nicht konstitutiv, sondern unterliegt einer hoch sensiblen Regulation. Jedoch sind vornehmlich Zellen hämatopoetischen Ursprungs, wie beispielsweise aktivierte Makrophagen und Monozyten, CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen und Mastzellen die Hauptproduzenten von TNF α . Die Aktivierung erfolgt insbesondere nach Stimulation mit Lipopolysacchariden. Ebenso sind Zytokine, wie Interferon- γ , Interleukin 1 und 2 sowie TNF α selbst potente Induktoren der TNF α -Synthese. Darüber hinaus wird TNF α u.a. von dendritischen Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen, Adipozyten, Keratinozyten und glatten Muskelzellen gebildet (1).

TNF α übt seine biologische Aktivität sowohl autokrin als auch parakrin über das Binden an 2 strukturell divergente Membranrezeptoren, TNF-R1 und TNF-R2, aus

(14). Während der humane TNF-R1 von nahezu allen Zelltypen konstitutiv exprimiert wird, ist die Expression des TNF-R2 auf CD4+ und CD8+ Lymphozyten, Endothelzellen, Neuronensubtypen, Mikrogliazellen, Oligodendrozyten, kardiale Myozyten, humane mesenchymale Stammzellen limitiert (15). An Abbildung 3 sind die Signaltransduktionswege des TNF α vermittelt durch TNF-R1 und TNF-R2 schematisch dargestellt. Im Allgemeinen führt die Bindung an TNF-R1 zu apoptotischen Zellvorgängen, während die Bindung an TNF-R2 hauptsächlich mit Vorgängen der Proliferation und des Überlebens assoziiert wird. Es wird auch von einem Rezeptor-„Crosstalk“ und überlappenden Funktionen ausgegangen (16, 17).

TNF-R1 vermittelte Signaltransduktion

Die von TNF-R1 initiierte Signaltransduktionskaskade wird sowohl durch Binden des membranständigen als auch des löslichen TNF α ausgelöst (18). Der intrazelluläre Teil des TNF-R1 umfasst eine Protein-Protein-Interaktionsregion, die so genannte Todesdomäne (19). Nach Ligandenbindung an TNF-R1 und Abspaltung des an die Todesdomäne gebundenen Silencers wird ein Adapterprotein („TNF-receptor-associated death domain“: TRADD) rekrutiert, das an diese Domäne bindet. Im Folgenden werden zum einen über das Binden von FADD („Fas-associated death domain protein“) und die Aktivierung von Caspasen Reaktionszyklen angeschaltet, die zur Apoptose führen. Zum anderen wird Ubiquitin-vermittelt durch Binden des RIP („receptor interacting protein“) die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und die damit verbundene Expression weiterer Gene möglich (15, 17, 20, 21). Die TNF-R1 gekoppelte Aktivierung von NF κ B findet innerhalb weniger Minuten statt und normalisiert sich im Verlauf einiger Stunden (17).

TNF-R2 vermittelte Signaltransduktion

Der TNF-R2 wird hauptsächlich durch membranständiges TNF α aktiviert, während lösliches TNF α an den Rezeptor binden, jedoch die Signaltransduktionskaskade nicht suffizient auslösen kann (18). Über den kanonischen (klassischen) (22) und den alternativen Signalweg (23) kann die Induktion von NF κ B erfolgen. Im Gegensatz zur TNF-R1 assoziierten NF κ B –Aktivierung kann die durch TNF-R2 vermittelte NF κ B –Induktion über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden. Nach Bindung von TNF α an den TNF-R2 wird der „TNF receptor associated factor 2“ (TRAF2) intrazellulär gekoppelt. Nachfolgend werden Signalwege aktiviert, die zum Überleben der Zelle führen (24) (Abbildung 3).

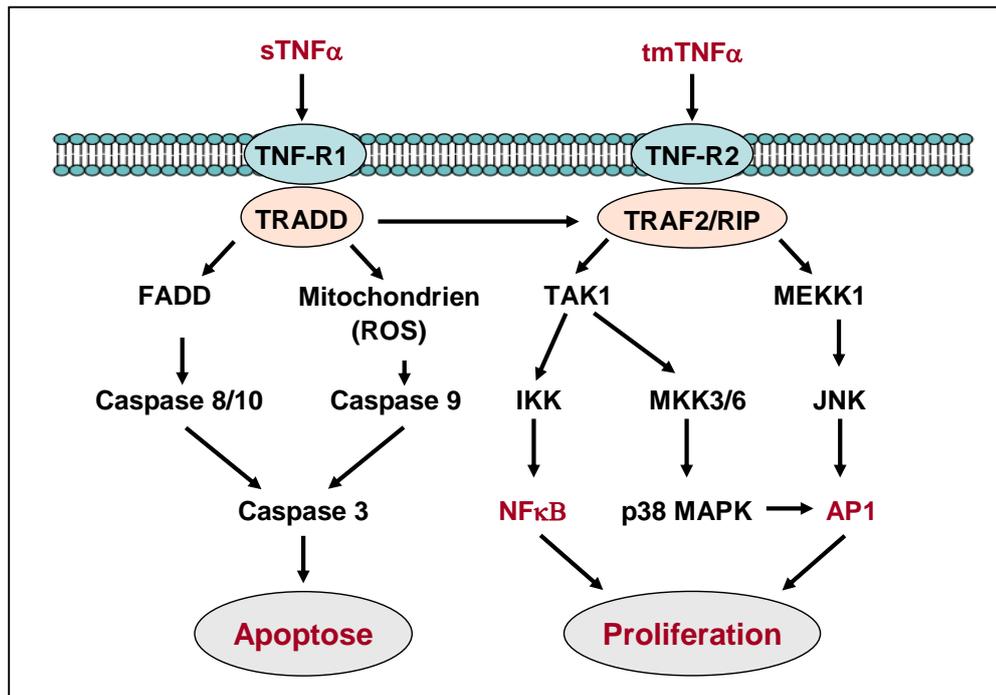


Abbildung 3: Schematische Darstellung der TNF α -assoziierten Signalwege: Entsprechend des Bindens des TNF α an TNF-R1 oder TNF-R2 werden Signalwege angeschaltet, die zur Apoptose bzw. zum Überleben der Zelle führen können. (sTNF α : lösliches TNF α , tmTNF α : membrangebundenes TNF α , TRADD: „TNF-receptor-associated death domain“, FADD: „Fas-associated death domain protein“, RIP: „receptor interacting protein“, IKK: Inhibitor der κ B Kinase, NF κ B: „nuclear factor κ B“, TRAF2: „TNF receptor associated factor 2“, TAK: TGF β -aktivierte Kinase, MKK: Mitogenaktivierte Kinase Kinase, MAPK: Mitogenaktivierte Proteinkinase, MEKK: Mitogenaktivierte Kinase Kinase Kinase, JNK: Jun-N-terminal Kinase, AP1: Aktivatorprotein 1).

Vermittelt durch die Signalwege distal der $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptoren kann das $\text{TNF}\alpha$ an unterschiedlichen Zielorten verschiedene biologische Wirkungen, wie z.B. die Ausschüttung weiterer Zytokine, die Expression von Adhäsionsmolekülen oder die Freisetzung prokoagulatorischer Faktoren, ausüben (Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht über die biologische Wirkungen von $\text{TNF}\alpha$ (25-27).

Wirkort	Biologische Aktivität
Monozyten	Sekretion von $\text{TNF}\alpha$, Interleukin 1, Interleukin 6
B Zellen	Antikörperproduktion
T Zellen	Freisetzung von Interleukin 2 und 8, Interferon- γ und anderen Zytokinen
Endothelzellen	Expression von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, Gerinnungsfaktoren, Induktion der Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)
Osteoklasten	im Zusammenspiel mit Interleukin 1 \rightarrow Knochenresorption
Osteoblasten	Inhibierung der Osteoblastendifferenzierung
Myozyten	Proteolyse
Fibroblasten	Aktivierung von Kollagenase, Interferon- γ
Adipozyten	Hemmung der Lipoproteinlipase
Leber	Induktion von Akutphaseproteinen
Gehirn	Fieber, Schlaf

1.2 TNF α als Krankheitsmodulator

Als zentraler Mediator im Entzündungsgeschehen interagiert TNF α gemeinsam mit den Interleukinen 1 α und 1 β sowie Interferon- γ mit einer Vielzahl von Zellen des Immunsystems. TNF α wird als ein Schlüsselfaktor in der Pathogenese von komplexen Erkrankungen, wie Tumorerkrankungen, neurologische Erkrankungen, kardiovaskuläre Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen sowie metabolischen Erkrankungen betrachtet (Abbildung 4 (24, 25)).

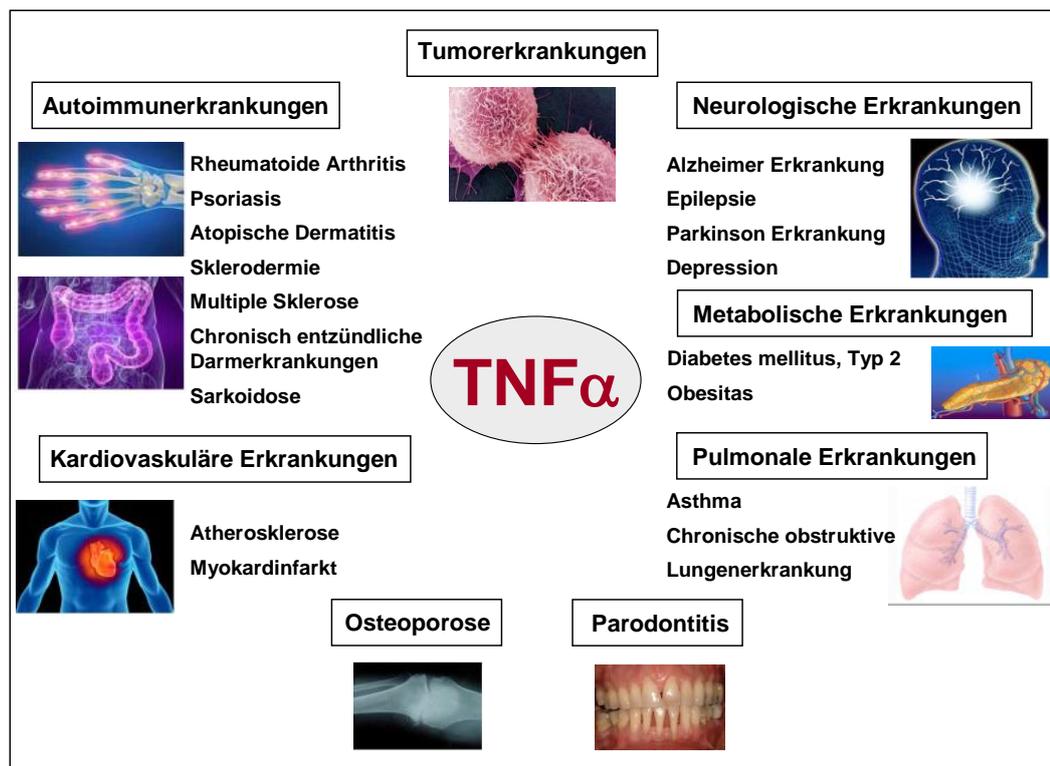


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Auswahl durch TNF α beeinflussten Erkrankungen.

nach: www.prof-sandler.com/tl_files/gallerie/Tumorzelle,

www.implantdentist.co.nz/assets//Recession

www.planet-wissen.de/alltag_gesundheit/krankheiten/diabetes

1.3 TNF α und Parodontitis

1.3.1 Parodontitis als entzündliche Erkrankung

Parodontitis wird als chronische infektiös entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates beschrieben. Als Auslöser wird die mikrobielle Plaque betrachtet. Jedoch führt diese erst im Zusammenspiel mit der wirtsspezifischen lokalen Immunantwort zur Manifestation der Erkrankung (28, 29). Die Progression der Parodontitis ist durch eine Entgleisung der Gewebshomöostase gekennzeichnet, die zum Abbau der Bindegewebsmatrix und zur Resorption des Alveolarknochens führt (Abbildung 5).

Bedingt durch bakterielle Peptide, wie Lipopolysaccharide (LPS) und N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (FLMP) und vermittelt durch das wirtseigene Komplementsystem (vor allem C5a) werden polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNs) zum Ort des entzündlichen Geschehens gelockt. Diese setzen Entzündungsmediatoren wie Leukotriene (Leukotrien B₄: LTB₄), Prostaglandine (Prostaglandin E₂: PGE₂) und bioaktive Lipide (Plättchenaktivierender Faktor: PAF) frei. Monozyten und aktivierte Makrophagen sezernieren ebenfalls Zytokine, Chemokine und bioaktive Lipide, die die weiteren Abbauprozesse befördern.

Von PMNs und gingivalen Fibroblasten sezernierte Proteasen, insbesondere Matrixmetalloproteasen (MMPs), greifen die extrazelluläre Matrix an und tragen durch Kollagenabbau zum Remodelling des parodontalen Gewebes bei (30). Die Wirkung der MMPs unterliegt einer hoch sensiblen Regulation durch spezifische Gewebeinhibitoren der MMPs (TIMPs) (31). In der Pathogenese der Parodontitis kann eine Imbalance zwischen MMP (hohe Expression) und TIMP (geringe Expression) vorliegen (32, 33). Dadurch kommt es zum verstärkten Abbau der extrazellulären Matrix und damit zur weiteren Destruktion des parodontalen Bindegewebes.

Für die Resorption des Alveolarknochens scheint darüber hinaus das Zusammenspiel von knochenabbauenden (vermittelt durch Osteoklasten) und -aufbauenden (vermittelt durch Osteoblasten) Prozessen von Bedeutung zu sein (29). Der Schlüsselregulator der Osteoklastenaktivierung ist der Rezeptor-Aktivator des nukleären Faktors κ B (RANK) und dessen Ligand (RANKL). RANK wird von Präosteoklasten exprimiert, die durch Binden des Liganden RANKL zu aktivierten Osteoklasten differenzieren (34). Als Regulator dieses Prozesses fungiert Osteoprotegerin (OPG), das als löslicher Rezeptor ebenfalls RANKL binden und abbauen kann. Für die erhöhte osteolytische Aktivität beim Voranschreiten parodontaler Veränderungen ist die Imbalance zwischen Expression von RANKL und OPG von entscheidender Bedeutung (35, 36). Kajija et al. belegten im Zellmodell, dass ein

erhöhter RANKL/OPG-Quotient zu einer verstärkten Osteoklastenaktivierung und damit zu einer erhöhten Knochenresorption führt (37).

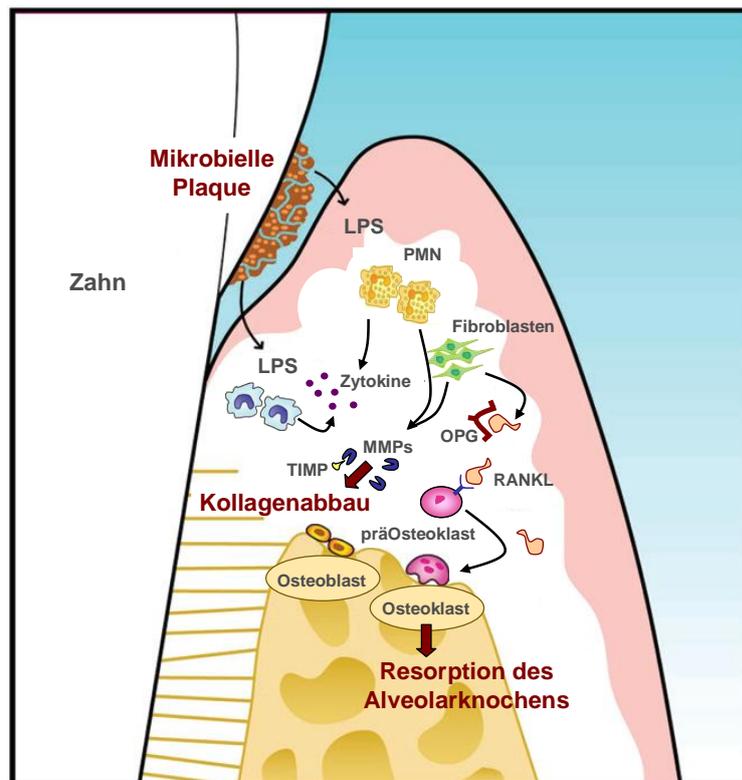


Abbildung 5: Schematische Darstellung der zellulären und molekularen Prozesse, die unter Einbeziehung der wirtsspezifischen Immunantwort die Progression der Parodontitis befördern. (LPS: bakterielle Lipopolysaccharide, PMNs: polymorphkernige neutrophile Granulozyten, MMPs: Matrixmetalloproteasen, TIMPs: Gewebeinhibitoren der MMPs, RANKL: Ligand des Rezeptor-Aktivators des nukleären Faktors κ B, OPG: Osteoprotegerin), adaptiert nach <http://www.dimensionsofdentalhygiene.com/ddhright.aspx?id=4466>

1.3.2 Die Bedeutung des $TNF\alpha$ in der Pathogenese der Parodontitis

Dem proinflammatorischen $TNF\alpha$ kommt im Rahmen des parodontalen Entzündungsgeschehens eine wichtige Bedeutung bei. In Tierexperimenten an Ratten und Primaten wurde klar belegt, dass $TNF\alpha$ eine zentrale Rolle sowohl beim Verlust des parodontalen Bindegewebsattachments als auch bei der Resorption des Alveolarknochens spielt (28, 38).

Eine erhöhte Expression des $TNF\alpha$ wurde in der Sulkusflüssigkeit und im parodontalen Gewebe von Parodontitispatienten nachgewiesen (39-42). Ebenso zeigten Duarte et al. in einer klinischen Studie an Patienten mit Periimplantitis, dass der $TNF\alpha$ -Spiegel von der Schwere der parodontalen Erkrankung abhängig ist (43).

$TNF\alpha$ wird im Parodont durch aktivierte Makrophagen, PMNs, und Fibroblasten sezerniert. Der Tumornekrosefaktor induziert die Expression von endothelialen

Adhäsionsmolekülen. Dies befördert die lokale Aktivierung des Gefäßendothels und die Infiltration weiterer Immunzellen (44). Darüber hinaus werden, vermittelt durch $\text{TNF}\alpha$, Granulozyten aktiviert und dadurch ihre phagozytische und sekretorische Funktion erhöht (44). $\text{TNF}\alpha$ stimuliert eine Vielzahl von Zellen zur Expression weiterer proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β und IL-6, die zur Aufrechterhaltung des entzündlichen parodontalen Geschehens beitragen (28, 29, 45). Des Weiteren wurde $\text{TNF}\alpha$ als ein Aktivator von MMPs charakterisiert, die eine wichtige Rolle beim Abbau des parodontalen Bindegewebes spielen (46). $\text{TNF}\alpha$ befördert auch die Expression von RANK und RANKL, denen eine entscheidende Bedeutung bei der Resorption des Alveolarknochens beigemessen wird. Im Tierexperiment wurde gezeigt, dass das Knockout des TNF-R1 zu einer signifikanten Verringerung sowohl von MMPs als auch von RANKL führt. Damit verbunden war ein geringerer Verlust des Alveolarknochens verglichen mit Tieren (Ratten) ohne TNF-R1 Knockout (47). Darüber hinaus wirkt $\text{TNF}\alpha$ in Synergie mit RANKL auch direkt auf die Präosteoklasten ein und fördert damit die Osteoklastogenese (48, 49).

1.4 $\text{TNF}\alpha$ und koronare Herzerkrankung

1.4.1 Die Rolle inflammatorischer Prozesse bei koronaren Herzerkrankungen

Die vaskuläre Entzündung steht im Mittelpunkt des heutigen Verständnisses der Pathogenese der koronaren Herzerkrankung (50-52). Inflammatorische Prozesse tragen zur Entstehung, Progression und Instabilität von atherosklerotischen Plaques bei, die häufig Auslöser von koronaren Herzerkrankungen sind. Jedoch sind die Schritte, die zur Ausbildung der ersten Anzeichen einer atherosklerotischen Plaque, den sogenannten „Fatty Streaks“, führen bisher nicht vollständig verstanden. Seit langem wird bereits die verstärkte endotheliale Expression von Zelladhäsionsmolekülen (VCAM-1, ICAM) als frühes Zeichen einer veränderten immunologischen Situation in der Gefäßwand angesehen (53, 54). Das Zelladhäsionsmolekül VCAM-1 wird verstärkt an Stellen exprimiert, die rheologischen Besonderheiten, dem Einwandern von oxidiertem oder enzymatisch verändertem Lipiden und/oder dem lokalen Einwirken von immunologischen Faktoren unterliegen (55-57). Vermittelt durch Chemokine und Zytokine binden Monozyten und T-Zellen an VCAM-1 und wandern in die Intima ein (58, 59). Die Monozyten differenzieren zu Makrophagen, die eine Vielzahl von Rezeptoren, einschließlich „Scavenger“ Rezeptoren exprimieren. Durch die Akkumulation veränderter Lipide und deren Internalisierung über die „Scavenger“ Rezeptoren bilden sich Schaumzellen aus (60). Währenddessen werden T-Zellen aktiviert, die

Interferon- γ als zentralen inflammatorischen Mediator produzieren. Vermittelt durch Interferon- γ werden proinflammatorische Zytokine, wie TNF α , Interleukin 6 und Interleukin 1 α,β exprimiert, die das Fortschreiten des inflammatorischen Prozesses begünstigen. Interferon- γ spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle beim Rekrutieren weiterer Makrophagen und T-Lymphozyten, unterstützt die Lipidaufnahme durch die Makrophagen und begünstigt somit die Bildung von Schaumzellen (61). Weitere durch Interferon- γ beförderte Prozesse greifen in die Kollagensynthese und in die Proliferation bzw. Infiltration der glatten Muskelzellen in die Plaque ein und unterstützen den Fortgang der atherosklerotischen Veränderungen (62-64).

Von den T-Zellen und den aktivierten Makrophagen ausgeschüttete Faktoren reduzieren die Stabilität der atherosklerotischen Plaque und induzieren Proteasen, die die extrazelluläre Matrix degradieren. Darüber hinaus produzieren diese Zellen prothrombotische und prokoagulante Faktoren, die direkt die Thrombusbildung befördern können (65, 66). In Abbildung 6 sind die Wege, die zur Entwicklung der atherosklerotischen Plaque beitragen, schematisch dargestellt.

Aus den Erkenntnissen der klinischen Forschung lässt sich resümieren, dass Entzündungsprozesse sowohl die Manifestation, die Progression und letztendlich auch die Prognose der koronaren Herzerkrankung beeinflussen dürften.

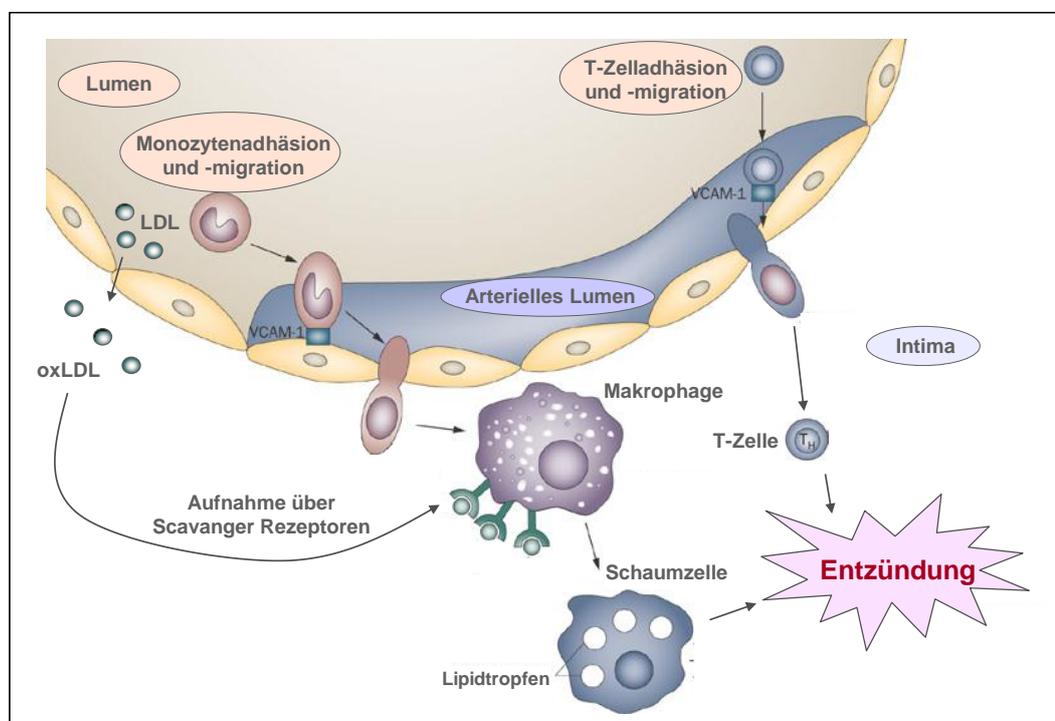


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Entwicklung einer atherosklerotischen Plaque. adaptiert nach Szekanecz et al., 2009 (67).

1.4.2 Die Wirkung des $\text{TNF}\alpha$ in der Pathogenese koronarer Herzerkrankungen
Proinflammatorische Zytokine, wie z.B. $\text{TNF}\alpha$, spielen eine ursächliche Rolle bei der Entstehung und dem Voranschreiten von koronaren Herzerkrankungen.

$\text{TNF}\alpha$ wird von Zellen exprimiert, denen eine wichtige Bedeutung bei der Initiation der koronaren Entzündungsreaktion beigemessen wird. Darüber hinaus wird $\text{TNF}\alpha$ aber auch von den kardialen Myozyten selbst sezerniert (68). Die $\text{TNF}\alpha$ -Produktion wird als Antwort auf verschiedene pathophysiologische Veränderungen am Herzen, wie z.B. Myokardinfarkt (69), stabile und instabile Angina pectoris (70), Herzinsuffizienz (71) oder durch myokardiale Reperfusionsschäden (68) bzw. kardiopulmonale Bypass-Operationen (68) aktiviert. Im Verlauf einer Herzinsuffizienz können verschiedene Prozesse die Bildung und die Sekretion von $\text{TNF}\alpha$ fördern (72). Dazu zählen u.a. eine Hypoxie (73), die Stimulation von β -adrenergen Rezeptoren (74), eine Laktatazidose (75) oder die Komplementaktivierung (76). Diese Ergebnisse deuten auf eine krankheitsassoziierte Erhöhung der $\text{TNF}\alpha$ -Expression hin. Im Einklang dazu wurde im Tierexperiment gezeigt, dass $\text{TNF}\alpha$ -Knockout Mäuse vor Ischämie und Reperfusionsschäden geschützt sind (77). Demgegenüber wurde in anderen Studien an $\text{TNF}\alpha$ -Knockout Mäusen kein Zusammenhang zwischen Infarktgröße und $\text{TNF}\alpha$ -Verfügbarkeit gezeigt (78-80). Jedoch resultierte im Tierversuch die Gabe von $\text{TNF}\alpha$ -Antikörpern bei Ratten und Kaninchen in der Reduktion der Infarktgröße bzw. in einer Verbesserung nach Ischämie (81, 82). Paradoxe Weise führten jedoch Versuche $\text{TNF}\alpha$ bei Patienten mit Herzinsuffizienz zu neutralisieren zu einer Verschlechterung des Krankheitsbildes (83).

Diese recht widersprüchlichen Ergebnisse könnten zum einen durch unterschiedliches Bindungsverhalten an die beiden Rezeptoren und die damit verbundene Aktivierung differenter Signalwege zu erklären sein. In verschiedenen Studien wurde für den $\text{TNF}\alpha$ -R1 eine kardiotoxische und für den $\text{TNF}\alpha$ -R2 eine kardioprotektive Wirkung postuliert (80, 84, 85). Eine *in vitro* Studie an Mausherzen belegte, dass $\text{TNF}\alpha$ über $\text{TNF}\alpha$ -R1 die kontraktile Dysfunktion unterstützt. Im Einklang dazu wurde durch Knockout des $\text{TNF}\alpha$ -R1 eine kardioprotektive Wirkung des $\text{TNF}\alpha$ nachgewiesen (86). Darüber hinaus wurde im Tierexperiment gezeigt, dass die Aktivierung von $\text{TNF}\alpha$ -R2 den kardioprotektiven Effekt des $\text{TNF}\alpha$ verstärkt (87). Über den SAFE („survivor activating factor enhancement“)-Signaltransduktionsweg werden nach Binden von $\text{TNF}\alpha$ an $\text{TNF}\alpha$ -R2 die Januskinase und der Transkriptionsfaktor STAT3 („signal transducer and activator of transcription 3“) aktiviert und die Transkription sowohl im Nukleus als auch im

Mitochondrium angeschaltet. Über einen negativen Feedbackmechanismus vermittelt durch SOCS3 („suppressor of cytokine signalling“) wird dieser Signalweg kontrolliert (88-90) (Abbildung 7). In Knockout-Experimenten wurde gezeigt, dass die moderate Aktivierung des SAFE-Signalweges für die kardioprotektive Wirkung von entscheidender Bedeutung ist (79, 91). Eine extensive Stimulierung des Signalweges jedoch übt einen schädigenden Einfluss aus.

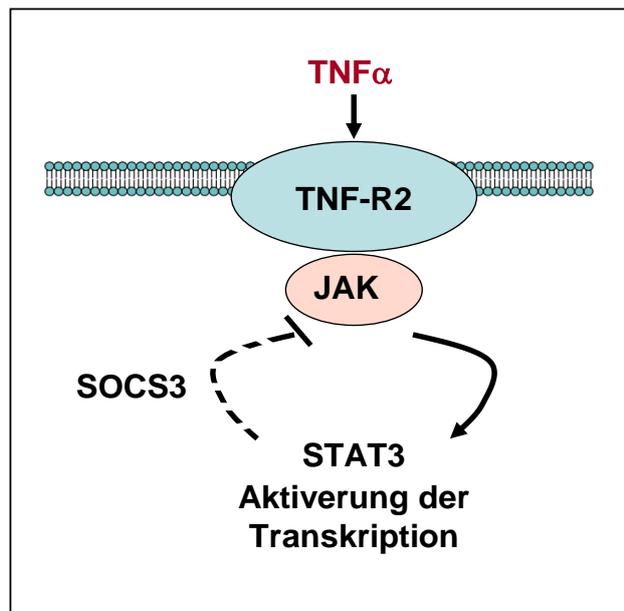


Abbildung 7: Schematische Darstellung des „Survivor activating factor enhancement“ (SAFE) Signaltransduktionsweg im Herzen. (JAK: Januskinase, STAT3: „signal transducer and activator of transcription 3“, SOCS3: „suppressor of cytokine signalling“). adaptiert nach Lecour et al., 2009 (89).

Im Einklang dazu könnte die TNF α -Konzentration ausschlaggebend für dessen Wirkung sein (89). Es wird vermutet, dass in geringen Konzentrationen (0,5ng/ml, *in vitro*) TNF α als Signalmolekül wirkt, wohingegen hohe Konzentrationen an TNF α zu irreversibler Zellschädigung (10-20ng/ml, *in vitro*) führen können (84). Im Tierexperiment wurde gezeigt, dass ausschließlich geringe TNF α -Mengen (Gabe von 0,1 μ g TNF α je kg Körpergewicht der Ratte) die Infarktschwere verringern (92). Hoch konzentrierte Anti-TNF α Gaben könnten zur nahezu vollständigen Suppression von zirkulierendem TNF α führen. Dadurch würde möglicherweise die kardioprotektive Wirkung von geringen TNF α -Mengen unterbunden.

Diese Überlegungen könnten zum Teil erklären, warum die Anti-TNF α -Therapien bei Herzinsuffizienz kontroverse Resultate zeigten. In einer kleinen randomisierten klinischen Studie wurde bei einmaliger intravenöser Gabe des TNF α -Inhibitors Etanercept bei Patienten mit Herzinsuffizienzklasse NYHA III (NYHA: „New York Heart Association“) eine Verbesserung der Lebensqualität verzeichnet (93). Jedoch

sind die Ergebnisse dieser Studie als vorläufig zu betrachten, da in jede der 3 Gruppen (Gabe von 1, 4, bzw. 10 mg/m² Etanercept) nur jeweils 6 Patienten eingeschlossen wurden. Im Gegensatz zu dieser vorklinischen Studie wurde in groß angelegten, randomisierten plazebokontrollierten Studien (RENEWEL, RENAISSANCE, RECOVER) bei Gabe von Etanercept keine kardioprotektive Wirkung bei Patienten mit NYHA II-IV gezeigt (94).

1.5 Wechselwirkungen zwischen parodontalen und kardiovaskulären Erkrankungen – mögliche Implikation des TNF α

1.5.1 Klinische Studien

Bereits seit dem Altertum werden Zusammenhänge zwischen entzündlichen Prozessen in der Mundhöhle und weiteren systemischen Erkrankungen vermutet. Bis heute ist diese Fragestellung aktuell (95). In den späten 80er Jahren des 20. Jahrhunderts begann man Studien durchzuführen, in denen die möglichen Auswirkungen oraler Infektionen auf kardiovaskuläre Erkrankungen systematisch untersucht wurden (96). Eine Vielzahl von klinischen Assoziationsstudien wurde durchgeführt, deren Ziel es war, die Bedeutung von parodontalen Entzündungen für das Risiko und die Prognose von koronaren Herzerkrankungen aufzuklären. Diese Studien belegten ein statistisch signifikantes jedoch nur moderat erhöhtes relatives Risiko für Parodontitispatienten auch kardiovaskulär zu erkranken (97, 98). Humphrey et al. zeigten in ihrer Metaanalyse, dass diese in einer Größenordnung von 1,24- (95% Konfidenzintervall: 1,01-1,51) bis 1,34fache (95% Konfidenzintervall: 1,01-1,51) liegt (99). In einer weiteren Metaanalyse ermittelten Janket et al. ebenfalls unter Patienten mit Parodontitis nur ein gering erhöhtes Risiko (1,19; 95% Konfidenzintervall: 1,08-1,32) für kardiovaskuläre Ereignisse. (100).

In weiteren Studien wurde die Bedeutung der subgingivalen bakteriellen Besiedlung für Koronarereignisse untersucht. In diesen Studien wurden positive Assoziationen zwischen dem Vorkommen an parodontopathogenen Bakterien und kardiovaskulären Erkrankungen nachgewiesen (101-104).

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen dieser Studien vermuten, dass die Parodontitis einen möglichen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellt.

1.5.2 Biologische Plausibilität des postulierten Zusammenhangs zwischen Parodontitiden und kardiovaskulären Erkrankungen

Als primärer ätiologischer Faktor für Parodontitiden wird die bakterielle Infektion über die mikrobielle Plaque angesehen. Das Einwandern der oralen Bakterien in den Blutstrom wird als zentrales Ereignis zur Erklärung der Assoziation zwischen Parodontitis und kardiovaskulären Erkrankungen betrachtet (105). In klinischen Studien wurde bereits das Vorkommen von DNA, die von oralen Bakterien stammte, in atherosklerotischen Plaques gezeigt (106-108). Darüber hinaus wiesen Padilla et al. bei Parodontitispatienten korrespondierende Befunde sowohl in atherosklerotischen Plaques als auch im subgingivalen Biofilm nach anaerober Kultivierung und anschließender PCR hinsichtlich *A.actinomycescomitans* nach (109). Ebenso gelang es Kozarov et al. lebensfähige *A.actinomycescomitans* und *P.gingivalis* Spezies in atheromatösen Plaques von Parodontitispatienten zu isolieren (110). Es ist jedoch bisher ungeklärt, ob das Vorhandensein der parodontopathogenen Bakterien zur Progression der Atherosklerose beiträgt, oder ob es sich um einen Zufallsbefund handelt. Einige *in vitro*-Daten untermauern die These der direkten Beteiligung von parodontalen Bakterien an der Progression von kardiovaskulären Erkrankungen. Es wurde z.B. im Zellmodell gezeigt, dass *P.gingivalis* Stämme in Anwesenheit von LDL deren Aufnahme durch Makrophagen induzieren und somit die Schaumzellbildung triggern (111). *P.gingivalis* wurde als Auslöser von proatherogenen und proinflammatorischen Prozesse beschrieben (112, 113).

Es wird vermutet, dass eine transiente Bakteriämie hervorgerufen durch Mikroverletzungen, direkt zum Eindringen von parodontopathogenen Bakterien in vaskuläre Endothelzellen führen kann. *In-vitro*-Untersuchungen belegen, dass einige *P.gingivalis* Stämme in der Lage sind ins Endothel der Aorta einzudringen und dort zu persistieren (114, 115). Dies könnte zur Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion, einem Schlüsselereignis in der Manifestation und Progression von kardiovaskulären Erkrankungen, beitragen. Die endotheliale Dysfunktion wird assoziiert mit erhöhten prokoagulant Eigenschaften, mit der Adhäsion von mononukleären Zellen und mit verstärkter Expression von Adhäsionsmolekülen, proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen.

Darüber hinaus könnten parodontopathogene Bakterien auch mit Thrombozyten interagieren, die eine wichtige Rolle bei der Immunantwort spielen. Die Thrombozyten könnten zum einen durch Auslösen der Immunantwort oder durch direktes Binden der Bakterien aktiviert werden. Zum anderen könnten parodontopathogene Bakterien Botenstoffe sezernieren, die zur Thrombozytenaktivierung führen (116).

In vitro wurde gezeigt, dass *P.gingivalis* Stämme die Thrombozytenaggregation über TLR2-abhängige Signaltransduktionswege induzieren (98, 117). Die Thrombozytenaktivierung kann zur Pathogenese von atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen sowohl durch Thrombusbildung als auch durch verstärkte Expression von inflammatorischen Zytokinen beitragen (118).

1.5.3 Systemische Inflammation als Schnittstelle zwischen Parodontitis und kardiovaskulären Erkrankungen - Bedeutung des $\text{TNF}\alpha$

Sowohl bei parodontalen als auch bei kardiovaskulären Erkrankungen spielt die Entzündung eine wichtige Rolle bei der Manifestation und Progression der Erkrankung. In diesem Sinne wird vermutet, dass inflammatorische Mediatoren, die im Verlauf der Parodontitis produziert werden, sich systemisch auf das Fortschreiten von weiteren entzündlichen Erkrankungen auswirken können. Eine Vielzahl von Studien belegte, dass Patienten mit schwerer Parodontitis erhöhte Spiegel systemischer Entzündungsmarker (z.B. IL-6, C-reaktives Protein (CRP), $\text{TNF}\alpha$) aufweisen (40, 119-121). In epidemiologischen Studien wurde gezeigt, dass das kardiovaskuläre Risiko mit erhöhten Spiegeln an Zytokinen, wie IL-1, IL-6, $\text{TNF}\alpha$, und Akutphaseproteinen, wie dem CRP, assoziiert ist (122, 123).

Auch könnte die Freisetzung parodontaler Bakterien und/oder bakterielle LPS in die Zirkulation die systemische Entzündungsantwort unterstützen. Neben der Aktivierung von Entzündungszellen könnte LPS auch die Progression der Atherosklerose durch Erhöhung des oxidativen Stresses und durch Beeinflussung des Lipidmetabolismus vorantreiben (124).

Zur Abklärung der Bedeutung von Parodontitis auf die Expression von systemischen Entzündungsmarkern und die Herzgesundheit wurden parodontale Interventionsstudien durchgeführt. Als Kurzzeitwirkung der parodontalen Therapie (bis zu einer Woche nach Therapie) wurde eine Erhöhung der systemischen Immunantwort verbunden mit einer endothelialen Dysfunktion gezeigt (125-127). In Langzeituntersuchungen wurde jedoch eine Verbesserung der endothelialen Dysfunktion nachgewiesen (127, 128). Die Langzeitdaten bezüglich der systemischen Entzündungsmarker hingegen sind kontrovers. In klinischen Studien an Patienten mit schwerer und/oder generalisierter Parodontitis wurde nach Parodontaltherapie eine Verringerung der Expression der Entzündungsmarker $\text{TNF}\alpha$ und IL-17 (129) bzw. CRP und IL-6 (130) nachgewiesen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der These, dass eine Erhöhung der Inflammationslast bei kardiovaskulären Erkrankungen durch parodontale Entzündungen hervorgerufen sein könnte. In anderen klinischen Studien wurde jedoch bei Patienten mit

chronischer Parodontitis keine Reduktion von $\text{TNF}\alpha$ und IL-6 gezeigt (131). Als eine mögliche Grundlage für das unterschiedliche Ansprechen der Patienten auf die Parodontaltherapie werden genetische Besonderheiten diskutiert. So wurde für SNPs im $\text{TNF}\alpha$ - als auch im IL-1- und IL-6-Gen gezeigt, dass die Möglichkeit eines Individuums einen Vorteil aus der Parodontaltherapie zu ziehen, u.a. abhängig von der individuellen genetischen Ausstattung ist (132).

1.6 Genpolymorphismen in der Ätiologie multifaktorieller Erkrankungen

Die Ätiologie multifaktorieller Erkrankungen, zu denen entzündliche Parodontitiden und auch kardiovaskuläre Erkrankungen zählen, ist durch das individuell unterschiedlich gewichtete, komplexe Zusammenwirken einer Vielzahl exogener und endogener Faktoren gekennzeichnet. Die Manifestation, der Verlauf und die Prognose multifaktorieller Erkrankungen werden durch den Lebensstil (z.B. Rauchen, Stress, Ernährung), Umweltfaktoren (z.B. Exposition zu Noxen) aber auch durch genetische Faktoren beeinflusst. Im Gegensatz zu monogenen Erkrankungen, bei denen ein abberantes Gen bereits zur Ausprägung der Erkrankung führt (z.B. genetische Abweichungen im Phenylalanin-Hydroxylase-Gen bei Phenylketonurie), sind multifaktorielle Erkrankungen gekennzeichnet durch eine additive Wirkung genetischer Veränderungen in einer Vielzahl von Genen. Genmutationen können je nach Lage im Genom verschiedene funktionelle Wirkungen ausüben und die Pathogenese von Erkrankungen beeinflussen (133). Durch Genmutationen können Proteine in ihrer Funktion verändert sein (z.B. Ausfall oder Austausch von Aminosäuren, Leserasterverschiebungen, Splicingmutationen). Darüber hinaus können Mutationen in regulatorisch wichtigen Genregionen, wie z.B. im Promotor, zur Erhöhung oder zur Verminderung der Transkriptionsrate des Gens und damit zu einer veränderten Verfügbarkeit des biologisch wirksamen Proteins führen. Sind von diesen funktionell wichtigen Mutationen Gene betroffen die Schlüsselpositionen im Stoffwechselgeschehen einnehmen, so können die polymorphen Veränderungen zum Entgleisen der Homöostase und zur Manifestation von Erkrankungen beitragen.

1.6.1 Bedeutung von polymorphen Besonderheiten im $\text{TNF}\alpha$ -Gen:

Funktionelle Auswirkungen von SNPs im $\text{TNF}\alpha$ -Gen

Im $\text{TNF}\alpha$ -Gen sind eine Vielzahl von polymorphen Veränderungen bekannt (siehe Abb. 1). Aufgrund der besonderen Funktion des $\text{TNF}\alpha$ bei inflammatorischen Prozessen wurde die Bedeutung von $\text{TNF}\alpha$ -Polymorphismen in Assoziation zu verschiedenen Erkrankungen mit inflammatorischer Pathogenese intensiv erforscht.

Die beiden am häufigsten untersuchten genomischen Varianten sind die Promotor-Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A. Als Grundlage einer krankheitsbezogenen Assoziation wurde deren mögliche funktionelle Auswirkung auf die TNF α -Expression diskutiert. Für beide SNPs wurden jedoch diesbezüglich kontroverse Ergebnisse erzielt ((134, 135), Tabelle 2).

Tabelle 2: Funktionelle Untersuchungen zu c.-308G>A und c.-238G>A im TNF α -Promotor (PMA: Phorbol 12-Myristat 13-Acetat, LPS: Lipopolysaccharid).

	Ergebnis	Zitation
c.-308G>A		
<i>in-vitro</i> -Studien: Transfektionsanalysen zur Bestimmung der TNF α -Promotoraktivität		
	keine allelspezifischen Unterschiede in Chloramphenicol Acetyltransferase Expression in Jurkat und Raji Zellen	(136)
	A-Allelspezifische erhöhte Expression nach PMA-Stimulation (Jurkat und U937 Zellen)	(137)
	A-Allelspezifische erhöhte Chloramphenicol Acetyltransferase Expression in humanen B-Zellen	(138)
	A-Allelspezifische erhöhte Expression nach PMA-Stimulation (U937, Jurkat, Raji Zellen)	(139)
	A-Allelspezifische erhöhte Expression in Jurkat Zellen	(140)
<i>ex-vivo</i> -Studien		
humane mononukleäre Zellen	keine genotypspezifischen Unterschiede in TNF α -mRNA Expression	(141-144)
	A-Allelspezifische erniedrigte TNF α mRNA-Expression bei rheumatoider Arthritis	(144)
	A-Allelspezifische erhöhte TNF α mRNA-Expression bei ankylosierender Spondylitis	(145)
	Stimulation mit Conca A: keine genotypspezifischen Unterschiede bei Gesunden, A-Allelspezifisch erhöhte TNF α Protein-Expression bei Lebertransplantierten	(146)
	A-Allelspezifische erhöhte TNF α Protein-Expression bei Dermatomyositis	(147)

humane Blutkulturen	keine genotypspezifische Assoziation zur TNF α Protein-Expression nach LPS-Stimulation (Gesunden, Meningitis)	(148, 149)
	A-Allelspezifische erhöhte TNF α mRNA-Expression bei Non-Hodgkin-Lymphom nach LPS-Stimulation	(150)
	A-Allelspezifische erhöhte TNF α Protein-Expression nach LPS-Stimulation	(151, 152)
Plasma	keine genotypspezifische Assoziation zur TNF α -Expression	(141, 153)
	Assoziation der TNF α -Proteinexpression zum Genotyp (chronisch entzündlicher Darmerkrankung)	(154)
c.-238G>A		
<i>in-vitro</i> -Studien: Transfektionsanalysen zur Bestimmung der TNF α -Promotoraktivität		
	keine allelspezifischen Unterschiede in Jurkat und Raji Zellen	(155)
	erniedrigte TNF α Expression bei Vorliegen des A-Allels (Raji und Jurkat Zellen)	(156)
<i>ex-vivo</i> -Studien		
humane mononukleäre Zellen	keine genotypspezifische Assoziation zur TNF α -Proteinexpression nach LPS-Stimulation	(135, 157)
	GG-Genotypspezifische Erhöhung der mRNA-Expression bei rheumatoider Arthritis	(144)
	erhöhte TNF α -mRNA Expression bei AG-Genotyp	(141)
humane Blutkulturen	keine genotypspezifische Assoziation zur TNF α -Proteinexpression nach LPS-Stimulation	(149, 158)
	genotypspezifische Assoziation zur TNF α -Proteinexpression nach LPS-Stimulation	(148)
Plasma	keine genotypspezifische Assoziation zur TNF α -Proteinexpression (Septischer Schock)	(159, 160)
	AG-Genotypspezifische Erhöhung der TNF α -Proteinexpression bei Sarkoidose	(161)

1.6.2 Die TNF α -SNPs c.-308G>A und c.-238G>A und parodontale Erkrankungen

In klinischen Assoziationsstudien wurde die Bedeutung der TNF α -Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A bei chronischer bzw. aggressiver Parodontitis intensiv untersucht (162, 163). Tabelle 3 gibt eine Übersicht über durchgeführte Fall-Kontrollstudien. Die meisten klinischen Studien belegten keine Assoziation der c.-308G>A- oder c.-238G>A -SNP zu schweren Parodontitiden. Nur in 3 Studien wurde ein Zusammenhang zwischen dem c.-308G>A Polymorphismus und aggressiver Parodontitis (türkischen Patienten (164)), adulter (heute chronische Parodontitis) (Kaukasier (165)) bzw. schwerer Parodontitis gezeigt (166). Allen Studien gemeinsam ist jedoch die geringe Fallzahl von Patienten und Kontrollen.

Tabelle 3: Fall-Kontrollstudien zur Assoziation zwischen TNF α -SNPs c.-308G>A bzw. c.-238G>A und aggressiver bzw. chronischer Parodontitis.

	ethnische Zugehörigkeit	Patienten vs. Kontrollen	Assoziation zu Parodontitis	Zitation
aggressive Parodontitis				
c.-308G>A	Kaukasier	69 vs. 52	-	(167)
	Kaukasier	51 vs. 100	-	(168)
	Asiaten	46 vs.104	-	(169)
	Türken	35 vs.85	+	(164)
c.-238G>A	Kaukasier	69 vs. 52	-	(167)
	Asiaten	46 vs.104	-	(169)
chronische Parodontitis				
c.-308G>A	Kaukasier	20 vs. 45	+	(165)
	Chinesen	65 vs. 96	+	(166)
	Kaukasier	132 vs. 114	-	(170)
	Kaukasier	81 vs. 80	-	(171)
	Kaukasier	60 vs. 39	-	(172)
	Kaukasier	57 vs. 100	-	(168)
	Kaukasier	56 vs. 90	-	(173)
	Kaukasier	51 vs. 178	-	(174)
	Kaukasier	54 vs. 52	-	(167)
	Brasilianer	74 vs. 51	-	(175)
	Japaner	64 vs. 64	-	(176)
	Gemischt	90 vs. 264	-	(177)
c.-238G>A	Kaukasier	32 vs. 32	-	(178)

	Kaukasier	54 vs. 52	-	(167)
	Japaner	64 vs. 64	-	(176)
	Gemischt	90 vs. 264	-	(177)

1.6.3 Die genetischen Varianten c.-308G>A und c.-238G>A im TNF α -Gen und deren Rolle bei koronaren Herzerkrankungen

In klinischen Studien wurden mögliche Assoziationen zwischen den Promotorpolymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A und der Manifestation bzw. Progression von koronaren Herzerkrankungen untersucht (179, 180). Seit Herrmann et al. in einer klinischen Studie für Träger des A-Allels des c.-308G>A Polymorphismus ein 1,43fach erhöhtes Myokardinfarkt-Risiko beschrieben hat (181), wurde eine Vielzahl von Studien durchgeführt, die eine mögliche genetische Assoziation dieses Polymorphismus zur koronaren Herzerkrankung belegen sollten. Allerdings waren die Ergebnisse dieser Studien hoch kontrovers. In einer von Zhang et al. (180) durchgeführten Metaanalyse wurden 9 Studien an kaukasischen Patienten mit Myokardinfarkt (Patienten: n=4336 vs. Kontrollen: n=4073) (181-189) und 10 Studien an kaukasischen Patienten mit Koronarstenose (Patienten: n=3380 vs. Kontrollen: n=2310) (183-185, 190-196) ausgewertet. Im Ergebnis dieser Metaanalyse wurde für Patienten kaukasischen Ursprungs keine genotypabhängige Assoziation sowohl zum Auftreten eines Myokardinfarktes (Odds Ratio: 1,00; 95% Konfidenzintervall: 0,86-1,17) als auch zur Koronarstenose (Odds Ratio: 1,05; 95% Konfidenzintervall: 0,87-1,26) gezeigt. Berücksichtigt man jedoch die multifaktorielle Pathogenese der Erkrankung durch Einbeziehung weiterer koronarer Risikofaktoren in die statistischen Berechnungen, so wurden 5 Studien ausgewertet für die adjustierten Odds Ratios vorlagen (Patienten: n=2125 vs. Kontrollen: n=1761) (181, 187, 188, 193, 196). Hierbei zeigte sich, dass A-Allelträger kaukasischen Ursprungs ein 1,5fach erhöhtes koronares Risiko trugen (Odds Ratio: 1,50; 95% Konfidenzintervall: 1,23-1,77). Die Studien wiesen untereinander keine signifikante Heterogenität auf ($X_4^2=2,49$, $p=0,65$).

Auch zur Klärung der Bedeutung des c.-238G>A Polymorphismus für koronare Herzerkrankung wurden klinische Studien durchgeführt. Daten der ECTIM-Studie (641 Myokardinfarkt-Patienten vs. 710 Kontrollen) belegen keinen Zusammenhang dieses Polymorphismus und dem Auftreten eines Myokardinfarktes (181). Auch in weiteren Studien wurde keine Assoziation zum Myokardinfarkt gezeigt (197, 198). Zur Schwere der koronaren Erkrankung wurde für den c.-238G>A Polymorphismus kein Zusammenhang ermittelt (190). Ebenso wurde bei Patienten mit ischämischer Herzkrankheit keine Assoziation zur genetischen Konstellation belegt (199).

2 Zielstellung

Bereits seit längerer Zeit werden Assoziationen zwischen parodontalen und kardiovaskulären Erkrankungen vermutet. Eine Vielzahl von klinischen Studien belegt die Bedeutung von entzündlichen Prozessen bei der Manifestation und Progression beider Erkrankungen. Dem proinflammatorischen Tumornekrosefaktor alpha wird im entzündlichen Geschehen eine Schlüsselposition beigemessen. Polymorphismen im Gen für $\text{TNF}\alpha$ werden als Ursache für funktionelle Expressionsunterschiede diskutiert. Sie könnten eine mögliche Schnittstelle zwischen parodontalen und kardiovaskulären Erkrankungen bilden.

1. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zunächst in funktionellen Voruntersuchungen die Bedeutung von polymorphen Veränderungen im $\text{TNF}\alpha$ -Gen (c.-863C>A, c.-857C>T, c.-308G>A, c.-238G>A, P84L, IVS3+51A>G) für dessen transkriptionale und translationale Expression zu analysieren. Für die Expressionsuntersuchungen standen Monozyten (mRNA-Expression) und Plasma (Protein-Expression) von angiografisch charakterisierten Koronarpatienten des mitteldeutschen Raums zur Verfügung (Studie A).
2. In weiteren Voruntersuchungen sollte die Bedeutung der $\text{TNF}\alpha$ -Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A, einschließlich der Genotyp-, Allel- und Haplotypfrequenzen, für das Auftreten von schweren Parodontitiden (aggressive und chronische) für Kaukasier im mitteldeutschen Raum bewertet werden (Studie B).
3. In einer Querschnittsstudie an einer weiteren Kohorte angiographisch charakterisierter Koronarpatienten des mitteldeutschen Raums sollte die Bedeutung der Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A für das Auftreten von schweren Parodontitiden untersucht werden (Studie C).
4. An diesem Untersuchungskollektiv sollten mögliche Assoziationen zwischen klinischen Markern der Parodontitis (subgingivale Keimbelastung, Plaqueindex, Sulkusblutung auf Sondierung, Sondierungstiefe und klinischer Attachmentverlust) und den $\text{TNF}\alpha$ -Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A untersucht werden.
5. In einer Longitudinaluntersuchung am selben Untersuchungskollektiv sollte die prognostische Bedeutung der genetischen Marker c.-308G>A und c.-238G>A für das Auftreten eines weiteren kardiovaskulären Ereignisses überprüft werden. Hierfür wurde ein Follow-up nach Ablauf eines Jahres durchgeführt.

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 **Patienten**

Von allen in die vorliegenden Studien eingeschlossenen Patienten wurden Einverständniserklärungen zur Einbeziehung in die jeweilige Studie und zur Durchführung von Genanalysen eingeholt. Es lagen für alle durchgeführten Untersuchungen positive Voten der Ethikkommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vor. Alle Personen waren vom gleichen ethnisch-europiden Ursprung und hatten das 18. Lebensjahr vollendet.

3.1.1 **Koronarpatienten für funktionelle Voruntersuchungen zum TNF α auf transkriptorischer und translatorischer Ebene – Studie A**

Für funktionelle Untersuchungen zum TNF α wurden 194 klinisch, biochemisch und angiographisch gut charakterisierte Patienten der Klinik für Innere Medizin III der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Prof. Dr. med. K. Werdan) eingeschlossen. Als hämodynamisch signifikant wurden Stenosen der großen epikardialen Gefäße von mehr als 70% und des linken Hauptstammes von mehr als 50% angesehen. Neben der erweiterten biochemischen (Erfassung von metabolischen und hämostaseologischen Parametern im Zentrallabor der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) und klinischen Befundung der Patienten wurden die Patienten durch ein erweitertes Diagnosespektrum charakterisiert. Dazu gehörten die detaillierte anamnestische Erfassung von familiären Risiken, Erkrankungen, externe Risikofaktoren wie z.B. Rauchen und körperliche Aktivität sowie ein Interview nach halbstandardisierten Fragebogen. In Tabelle 4 sind klinische und biochemische Besonderheiten der Koronarpatienten zusammengefasst.

Tabelle 4: Klinische und biochemische Charakterisierung der Koronarpatienten. Die Referenzwerte entsprechend den Bezugswerten des Zentrallabors der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung).

	Koronarpatienten	Referenzwerte
	(n=194)	
<i>Demographische Parameter</i>		
Alter* in Jahre (MW \pm SD)	51,5 \pm 9,1	
Geschlecht (weibl. %)	28,4	
Raucher (%)	74,4	
Body Mass Index* in kg/m ² (MW \pm SD)	27,11 \pm 3,9	< 24,9

<i>Vorerkrankungen</i>		
angiographisch gesicherte Koronarstenose (%)	49,5	
Diabetes mellitus (%)	15,1	
Hypertonie (%)	47,1	
Adipositas (%)	49	
Rheumatoide Arthritis (%)	0	
<i>Biochemische Parameter</i>		
<i>Inflammatorische Marker</i>		
C-reaktives Protein** in mg/l (MW±SD)	14,31±28,8	<5
Harnsäure männl.* in µmol/l (MW±SD)	361,6±83,1	200-420
Harnsäure weibl.* in µmol/l (MW±SD)	290,4±87,9	140-340
Leukozyten** in Gpt/l (MW±SD)	7,1±2,1	3,8-9,8
<i>Faktoren des Lipidstoffwechsels</i>		
Apo AI männl.* in g/l (MW±SD)	1,37±0,2	0,8-1,75
Apo AI weibl.* in g/l (MW±SD)	1,47±0,2	0,9-1,9
Apo B* in g/l (MW±SD)	1,22±0,3	0,8-1,4
Total-Cholesterol* in mmol/l (MW±SD)	5,7±1,2	<5,2
HDL-Cholesterol männl.* in mmol/l (MW±SD)	1,3±0,4	>0,9
HDL-Cholesterol weibl.* in mmol/l (MW±SD)	1,5±0,4	>1,1
LDL-Cholesterol* in mmol/l (MW±SD)	3,5±1,1	<3,9
Lipoprotein (a)** in g/l (MW±SD)	0,25±0,3	<0,2
Triglyzeride** in mmol/l (MW±SD)	2,01±1,7	<2,3
<i>Faktoren der Koagulation und Fibrinolyse-Balance</i>		
Plasminogen* in % (MW±SD)	118,9±25,7	75-140
Plasminogen Aktivator Inhibitor** in U/ml (MW±SD)	3,2±2,6	<3,5
Fibrinogen* in g/l (MW±SD)	3,4±0,9	1,5-4
Glukose** in mmol/l (MW±SD)	5,4±1,5	3,33-5,55

* Normalverteilung

** keine Normalverteilung

3.1.2 Parodontitispatienten und parodontitisfreie Kontrollprobanden für die Pilotstudie „Assoziation von Besonderheiten im Gen für $TNF\alpha$ und Parodontitiden“ – **Studie B**

In diese Pilotstudie wurden 167 Parodontitispatienten (schwere chronische Parodontitis: n=77, schwere aggressive Parodontitis: n=90) und 91 parodontitisfreie Kontrollprobanden der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg eingeschlossen. Ausgeschlossen wurden schwangere Probanden, Probanden mit medikamentös induzierter Gingivahyperplasie, Probanden die innerhalb der letzten 6 Monate eine systematische Parodontaltherapie oder eine Antibiotikatherapie erhielten sowie Probanden die unter chronischer Medikation mit antiinflammatorischen Medikamenten standen. Weiterhin wurden Probanden ausgeschlossen, die unter Erkrankungen litten, für die eine Assoziation zur Parodontitis bekannt ist (z.B. Diabetes mellitus, Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, HIV-Infektion, Lupus Erythematosus, Behcet-Erkrankung, Morbus Crohn, akute Infektionen in der Mundhöhle). Während der Anamnese wurden familiäre Risiken sowie die momentane Medikation und der Raucherstatus erfasst. Die klinische Untersuchung umfasste die Bestimmung des approximalen Plaqueindex (200), des prozentualen Anteils von Zähnen mit Sulkusblutung nach Sondierung sowie die Bestimmung der Mittelwerte für Sondiertiefe und klinischen Attachmentverlust, wobei nur die Maximalwerte pro Zahn nach 6-Punktmessung in die Berechnungen eingingen. Schwere chronische Parodontitis wurde diagnostiziert, wenn bei Patienten bei mindestens 30% der Zähne eine Sondiertiefe von 4mm gemessen wurde und der klinische Attachmentverlust in Assoziation zu lokalen Faktoren (mikrobiologische Zahnauflagerungen, mineralisierte supra- und subgingivale Plaque). Patienten mit schwerer aggressiver Parodontitis zeigten einen Erkrankungsbeginn vor dem 35. Lebensjahr. In einigen Fällen wurden auch Probanden eingeschlossen, die zum Untersuchungszeitpunkt älter als 35 Jahre waren, wenn aufgrund anamnestischer Angaben oder aus älteren Röntgenbildern ein aggressiver Erkrankungsverlauf wahrscheinlich war. Es wurde ein Missverhältnis zwischen lokalen Faktoren und dem Ausmaß des klinischen Attachmentverlustes diagnostiziert. Als parodontal gesund wurden Probanden eingruppiert, die ein Attachmentverlust von $\leq 3,5$ mm aufzeigten, mit Ausnahme von Pseudotaschen z.B. im oberen Molarenbereich, Attachmentverlust durch überhängende Füllungsänder oder Rezessionen durch Putztraumata. In diese Gruppe eingeschlossen wurden Probanden mit einem Mindestalter von 30 Jahren. Die Klassifikation der Patienten erfolgte in

Übereinstimmung mit den Empfehlungen von Armitage et al., 1999 (201). In Tabelle 5 sind die klinischen Besonderheiten der Patienten aufgelistet.

Tabelle 5: Klinische Charakterisierung der Studienpatienten in Abhängigkeit von der parodontalen Diagnose (CP: chronische Parodontitis, AP: aggressive Parodontitis, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung).

	Patienten mit CP (n=77)	Patienten mit AP (n=90)	Parodontitisfreie Kontrollen (n=91)
<i>Demographische Parameter</i>			
Alter in Jahre (MW \pm SD)	49,03 \pm 9,2	40,5 \pm 9,7**	46,66 \pm 11,1
Geschlecht (weibl. %)	62,3	63,3	52,7
Raucher (%)	23,7	35,6***	20,9
Familiäre Häufung * (%)	42,0***	56,8***	8,8
<i>Klinische parodontologische Parameter</i>			
Approximaler Plaqueindex (%)	55,9 \pm 30,8**	49,6 \pm 31,3	47,21 \pm 21,2
Sondierungstiefe (mm)	5,1 \pm 1,3**	5,6 \pm 1,5**	2,62 \pm 0,7
Sulkusblutung auf Sondierung (%)	69,1 \pm 27,5**	76,5 \pm 26,7**	45,85 \pm 24,1
Klinischer Attachmentverlust (mm)	5,8 \pm 1,6**	6,5 \pm 1,5**	2,97 \pm 0,8
<i>Subgingivale Besiedlung mit Parodontopathogenen</i>			
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (%)	33,8***	40,0***	17,6
<i>P. gingivalis</i> (%)	83,1***	75,6***	22,0
<i>P. intermedia</i> (%)	61,0***	58,9***	30,8
<i>T. forsythia</i> (%)	96,1***	85,6***	67,0
<i>T. denticola</i> (%)	97,4***	85,6***	61,5

* familiäre Häufigkeit der Parodontalerkrankung; nach anamnestischer Angabe, wenn Familienmitglied 1.Grades frühzeitigen Zahnverlust durch Zahnlockerung erlitt

** $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe (Normalverteilung: Statistische Auswertung mittels parametrischer Tests, keine Normalverteilung: nicht parametrische Tests)

*** $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe (Chi²-Test mit Yates Korrektur oder exakter Test nach Fisher bei erwarteten Werten ≤ 5)

3.1.3 Koronarpatienten für die Studie „Parodontitis als Risikofaktor für koronare Sekundärereignisse“ – **Studie C**

Das Einschlusskriterium für diese Studie bildete eine angiographisch nachgewiesene Koronarstenose von $\geq 50\%$ mindestens einer dominanten Herzkranzarterie. Die Koronarpatienten (n=1002) wurden von Oktober 2009 bis Februar 2011 an der Klinik für Innere Medizin III der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Prof. Dr. med. K. Werdan) untersucht. Ausgeschlossen wurden Patienten die nach Beurteilung des Prüfarztes unter Krankheiten oder Funktionsstörungen litten, die die Teilnahme an dieser klinischen Studie nicht erlaubten. Des Weiteren wurden Patienten ausgeschlossen die innerhalb der letzten 30 Tage an einer klinischen Prüfung teilgenommen hatten. Eine Antibiotika-Therapie innerhalb der letzten 3 Monate, Schwangerschaft, die Einnahme von Medikamenten, die zu Gingivahyperplasien führen (Hydantoin, Nifedipin, Cyclosporin A u.a.), parodontale Therapien innerhalb der letzten 6 Monate (subgingivales Scaling, Kürrettagen, Lappen-OPs), sowie Zahnlosigkeit führte ebenfalls zum Ausschluss aus der Studie.

Die kardiologische Untersuchung der Patienten umfasste routinemäßige Untersuchungen einschließlich Langzeit EKG, erweiterte biochemische Labordiagnostik (durchgeführt im Zentrallabor der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) und Echokardiographie. Des Weiteren gehörte dazu die detaillierte anamnestische Erfassung von familiären Risiken, Erkrankungen und externen Risikofaktoren (z.B. Rauchen) durch Interview nach halbstandardisiertem Fragebogen. Darüber hinaus wurde der Zahn- und Parodontalstatus erhoben (Tabelle 6). Die Exposition „Parodontale Erkrankung“ wurde definiert durch das Auftreten von approximalen Attachmentverlust von $\geq 3\text{mm}$ bei ≥ 2 nicht benachbarten Zähnen gemessen mit einer druckkalibrierten Sonde (DB764R Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) entsprechend den Empfehlungen von Tonetti und Claffey (202).

Im Rahmen des Follow-ups wurden alle Patienten nach Ablauf eines Jahres erneut befragt. Hierfür wurden alle Patienten mit der Bitte um Ausfüllung und Zurücksenden eines ausführlichen Fragebogens postalisch kontaktiert. Bei Patienten, bei denen keine postalische Rückantwort erfolgte, war es notwendig die Informationen telefonisch zu erfragen. Bei Versterben eines Patienten wurden die zuletzt behandelnden Hausärzte oder Kliniken bzw. die Standesämter bezüglich der Todesursache kontaktiert.

Tabelle 6: Parodontale Untersuchungen.

<p><i>Parodontale Anamnese</i></p> <p>Häufigkeit des Zähneputzens/Tag</p> <p>Häufigkeit des Zahnarztbesuches/Jahr</p> <p>Raucherstatus</p> <p>Familiäre Häufigkeit von Parodontitiden</p>
<p><i>zahnärztlicher Befund</i></p> <p>Kariesstatus</p> <p>Anzahl kariöser, gefüllter und fehlender Zähne (DMF-Index)</p>
<p>Mundhygiene</p> <p>Erfassung des Plaqueindex nach Silness und Loe (203)</p>
<p>Sulkusblutung nach Sondierung entsprechend Ainamo und Bay (204)</p> <p>4 Punktmessung, 30 sec. warten, dann messen: Anzahl der Zahnflächen mit Sulkusblutung x 100/Anzahl Zahnflächen</p>
<p>Prävalenz und Ausdehnung der Parodontitis</p> <p>Mittelwert Sondiertiefe (höchster Wert/Zahn nach 6-Punktmessung)</p> <p>Mittelwert Attachmentverlust (höchster Wert/Zahn nach 6-Punktmessung)</p> <p>Prozentuale Erfassung von Sites mit Attachmentverlust < 3mm</p> <p>Prozentuale Erfassung von Sites mit Attachmentverlust 3-5mm</p> <p>Prozentuale Erfassung von Sites mit Attachmentverlust >5mm</p> <p>Präsenz von Attachmentverlust ≥ 3mm in ≥ 2 nicht benachbarten Zähnen (sensitive Parodontitisdiagnose)</p> <p>Präsenz von Attachmentverlust ≥ 5mm in $\geq 30\%$ der Zähne (qualitative Parodontitisdiagnostik)</p>
<p>Ausschluss von anderen Ursachen für Parodontitis</p> <p>Attachmentverlust durch traumatisches Zähneputzen</p> <p>Attachmentverlust durch überhängende Kronen und Füllungen</p>
<p>Mikrobiologischer Befund</p> <p>Erfassung von Sondiertiefe und Attachmentverlust an 4 Probenentnahmestellen pro Patient (Plaqueproben aus jeweils tiefster Zahnfleischtasche jedes Quadranten gepoolt in ein Eppendorfröhrchen)</p> <p>Molekularbiologischer Nachweis von Markerkeimen für Parodontitis: <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>, <i>Porphyromonas gingivalis</i>, <i>Prevotella intermedia</i>, <i>Tannerella forsythia</i>, <i>Treponema denticola</i>, <i>Peptostreptococcus micros</i>, <i>Fusobacterium nucleatum</i>, <i>Campylobacter rectus</i>, <i>Eubacterium nodatum</i>, <i>Eikenella corrodens</i>, <i>Capnocytophaga</i> ssp.</p>

3.2 Material

3.2.1 Geräte

Tabelle 7: Verwendete Geräte.

Firmen	Geräte
AGS (Heidelberg)	UV-Transilluminator
Amersham-Pharmacia (Freiburg)	Horizontalelektrophorese Multiphor II, PVDF-Membran, UV-Spektrometer Ultrospec III, Röntgenfilm
Bender und Hobein AG (Bruchsal)	Vortex Genie2™
BD Bioscience (Heidelberg)	BD FACS-Vantage SE
Bioplex® Strehlau und Kruse GmbH (Freiburg)	Elektrophoresekammer für Agarosegele
Carl-Zeiss (Oberkochen)	Mikroskop Axioskop 20
Eppendorf (Hamburg)	Thermozykler Gradient (mit Heizdeckel)
Fein-Optik (Bad Blankenburg)	Neubauer-Zählkammer
Heidolph Instruments (Schwabach)	Schüttler Unimax 1010, Inkubator 1000
Heraeus (Hanau)	Begasungsbrutschrank, Zentrifuge Biofuge 28 RS, Zentrifuge fresco
Molecular Dynamics GmbH (Krefeld)	LASER-Densitometer
Serva (Heidelberg)	„Blue Power Quick“ (Stromversorger), „Multiple Gelcaster“,
SLT (Schweiz)	ELISA-„Reader“ EAR 400

3.2.2 Chemikalien und Enzyme

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien.

Firmen	Chemikalien
AGS (Heidelberg)	TriStar Reagent™
Aldrich (Steinheim)	Isopropanol, Magnesiumchlorid
Amersham-Pharmacia (Freiburg)	Bromphenolblau, Desoxyribonukleotide, Ethidiumbromid, RNase-Inhibitor (RNAGuard)
New England Biolabs (Schwalbach)	Restriktionsenzym <i>Ddel</i>
Biozym (Oldendorf)	Agarose
Eppendorf (Hamburg)	<i>Taq</i> -Polymerase (subgingivale Keimbe- stimmung)
Fermentas (Leon-Rot)	<i>Taq</i> -Polymerase (Haplotypbestimmung)

Gibco BRL (Eggenstein)	100-Basenpaar-Leiter, DNA-Masseleiter, NycoPrep™ 1.068
Invitek (Berlin)	Taq-Polymerase (Polymorphismus-Untersuchung)
Laborchemie Apolda GmbH (Apolda)	Giemsa-Lösung, Methanol, Salzsäure, May-Grünwald-Lösung
LKB (Bromma, Schweden)	Repelsilan
Merck (Darmstadt)	Essigsäure, Dinatrium-Hydrogenphosphat, Formaldehyd, Kaliumchlorid, Kalium-Dihydrogenphosphat, Kaliumtartrat, Kupfersulfat, Natriumazid, Natriumcarbonat, Natrium-Dihydrogenphosphat, Natrium-Hydrogenkarbonat, Natriumperchlorat, Silbernitrat, Trichloressigsäure,
Oncor Appligene (Heidelberg)	Phenol
Perkin Elmer Cop. (Norwalk, USA)	Blue Dextran
Promega GmbH (Mannheim)	AMV-Reverse-Transkriptase, Taq-Polymerase (kompetitive Untersuchungen)
Quiagen GmbH (Hilden)	QIAquick Gel Extraktion Kit, QIAamp DNA Mini Kit, QIAamp blood DNA Mini Kit
Roth (Karlsruhe)	Acrylamidlösung, Bisacrylamidlösung, Borsäure, Chloroform, Dextran 500, Ethanol, Glycerin, Natriumborhydrid, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Guanidinhydrochlorid
R&D Systems (Berlin)	Quantikine™ HS-Kit für human TNF α
Seromed Biochrom KG (Berlin)	Natriumpyruvat,
Serva (Heidelberg)	Ammoniumpersulfat, Rinderserumalbumin, 4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Glyzin, Sodiumdodecylsulfat (SDS)
Sigma (Deisenhofen)	Diazobicyclo-(2,2,2)-oktan (DABCO), Formamid, Natriumazetat, Saccharose, N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED), Xylenzanol

3.2.3 Puffer

Tabelle 9: Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung.

Puffer	Zusammensetzung
1 x PBS	0,8M Na ₂ HPO ₄ , 20mM NaH ₂ PO ₄ , 100mM NaCl
0,5 x TBE	45mM Tris-HCl, 45mM Borsäure, 0,5mM EDTA, pH 8,3
Puffer für <i>Dde</i> I	100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl ₂ , 1mM Dithiothreitol, pH 7,9
Puffer für Taq-Polymerase	
Eppendorf (Hamburg)	1,5mM MgCl ₂ , 50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8,3, 15mM Mg(OAc) ₂
Fermentas (Leon-Rot)	2mM MgCl ₂ , 20mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 75mM Tris-HCl pH 8,8, 0,01% Tween
Invitek (Berlin)	1,5mM MgCl ₂ , 16mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 50mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% Tween
Promega (Mannheim)	1,5M MgCl ₂ , 0,05% W-1, 50mM KCl, 20mM Tris-HCl pH 8,4
Puffer für Reverse Transkriptase	50mM Tris-HCl, pH 8,3 50mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 10mM Dithiothreitol, 0,5mM Spermidin

3.2.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Gibco BRL (Karlsruhe) bezogen.

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide.

	Primersequenz 5' ... 3'
Genetische Untersuchungen zum TNF α	
c.-863C>A	forward: 5' - AGC AAT GGG TAG GAG AAT GT - 3' reverse: 5' - CAG TGT GTG GCC ATA TCT TC - 3'
c.-857C>T	forward: 5' - AGC AAT GGG TAG GAG AAT GT - 3' reverse: 5' - CAG TGT GTG GCC ATA TCT TC - 3'
c.-308G>A	forward: 5' - TAT CTT TTT CCT GCA TCC TG - 3' reverse: 5' - CTG ATT TGT GTG TAG GAC CC - 3'
c.-238G>A	forward: 5' - TTG GAA AGT TGG GGA CAC AC - 3' reverse: 5' - ATC AGT CAG TGG CCC AGA AG - 3'
P84L	forward: 5' - GGT CTC AGC TTT TTC TTT TC - 3'

	reverse: 5' - CAA GTT CCA AGA CAC ATC CT - 3'
IVS3+51A>G	forward: 5' - GCT CTG AGG ATG TGT CTT GG - 3' reverse: 5' - CTC AGC GAG TCC TTC TCA CA - 3'
Kompetitive Untersuchungen zum TNF α -Gen	
RT-Primer	5' - CAA TGA TCC CAA AGT AGA CCT GCC C - 3'
Adapter-Primer	5' - AAG AAG ACA GTC CTG ATC GTG GCA GGC G - 3'
Kompetitive PCR	forward: 5' - GGC GCT CCC CAA GAA GAC AG - 3' reverse: 5' - GGC CGA TTG ATC TCA GCG CT - 3'

3.3 Methoden für funktionelle Voruntersuchungen zum TNF α auf transkriptorischer und translatorischer Ebene – Studie A

3.3.1 Genetische Untersuchungen zum TNF α

Isolation von genomischer DNA

9 ml venösen Blutes wurden mit einer EDTA-Monovette entnommen und bis zur DNA-Isolation kühl gelagert. Die DNA-Isolation erfolgte mittels des QIAamp DNA Blood Mini Kits. 200 μ l Blut wurden nach Zugabe von 20 μ l Proteinase K und 200 μ l Puffer AL 15min bei 56°C zur Lyse der Zell- und Kernmembran schüttelnd inkubiert. Nach Hinzufügen von 200 μ l Ethanol wurde die DNA durch Zentrifugation (1 min bei 8000rpm) an ein Säulchen gebunden. Danach wurde die gebundene DNA 2-mal mit Puffer AW1 und AW2 gewaschen und trocken zentrifugiert. Die DNA wurde mit 200 μ l Aqua dest. nach 5minütiger Inkubation durch Zentrifugation (1min, 13000rpm) von der Säule eluiert.

Gaben die Patienten kein Einverständnis zur Blutentnahme so wurde die DNA aus Mundschleimhaut mittels Sample Collection Swab gewonnen. Nach Abbürsten der Wangeninnenseite wurde das Swab in ein Tube mit 400 μ l 1xPBS überführt. Nach Zugabe von 20 μ l Proteinase K und 400 μ l Puffer AL wurde der Ansatz bei 56°C 15min inkubiert. Die Isolation der DNA erfolgte im Weiteren wie oben angegeben. Die so erhaltene DNA wurde mit 110 μ l Aqua dest. eluiert und die Konzentration im Spektrophotometer entsprechend der Formel:

$$C = OD_{260} * E * V$$

C - Konzentration der DNA bzw. RNA (ng/ μ l)
 OD₂₆₀ - Absorption bei 260nm
 E - Extinktionskoeffizient (DNA: 50ng/ μ l, RNA: 40ng/ μ l)
 V - Verdünnung der Messlösung

bestimmt. Die DNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Genotypisierung von polymorphen Varianten im TNF α -Gen

Grundlage für die genetischen Untersuchungen bildete die Sequenz des humanen TNF α -Gen (Genbank: Z15026). Für die Vorstudien der vorliegende Arbeit wurden in TNF α -Gen folgende Polymorphismen bestimmt: c.-863C>A (rs181370386), c.-857C>T (rs1799724), c.-308G>A (rs1800629), c.-238G>A (rs361525), P84L (rs4645843), und IVS3+51A>G (bisher nicht in Genbank erfasst) (141).

Die PCR-Reaktionen erfolgten unter Standard-Bedingungen (5min bei 95°C, 28 Zyklen: Denaturierung 30sec bei 92°C, 30sec Annealing bei Temperaturen zwischen 46°C und 51°C, Elongation 30sec bei 72°C, letzte Extension 5min bei 72°C) im Thermocycler Eppendorf Gradient mit Heizdeckel. Das Gesamtvolumen eines PCR-Ansatzes betrug jeweils 25 μ l (50ng genomische DNA, 12,5 μ l Master-Mix, 0,2 μ M forward 0,2 μ M reverse Primer (Tab. 10), Formamid in variablen Konzentrationen, siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: PCR-Bedingungen und verwendete Methode zur Genotypisierung (SSCP: „single strand conformation polymorphism“; RFLP: „restriction length polymorphism“).

Genomische Variante	Formamidgehalt	Annealing-T	Nachweismethode
c.-863C>A	5%	50°C	SSCP
c.-857C>T	5%	50°C	SSCP
c.-308G>A	3%	48°C	SSCP
c.-238G>A	4%	50°C	SSCP
P84L	1%	46°C	RFLP (<i>Ddel</i>)
IVS3+51A>G	2%	51°C	SSCP

Für die Analysen mittels „single strand conformation polymorphism“ (SSCP) wurden die PCR-Produkte mittels Ethanol ausgefällt (3 Volumen 100% Ethanol und 1/10 Volumen 3M Natriumazetat pH 4,6) und in 2 μ l Aqua dest. und 6 μ l SSCP-Auftragspuffer (95% Formamid, 20mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau) aufgenommen. Nach Probendenaturierung (5min, 95°C) wurden die Proben in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel (C=10,4%, T=3,7%, 5xTBE, 40mA, 15W, 15°C, 1,5h) aufgetrennt. Anschließend wurden die Fragmente mittels Silberfärbung visualisiert (10min Fixierlösung: 50% Methanol, 10% Essigsäure; 2x5min Waschlösung: 10% Ethanol, 0,5% Essigsäure; 10min Färbelösung: 0,1% Silbernitrat; 5-20min Entwicklerlösung: 1,5%Natriumhydroxid, 0,01% Natriumborhydrid, 0,15% Formaldehyd; 10min Stopplösung: 0,75% Dinatriumkarbonat; 20min Gelkonservierungslösung: 10% Glycerin). Im Falle eines abberanten Laufmusters

im SSCP-Gel wurden 4 unabhängige PCR-Proben nach Aufreinigung im 1% „Low-Melting-Point“-Agarosegel, Elution mittels QIAquick Gel Extraction Kits und Konzentrationsabschätzung mit Hilfe der DNA-Masseleiter zur Sequenzidentifikation eingeschickt (Sequence Laboratories Göttingen GmbH).

Der SNP P84L wurde mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *Ddel* (Erkennungssequenz: 5'...C*TNAG...3') untersucht. Hierfür wurden 25µl PCR-Ansatz mit 5U *Ddel* und 2,5µl des zum Enzym mitgelieferten 10x Puffers bei 37°C über Nacht inkubiert und im 2% Agarosegel (500ng/ml Ethidiumbromid) aufgetrennt. Die Genotypisierung wurde anhand der erhaltenen Fragmentmuster vorgenommen.

3.3.2 Funktionelle Untersuchungen auf transkriptorischer Ebene

Präparation von nativen Monozyten aus humanem EDTA-Blut

Nach der Abnahme von 9ml venösem EDTA-Blut wurden native Monozyten mit Hilfe der NycoPrep™1.068-Dichtelösung präpariert. Dazu wurde das Blut mit 1/10 Volumen 6% Dextran 500 in physiologischer Natriumchloridlösung (0,9%) gemischt und 40min bei RT inkubiert. Nach Sedimentation der Erythrozyten wurde die leukozytenreiche Plasmaschicht auf die Dichtelösung geschichtet. Nach Zentrifugation (600xg, 20°C, 15min) wurden die Monozyten abgenommen und zweimalig gewaschen (physiologischer Natriumchloridlösung, 0,13%EDTA-Na₄, 0,5%BSA). Durch dreifaches Auszählen in einer Neubauerzählkammer wurde die Zellzahl ermittelt. Die Reinheit der Monozyten wurde mittels FACS-Analyse unter Verwendung des makrophagenspezifischen Antikörpers für den Mannose Rezeptor getestet. Die Zellen wurden mit 1ml TriStar™-Reagens versetzt und in RNase-freien Tubes bei -80°C bis zur RNA-Präparation gelagert.

Isolation der RNA

Für die RNA-Isolation wurden ausschließlich RNase-freie Materialien und Reagenzien verwendet. Die in TriStar™-Reagens lysierten Zellen wurden mit 200µl Chloroform versetzt, 1min stark gemischt und 10min bei RT inkubiert. Nach Phasenseparation (12000xg, 4°C, 15min) wurde 550µl der RNA-haltigen wässrigen Oberphase abgenommen und die RNA mit 500µl Isopropanol für 15min bei 4°C ausgefällt. Die RNA wurde pelletiert (12000xg, 4°C, 10min) und zweimal mit 1ml 75% Ethanol gewaschen. Nach Trocknung der RNA im Exsikkator wurde die RNA in 100µl Aqua dest. gelöst (10min, 60°C) und die Konzentration entsprechend der im Kapitel 3.3.1.1.1 angegebenen Formel im Spektrophotometer bestimmt. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

RT-PCR zur semiquantitativen Bestimmung der TNF α -mRNA Konzentration

Mittels reverser Transkription wurde die TNF α -mRNA mit einem spezifischen antisense-Primer (Tab. 10) umgeschrieben (0,2 μ g Gesamt-RNA, 50mM Tris-HCl, pH 8,3, 50mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 0,5mM Spermidin, 2mM dNTPs, 0,5 μ M Primer, 6,25 μ l AMV-Reverse-Transkriptase, 17 U RNase-Inhibitor RNAGuard in 20 μ l Aqua dest.). Die RT-Reaktion erfolgte nach 10minütiger Inkubation bei 62°C für 1 Stunde bei 42°C. Danach wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 90°C (5 min) abgestoppt, auf 4°C abgekühlt und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Als Postitivkontrolle der RT-Reaktion wurde ein laborinterner RNA-Standard (gepoolte, auf 0,2 μ g aliquotierte RNA aus Monozyten) für jeden Ansatz mit transkribiert, der anschließend in der kompetitiven PCR quantifiziert wurde.

Mittels kompetitiver PCR wurde durch Koamplifikation einer unbekanntem Menge spezifischer TNF α -cDNA und Standard-DNA bekannter Konzentration (8 Parallelbestimmungen, Titrationsreihe). Die Standardkonstruktion erfolgte entsprechend der Methode von Celi et al. (205) und Förster et al. (206). Der PCR-Ansatz (0,2mM dNTPs, 1,5M MgCl₂, je 0,5 μ M forward und reverse Primer (Tab 10), 0,05% W-1, 50mM KCl, 20mM Tris-HCL pH 8,4, 1 μ l der transkribierten TNF α -cDNA, 1 μ l der Standard-DNA) wurde mit einem „Hotstart“ im Thermozykler gestartet. Nach dem ersten Denaturierungsschritt (95°C, 5 min) wurde jeweils 1U Taq-Polymerase (Promega) zupipettiert. Die PCR erfolgte in 27 Zyklen (Denaturierung 30 sec 92°C, Annealing 15 sec, 64°C, Extension 45 sec, 72°C, letzte Extension 10 min 72°C). Die Ergebnisse der PCR wurden nach elektrophoretischer Auftrennung im 2% Agarosegel (500ng/ml Ethidiumbromid) auf dem UV-Transilluminator dokumentiert und mit Hilfe des Laser Densitometers und Auswertesystems Image Quant™ (Molecular Dynamics GmbH) die TNF α -mRNA-Menge densitometrisch bestimmt. Hierfür wurde eine Integration der Schwärzungskurve zur Berechnung der Bandenbreite und -intensität sowohl vom Target als auch vom Standard vorgenommen. Der TNF α -mRNA-Menge wurde in Abhängigkeit der eingesetzten 8 Standardverdünnungen ermittelt.

3.3.3 Funktionelle Untersuchungen auf translatorischer Ebene

Für die Bestimmung des freien TNF α -Proteinlevels im Plasma wurde zunächst 4ml EDTA-Blut (Blutabnahme 8Uhr, nüchtern) innerhalb von 30min nach Blutabnahme abzentrifugiert (1000rpm, 4°C, 10min) und das Plasma gewonnen. Im Plasma wurde die Proteinmenge mittels Quantikine® HS Kit (R&D Systems) für humanes

TNF α am ELISA-Reader analysiert. Für jede Bestimmung wurden 7 Standardverdünnungen eingesetzt (32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5pg/ml). Für alle Proben und Standards wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. In jedes Well der ELISA-Platte wurden jeweils 50 μ l Assay Diluent HD1-11 und 200 μ l der Proben bzw. Standards gegeben. Nach Verschließen der Platte wurde diese auf dem Schüttler 3h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben 6x mit 400 μ l Waschlösung gewaschen. 200 μ l Konjugat wurden dazugegeben und es erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt für 2h bei RT auf dem Schüttler. Nach erneutem sechsmaligen Waschen wurde jeweils 50 μ l Substrat und nach einer weiteren Stunde 50 μ l Amplifier in jedes Well pipettiert. Mit 50 μ l Stopplösung wurde die Farbreaktion nach 3h abgestoppt. Die optische Dichte wurde bei 490nm (Korrektur bei 650nm oder 690nm) am ELISA-Reader gemessen. Der Mittelwert der Doppelbestimmungen wurde gebildet und der Mittelwert der Leerwerte abgezogen. Entsprechend der Standardkonzentrationen wurde der TNF α -Plasmalevel kalkuliert.

3.4 Methoden für die Pilotstudie „Assoziation von Besonderheiten des TNF α -Gens und Parodontitiden“ – Studie B

3.4.1 Nachweis parodontaler Leitkeime aus subgingivaler Plaque

Isolation der bakteriellen DNA

Aus den Zahnfleischtaschen mit der jeweils höchsten Sondiertiefe jedes Quadranten wurden subgingivale Plaqueproben mittels steriler Papierspitzen entnommen und gepoolt. Die bakterielle DNA wurde mittels QIAamp DNA Mini Kit isoliert. Hierbei wurden die Papierspitzen mit 180 μ l ATL-Puffer und 20 μ l Proteinase K für 10min bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 μ l AL-Puffer wurde der Ansatz 5min bei 95°C inkubiert. Die im Puffer gelöste DNA wurde auf eine Säule pipettiert und zweimal mit jeweils 500 μ l der Puffer AW1 und AW2 gewaschen. Abschließend wurde die bakterielle DNA in 400 μ l Elutionspuffer gelöst und bei -20 °C gelagert.

PCR und Hybridisierung

Für die Amplifikation der DNA der fünf parodontopathogenen Markerkeime (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*) wurde der micro-IDent® Test von HAIN Lifescience, Nehren, Deutschland verwendet. Der Cutt-off betrug für *A.a.* 10³ genome equivalents und für *P.g.*, *P.i.*, *T.f.* und *T.d.* 10⁴ genome equivalents. In die PCR wurden 35 μ l Mastermix (bestehend aus Puffer, biotinylierte Primer und DNA als Positivkontrolle), 2 U Taq-

Polymerase (Eppendorf) und 5µl der isolierten DNA-Lösung eingesetzt. Die PCR erfolgte im Thermocycler Eppendorf Gradient mit Heizdeckel (5min bei 95°C; 10 Zyklen: Denaturierung 30sec bei 95°C, 2min Annealing und Elongation bei 58°C; 20 Zyklen: Denaturierung 25sec bei 95°C, 40sec Annealing bei 53°C, 40sec Elongation bei 70 °C; Elongation 8min bei 70°C).

Für die Hybridisierung wurden 20µl des PCR-Produkts für 5min bei RT mit 20µl der Denaturierungslösung inkubiert. Nach Zugabe von 1ml Hybridisierungspuffer wurde ein mit bakterienspezifischen Gensonden beschichteter Membranstreifen hinzugegeben und bei 45°C für 30min im Schüttelwasserbad inkubiert. Danach wurde der Hybridisierungspuffer vollständig entfernt und die Membran mit 1ml Stringent Hybridisierungspuffer 15min bei 45°C im versetzt. Nach 2 Waschschritten (je 1ml Rinse-Lösung) wurden die Membranstreifen für 30min mit 1ml verdünntem Konjugat inkubiert. Erneut wurde gewaschen (zweimal mit je 1ml Rinse-Lösung, einmal mit 1ml Aqua dest.) und zum Membranstreifen 1ml Substratlösung hinzugegeben. Die Farbreaktion mittels alkalischer Phosphatase setzte nach ca. 3-20min ein. Durch zweimaliges kurzes Waschen mit Aqua dest. wurde die Reaktion gestoppt. Entsprechend des Auswertungsbogens erfolgte der Nachweis der Bakterien visuell. Zwei Positivkontrollen für die PCR (AC) und die Hybridisierung (CC) waren in jeder Hybridisierung enthalten.

3.4.2 Genetische Untersuchungen zum TNF α

Wie im Kapitel 3.3.1.1.1 beschrieben, erfolgte zunächst die Isolation der humanen genomischen DNA. Im Anschluss daran wurden die Haplotypen der SNPs c.-308G>A und c.-238G>A mit Hilfe des Cytokine Genotyping array CTS-PCR-SSP Tray Kit (Collaborative Transplant Study) bestimmt. Für jeden PCR-Ansatz wurden 10µl Mastermix (100ng genomische DNA, 1U Taq-Polymerase Fermentas, 5% Glycerin, zum Kit mitgelieferter PCR-Puffer) zu vorpipettierten haplotypspezifischen Primern gegeben. Als Positivkontrolle wurde ein 440bp langes DNA-Fragment des humanen C-reaktiven Proteins koamplifiziert. Die PCR erfolgte im Thermocycler Eppendorf Gradient mit Heizdeckel (2min bei 94°C, 10 Zyklen: Denaturierung 15sec bei 94°C, 1min Annealing bei 64°C, Elongation 30sec bei 72°C, 20 Zyklen: Denaturierung 15sec bei 94°C, 50sec Annealing bei 61°C, Elongation 30sec bei 72°C). Nach dem Proben-Auftrag im 2% Agarosegel (500ng/ml Ethidiumbromid) wurden die PCR-Ergebnisse visuell auf dem UV-Transilluminator ausgewertet.

3.5 Methoden für die Longitudinalstudie „Parodontitis als Risikofaktor für koronare Sekundärereignisse“ – Studie C

3.5.1 Nachweis parodontaler Leitkeime aus subgingivaler Plaque

In der Longitudinalstudie wurde die DNA von 11 parodontopathogenen Markerkeime (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. micros*, *F. nucleatum*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *E. corrodens*, *C. sputigena*, *C. gingivalis*, *C. ochracea*) nachgewiesen. Nach DNA-Isolation wurde für die DNA-Amplifikation der micro-IDent® Plus Test von HAIN Lifescience, Nehren, Deutschland verwendet. Der Cutt-off betrug für *A.a.* 10^3 genome equivalents und für alle anderen Bakterienspezies 10^4 genome equivalents. Der Nachweis der 11 Bakterien erfolgte im Labor von HAIN Lifescience, Nehren (Deutschland).

3.5.2 Genetische Untersuchungen zum $TNF\alpha$

Die Analyse der Allel-, Genotyp- und Haplotypen der $TNF\alpha$ -Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A wurde wie im Kapitel 3.3.2.2 beschrieben, durchgeführt.

3.6 Statistische Methoden

3.6.1 Statistische Auswertung der klinischen Studien

Die statistischen Untersuchungen wurden mit Hilfe des Programms SPSS für Windows Version 19.0 durchgeführt. Alle Werte $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Metrische Daten wurden mittels Kolmogorow-Smirnov-Test auf Normalverteilung und mittels Levene-Test auf Varianzhomogenität getestet. Für die Untersuchung unabhängiger Stichproben wurde bei Vorliegen der Normalverteilung der t-Test nach Students und die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Bei nicht normalverteilten Werten wurde der U-Test nach Mann-Whitney-U- und der Kruskal-Wallis-Test berechnet. Für die Analyse von bivariaten Korrelationen zwischen metrischen Größen wurden die Punkt-Moment-Korrelation nach Pearson bei Vorliegen einer Normalverteilung bzw. die Rangkorrelation nach Spearman bei Nichtvorliegen einer Normalverteilung genutzt.

Kategoriale Variablen wurden in Kontingenztabellen mit Hilfe des Chi²-Tests nach Pearson oder des exakten Tests nach Fisher (bei erwarteten Werten ≤ 5 in 2 x 2 Felder-Tafel) evaluiert. Eine Berichtigung der Werte nach Chi²-Tests wurde mit Hilfe der Yates-Korrektur (Continuity Correction) durchgeführt.

Mittels Regressionsanalysen wurde der Einfluss mehrerer Faktoren (Confounders) auf eine dichotome (binäre logistische Regression) oder auf eine metrische Variable (lineare Regression) geprüft. Die Überlebenszeitdaten wurden mit Hilfe

des Kaplan-Meier-Verfahrens und des Log-rank-Tests ausgewertet. Der Einfluss von mehreren Variablen auf die Überlebenszeit wurde mittels Cox-Regression analysiert.

3.6.2 Fallzahlplanung für die Studie „Parodontitis als Risikofaktor für koronare Sekundärereignisse“ – **Studie C**

Die Planung der Fallzahl erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Prof. Dr. J. Haerting). Als Endpunkt der Studie wurden nichttödlicher Myokardinfarkt, kardiovaskulärer Tod und Schlaganfall definiert. Grundlage für die Fallzahlplanung bildeten die Annahmen, dass der Endpunkt in 15% der Fälle eintritt (207), bei 50% der Probanden eine schwere Parodontitis vorliegt (103) und dass das Risiko für das Eintreten eines kardiovaskulären Sekundärereignis bei Probanden mit Parodontitis doppelt so hoch ist (Tabelle 12). Bei Einschluss von 800 Probanden hatte das 95%-Konfidenzintervall des Odds Ratio (erwarteter Wert: 2) eine untere Grenze von 1,4. Somit wurde eine hinreichend genaue Schätzung des Effektes gewährleistet. Aufgrund einer erwarteten Drop-Out Rate von etwa 20% wurden 960 Probanden in die Studie eingeschlossen.

Tabelle 12: Grundlagen der Fallzahlplanung: Vierfeldertafel mit relativen Häufigkeiten.

		Endpunkt eingetreten		
		Ja	Nein	
Parodontale Erkrankung	Ja	10%	40%	50%
	Nein	5%	45%	50%
		15%	85%	100%

4 Ergebnisse

Der Studie „Parodontitis als Risikofaktor für koronare Ereignisse“ wurden funktionelle Analysen vorangestellt. Hierbei wurde die Bedeutung von genomischen Varianten im $TNF\alpha$ -Gen auf die mRNA- und Proteinexpression des $TNF\alpha$ in nativen Monozyten bzw. im Plasma geprüft. Weiterhin wurden mögliche Korrelationen zwischen der $TNF\alpha$ -Expression und demographischen, klinischen und biochemischen Risikofaktoren untersucht (Studie A).

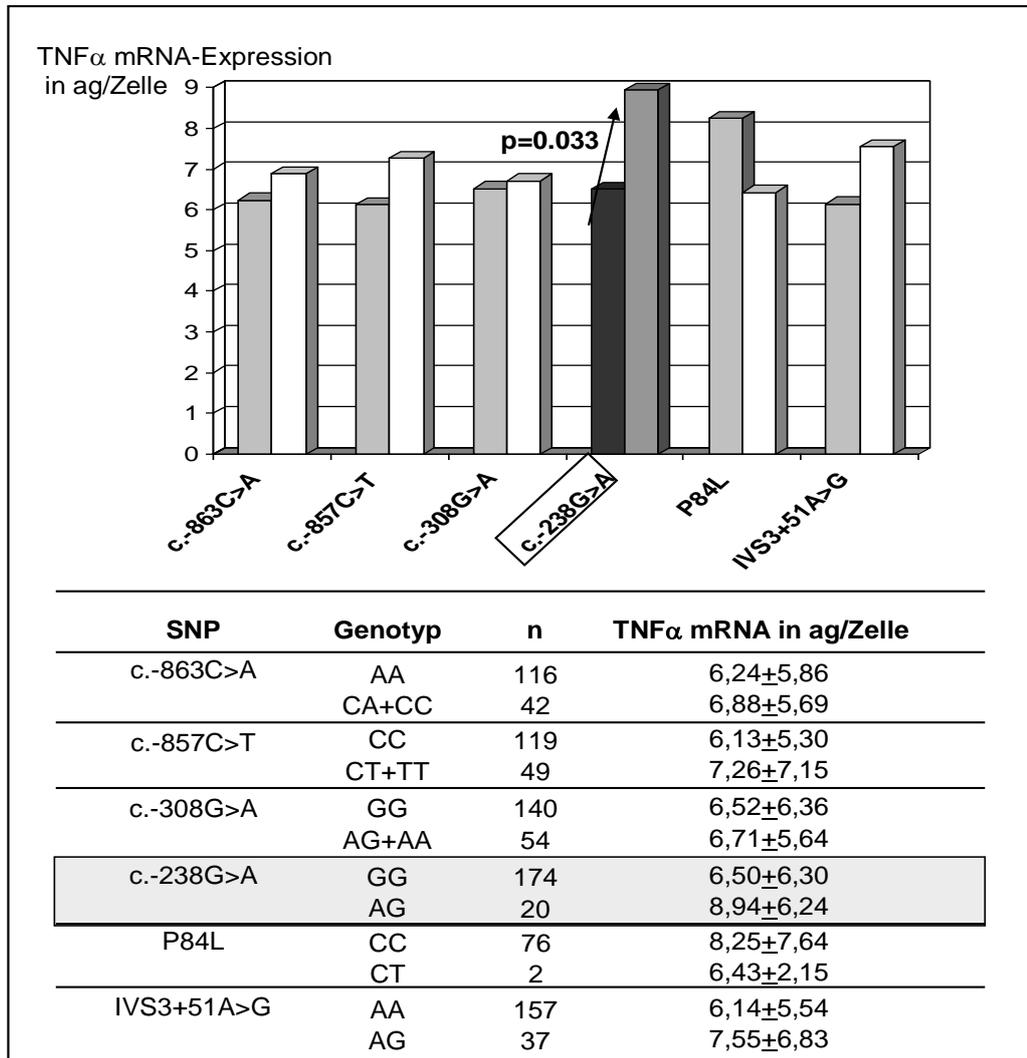
Des Weiteren wurde eine Pilotstudie konzipiert deren Ziel darin bestand die Rolle von genetischen Veränderungen im $TNF\alpha$ -Gen bei der Ausprägung einer schweren chronischen oder schweren aggressiven Parodontitis sowie weiteren parodontalen Risikofaktoren zu analysieren (Studie B).

4.1 Funktionelle Voruntersuchungen zum $TNF\alpha$ auf transkriptorischer und translatorischer Ebene – Studie A

Für die funktionellen Voruntersuchungen standen 194 biochemisch und klinisch gut charakterisierte Patienten mit angiographisch gesichertem Koronarstatus zu Verfügung. Die demografischen, klinischen und biochemischen Parameter zeigten keine signifikanten Abhängigkeiten zu den im Rahmen dieser Studie untersuchten genomischen Varianten.

4.1.1 Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene

Im Rahmen der Voruntersuchungen wurde die mRNA-Expression des $TNF\alpha$ mit genetischen Daten (c.-863C>A, c.-857C>T, c.-308G>A, c.-238G>A, P84L, IVS3+51A>G) assoziiert. Dabei wurde nur zu einem der untersuchten Polymorphismen, dem SNP c.-238G>A, ein signifikanter Zusammenhang aufgezeigt (Abbildung 8). Heterozygote AG-Genotypträger zeigten eine signifikant höhere $TNF\alpha$ mRNA-Expression im Vergleich zu homozygoten GG-Genotypträgern (AG-Genotyp: 8.94 ± 6.24 vs. GG-Genotyp: 6.50 ± 6.30 ag/Zelle, $p=0,033$). Im Patientenkollektiv wurden keine homozygoten AA-Genotypträger für diesen SNP identifiziert.

Abbildung 8: Abhängigkeit der TNF α mRNA-Expression von genetischen Varianten im TNF α -Gen.

In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass der mRNA-Spiegel weder mit den untersuchten klinischen noch mit biochemischen Faktoren im bivariaten Vergleich korrelierte. Darüber hinaus wurden keine signifikanten Korrelationen zwischen der TNF α mRNA-Expression und dem Alter der Patienten sowie den untersuchten biochemischen Faktoren, einschließlich des zirkulierenden TNF α -Proteins, nachgewiesen.

4.1.2 Expressionsanalysen auf Ebene des TNF α -Proteinlevels

Die Höhe des TNF α -Proteinspiegels im Plasma der Patienten wurde mit keiner der untersuchten genetischen Varianten statistisch signifikant assoziiert. Die Auswertung des Proteinspiegels in Abhängigkeit von klinischen Parametern ergab signifikante Auffälligkeiten. Patienten mit Adipositas wiesen signifikant höhere

TNF α -Proteinwerte als normalgewichtige Patienten auf ($p=0,037$, Tabelle 13). Darüber hinaus war das Alter der Patienten ein signifikanter Indikator für einen erhöhten TNF α -Proteinspiegel ($p=0,038$). In weiteren bivariaten Analysen wurde gezeigt, dass ein erhöhter TNF α -Proteinspiegel mit erhöhten Harnsäurewerten ($p<0,001$), und mit verringerten HDL-Cholesterolverwerten ($p=0,005$) korrelierte. Ebenso wurde eine positive Korrelation zwischen TNF α -Proteinspiegel und dem Body Mass Index ($p=0,01$) sowie zwei Markern der Koagulations-Fibrinolysebalance, dem Plasminogen ($p=0,013$) und dem Fibrinogen ($p=0,002$) ermittelt (Tabelle 14).

Tabelle 13: Zusammenhang zwischen der TNF α -Proteinexpression und klinischen Parametern (SD: Standardabweichung).

Parameter	TNF α -Proteinexpression im Plasma in pg/ml	
	Mittelwerte \pm SD	p-Wert (t-Test nach Students)
Geschlecht		
männlich (n=139)	2,48 \pm 0,65	0,740
weiblich (n=55)	2,44 \pm 0,92	
Rauchen		
Raucher (n=120)	2,43 \pm 0,66	0,819
Nichtraucher (n=41)	2,46 \pm 0,72	
Koronarstenose		
ja (n=96)	2,43 \pm 0,61	0,385
nein (n=98)	2,52 \pm 0,84	
Diabetes mellitus		
ja (n=29)	2,70 \pm 0,59	0,079
nein (n=162)	2,44 \pm 0,75	
Hypertonie		
ja (n=73)	2,54 \pm 0,68	0,094
nein (n=82)	2,35 \pm 0,68	
Adipositas		
ja (n=95)	2,59 \pm 0,82	0,037
nein (n=99)	2,36 \pm 0,62	

Tabelle 14: Signifikante bivariate Korrelationen zwischen TNF α -Proteinspiegel und Alter, Body Mass Index und biochemischen Parametern (SF: Standardfehler).

	Bivariater Korrelations- koeffizient (R)	R²	adjustiertes R²	SF	p-Wert
Alter	0,151	0,023	0,017	0,72	0,038*
Harnsäure	0,297	0,088	0,083	0,69	<0,001*
Body Mass Index	0,189	0,036	0,030	0,73	0,010*
HDL-Cholesterol	-0,201	0,041	0,035	0,72	0,005*
Plasminogen	0,197	0,039	0,030	0,71	0,013*
Fibrinogen	0,251	0,063	0,058	0,71	0,002**

* Für normalverteilte Werte wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson und

** für nicht normalverteilte Werte der Korrelationskoeffizient nach Spearman bestimmt.

In multivariaten Analysen wurde der komplexe Einfluss von den TNF α -Proteinspiegel signifikant beeinflussenden Kofaktoren bewertet. Aufgrund der starken Korrelation zwischen Fibrinogen und Plasminogen ($p < 0,001$) wurde nur ein Faktor, in diesem Fall Plasminogen, in die multivariate Auswertung einbezogen. In der schrittweisen linearen Regression wurden der Body Mass Index ($p = 0,009$), Harnsäure ($p = 0,026$) und das Alter der Patienten ($p = 0,037$) als unabhängige Prädiktoren für einen erhöhten TNF α -Plasmaspiegel ermittelt (Tabelle 15).

Tabelle 15: Schrittweise lineare Regressionsanalyse zur Beurteilung der den TNF α -Proteinspiegel beeinflussenden Faktoren (SE: Standardfehler).

a) Zusammenfassung der drei in der schrittweisen Regressionsanalyse ausgewerteten Modelle.

Modell	eingeschlossene Variablen	R ²	Adjustiertes R ²	SE	p-Wert
1	Body Mass Index	0,071	0,065	0,708	0,001
2	Body Mass Index Harnsäure	0,108	0,096	0,696	<0,001
3	Body Mass Index Harnsäure Alter	0,135	0,117	0,688	<0,001

b) Detaillierte Statistik zu Modell 3:

	Standardisierter Korrelationskoeffizient	p-Wert	t-Statistik
eingeschlossene Variablen			
Body Mass Index	0,214	0,009	2,66
Harnsäure	0,182	0,026	2,25
Alter	0,166	0,037	2,1
ausgeschlossene Variablen			
HDL-Cholesterol	-0,146	0,092	
Plasminogen	0,107	0,189	

4.2 Pilotstudie „Assoziation von Besonderheiten im Gen für TNF α bei Parodontitiden“ – Studie B

In dieser Studie wurden mögliche Assoziationen zwischen Genotyp-, Allel- und Haplotypfrequenzen der SNPs c.-308G>A und c.-238G>A und dem Auftreten von Parodontitiden bzw. parodontalen Risikofaktoren untersucht.

4.2.1 Assoziationen zwischen genetischen Besonderheiten im TNF α -Gen und dem Auftreten von schweren Parodontitiden

Zunächst wurde in bivariaten Analysen mögliche Zusammenhänge zwischen den SNPs im Promotor des TNF α -Gens c.308G>A und c.-238G>A, einschließlich derer Genotyp-, Allel- und Haplotypverteilung und dem Auftreten von schwerer chronischer und aggressiver Parodontitis ermittelt (Tabelle 16). Patienten mit schwerer Parodontitis (AP + CP) waren im Vergleich zur parodontitisfreien Kontrollgruppe signifikant häufiger GG-Genotypträger des SNPs c.-238G>A (Patienten: 92,2% vs. Kontrollen: 82,4%, p=0.033). Innerhalb der einzelnen Patientengruppen war eine entsprechende Tendenz erkennbar, jedoch konnte

keine Signifikanz erreicht werden (Tabelle 16, a). Bei der Auswertung der Allelverteilung beider SNPs zeigten sich in der Gesamtpatientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Unterschiede. Parodontitispatienten waren häufiger A-Allelträger des SNPs c.-308G>A (Patienten: 21,6% vs. Kontrollen: 13,7%; $p=0,040$) bzw. G-Allelträger des SNPs c.-238G>A (Patienten: 95,8% vs. Kontrollen: 90,7%; $p=0,031$) als parodontal Gesunde. Diese Tendenz blieb auch nach Separation der Patienten in eine AP- und CP-Gruppe erhalten, erreichte jedoch nur in der Gruppe der Patienten mit aggressiver Parodontitis für die Allelverteilung des c.-308G>A Polymorphismus statistische Signifikanz ($p=0,049$) (Tabelle 16, b). Die statistische Auswertung der Haplotypverteilungen ergab ebenfalls signifikante Auffälligkeiten. In der Gesamtpatientengruppe waren häufiger Träger der Haplotypkombination GG-AG und AG-AG im Vergleich zur Kontrollgruppe anzutreffen. Dagegen wurden nur in der Kontrollgruppe die Kombinationen AG-GA und AG-GG nachgewiesen ($p=0,005$). AG-Haplotypträger waren signifikant häufiger in der Gesamtpatientengruppe (Patienten: 21,6% vs. Kontrollen: 15,9%) anzutreffen als Träger des Haplotyps GA (Patienten: 4,2% vs. Kontrollen: 9,3%, $p=0,032$). Nach Aufspaltung der Patientengruppe blieb dieser Zusammenhang erhalten (n.s., Tabelle 16, c).

Tabelle 16: Zusammenhang zwischen genetischen Varianten im TNF α -Gen und dem Auftreten von schweren Parodontitiden. Alle angegebenen p-Werte beziehen sich auf den Vergleich zur parodontitisfreien Kontrollgruppe. (CP: chronische Parodontitis, AP: aggressive Parodontitis).

a) Auswertung der Genotypfrequenz kodominant und unter Berücksichtigung eines G-dominanten Modells

	Patienten mit CP+AP	Patienten mit CP	Patienten mit AP	Parodontitisfreie Kontrollen
Genotypen	(n=167)	(n=77)	(n=90)	(n=91)
c.-308G>A				
GG (%)	61,7	61,0	62,2	73,6
AG (%)	33,5	36,4	31,1	25,3
AA (%)	4,8	2,6	6,7	1,1
p-Wert	0,093*	0,211*	0,078*	
GG (%)	61,7	62,2	61,0	73,6
AG+AA (%)	38,3	37,8	39,0	26,4
p-Wert	0,072**	0,138**	0,115**	
c.-238G>A				
GG (%)	92,2	92,2	92,2	82,4
AG (%)	7,2	6,5	7,8	16,5
AA (%)	0,6	1,3	0	1,1
p-Wert	0,033*	0,075*	0,090*	
GG (%)	92,2	92,2	92,2	82,4
AG+AA (%)	7,8	7,8	7,8	17,6
p-Wert	0,030**	0,100**	0,079**	

b) Auswertung der Allelfrequenzen

	Patienten mit CP+AP	Patienten mit CP	Patienten mit AP	Parodontitisfreie Kontrollen
Allele	(n=334)	(n=154)	(n=180)	(n=182)
c.-308G>A				
G (%)	78,4	79,2	77,8	86,3
A (%)	21,6	20,8	22,2	13,7
p-Wert	0,040**	0,117**	0,049**	
c.-238G>A				
G (%)	95,8	95,5	96,1	90,7
A (%)	4,2	4,5	3,9	9,3
p-Wert	0,031**	0,137**	0,061**	

c) Auswertung der Haplotypen

	Patienten mit CP+AP	Patienten mit CP	Patienten mit AP	Parodontitisfreie Kontrollen
Haplotyp- kombinationen	(n=167)	(n=77)	(n=90)	(n=91)
c.-308G>A/c.-238G>A				
GG-GG (%)	53,9	53,2	54,4	57,1
GG-AG (%)	33,5	37,7	30,0	23,1
GG-GA (%)	7,2	5,2	8,9	11,0
AG-AG (%)	4,8	2,6	6,7	1,1
GA-GA (%)	0,6	1,3	0	1,1
AG-GA (%)	0	0	0	5,5
AG-GG (%)	0	0	0	1,1
p-Wert	0,005*	0,059*	0,046*	
GG-GG (%)	53,9	53,2	54,4	57,1
Haplotypen, die mind. ein A-Allel tragen (%)	46,1	46,8	45,6	42,9
p-Wert	0,616**	0,613**	0,715**	
Haplotypen	(n=334)	(n=154)	(n=180)	(n=182)
c.-308G>A/c.-238G>A				
GG (%)	74,3	74,7	73,9	74,7
AG (%)	21,6	21,4	21,7	15,9
GA (%)	4,2	3,9	4,4	9,3
p-Wert	0,032**	0,076**	0,090**	

* exakter Test nach Fisher

** Yates Korrektur

Mittels schrittweise binärer logistischer Regression wurde der Einfluss der genetischen Varianten im TNF α -Gen unter Berücksichtigung der Kofaktoren Alter, Geschlecht, Raucherstatus und approximalem Plaqueindex untersucht. Dabei wurde der GG-Genotyp des c.-238G>A Polymorphismus als unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten einer schweren Parodontitis bestätigt (Tabelle 17).

Eine multivariate Analyse zur Bestimmung des Einflusses des A-Allels des c.-308G>A Polymorphismus sowie des G-Allels des c.-238G>A Polymorphismus auf die Präsenz einer schweren Parodontitis bestätigte unter Berücksichtigung parodontaler Kofaktoren ebenfalls deren Bedeutung als potentielle Risiko-

indikatoren. (Tabelle 18). Die Verteilung der TNF α -Haplotypen wurde nicht als unabhängiger Risikoindikator für das Auftreten einer schweren Parodontitis im multivariaten Modell bestätigt.

Tabelle 17: Binäre logistische Regression (schrittweise vorwärts) für das Risiko einer schweren Parodontitis in Abhängigkeit der Kofaktoren Alter, Geschlecht, Raucherstatus und approximalem Plaqueindex (API) sowie des GG-Genotyps des TNF α -SNPs c.-238G>A.

Signifikante Variable	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert	Odds Ratio	Konfidenzintervall (95%)
eingeschlossene Variablen					
GG-Genotyp	0,921	0,399	0,021	2,51	1,15 – 5,49
ausgeschlossene Variablen					
Rauchen			0,037		
Alter			0,093		
Geschlecht (♂)			0,113		
API			0,168		

Tabelle 18: Binäre logistische Regression (schrittweise vorwärts) für das Risiko einer schweren Parodontitis unter Berücksichtigung der Kofaktoren Alter, Geschlecht, Raucherstatus und approximaler Plaqueindex (API) sowie des A-Allels des TNF α -SNPs c.-308G>A (a) und des G-Allels des SNPs c.-238G>A (b).

Signifikante Variable	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert	Odds Ratio	Konfidenzintervall (95%)
a) c.-308G>A					
eingeschlossene Variablen					
Geschlecht (♂)	0,502	0,193	0,009	1,65	1,13 – 2,41
API	0,009	0,003	0,014	1,008	1,002 – 1,01
A-Allel	0,548	0,260	0,035	1,73	1,04 – 2,86
Rauchen	0,446	0,225	0,047	1,56	1,005 – 2,43
Alter	0,018	0,009	0,049	1,02	1,00 – 1,04
b) c.-238G>A					
eingeschlossene Variablen					
Geschlecht (♂)	0,491	0,193	0,011	1,63	1,12 – 2,39
API	0,009	0,003	0,013	1,009	1,002 – 1,02
G-Allel	0,920	0,386	0,017	2,51	1,17 – 5,35
Alter	0,457	0,009	0,041	1,02	1,001 – 1,04
Rauchen	0,018	0,226	0,043	1,58	1,01 – 2,46

4.2.2 Die Bedeutung der $TNF\alpha$ -SNPs c.-308G>A und c.-238G>A als Risikoindikatoren für klinische Marker schwerer Parodontitiden

Mögliche Assoziationen zwischen genetischen Besonderheiten im $TNF\alpha$ -Gen und demographischen und klinischen Risikofaktoren für das Auftreten von Parodontitiden wurden in bivariaten Analysen getestet. In diese Untersuchungen wurde das Alter, das Geschlecht, der Raucherstatus, der approximale Plaqueindex, die Blutung auf Sondierung, die Sondiertiefe, der klinische Attachmentverlust sowie die subgingivale Besiedlung mit *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, einbezogen. Es wurden signifikante Assoziationen zwischen genetischen Varianten und dem Ausmaß der Blutung auf Sondierung nachgewiesen. Träger des GG-Genotyp des c.-238G>A-SNPs zeigten eine erhöhte Sulkusblutungsneigung im Vergleich zu Probanden mit AG- und AA-Genotyp (Tabelle 19). Dieser Zusammenhang war jedoch ausschließlich in der Gesamtgruppe und in der Gruppe der parodontitisfreien Kontrollen statistisch signifikant.

Tabelle 19: Bedeutung des GG-Genotyps des c.-238G>A-SNP auf das Ausmaß der Sulkusblutung auf Sondierung (SD: Standardabweichung, CP: chronische Parodontitis, AP: aggressive Parodontitis).

	Sulkusblutung auf Sondierung Mittelwert (%) \pm SD	p-Wert
Gesamtstudiengruppe		
GG (n=229)	65,41 \pm 27,91	0,006*
AG+AA (n=29)	48,06 \pm 34,54	
Patienten mit CP+AP		
GG (n=154)	73,73 \pm 26,20	0,588*
AG+AA (n=13)	65,15 \pm 37,62	
Patienten mit CP		
GG (n=71)	69,14 \pm 26,65	0,731*
AG+AA (n=6)	68,48 \pm 39,28	
Patienten mit AP		
GG (n=83)	77,66 \pm 25,31	0,269*
AG+AA (n=7)	62,30 \pm 39,05	
Parodontitisfreie Kontrollen		
GG (n=75)	48,33 \pm 23,26	0,017*
AG+AA (n=16)	34,17 \pm 25,21	

* Mann-Whitney-U-Test

In multivariaten Analysen wurde der Einfluss des c.-238G>A-Genotyps auf das Ausmaß der Sulkusblutung auf Sondierung unter Berücksichtigung der Kofaktoren Alter, Geschlecht, Raucherstatus und approximaler Plaqueindex sowohl in der Gesamtgruppe als auch in der Gruppe der parodontitisfreien Kontrollen bestätigt (Tabelle 20).

Tabelle 20: Schrittweise lineare Regressionsanalyse zur Beurteilung der die Sulkusblutungsneigung beeinflussenden Faktoren (Alter, Geschlecht, Raucherstatus, approximaler Plaqueindex, GG-Genotyp des TNF α -SNPs c.-238G>A) (SE: Standardfehler, API: approximaler Plaqueindex).

a) Gesamtgruppe

	Standardisierter Korrelationskoeffizient	p- Wert	t-Statistik
eingeschlossene Variablen			
API	0,357	<0,001	6,16
GG-Genotyp	0,162	0,005	2,82
Geschlecht (♂)	0,139	0,017	2,41
ausgeschlossene Variablen			
Alter	-0,009	0,875	
Raucher	0,018	0,758	
Modellzusammenfassung	R²	Adjustiertes R²	p- Wert
	0,170	0,160	<0,001
			SE
			26,54

b) Gruppe der parodontitisfreien Kontrollprobanden

	Standardisierter Korrelationskoeffizient	p- Wert	t-Statistik
eingeschlossene Variablen			
API	0,358	<0,001	3,71
GG-Genotyp	0,231	0,019	2,39
ausgeschlossene Variablen			
Alter	0,158	0,111	
Geschlecht (♂)	0,055	0,581	
Raucher	0,028	0,775	
Modellzusammenfassung	R²	Adjustiertes R²	p- Wert
	0,179	0,160	0,019
			SE
			22,08

Eine Analyse der Abhängigkeit der Sulkusblutung auf Sondierung von der Allelverteilung ergab eine Assoziation des G-Allels mit erhöhter Blutungsneigung die jedoch nur in der Gruppe der Gesunden Signifikanz erreichte (G-Allel: 64,26%±28,57 vs. A-Allel: 50,87%±35,17, $p=0,028$, Mann-Whitney-U-Test). Im multivariaten Ansatz unter Einbeziehung der Kofaktoren Alter, Geschlecht, Raucherstatus und approximaler Plaqueindex wurde das G-Allel jedoch nicht mit einer erhöhten Sulkusblutung auf Sondierung assoziiert.

Auch für den Haplotyp GG-GG wurde eine signifikante Erhöhung des Ausmaßes an Sulkusblutung auf Sondierung in der Gruppe der parodontal Gesunden gezeigt (GG-GG: 50,95%±22,0 vs. Haplotypen, die mind. ein A-Allel tragen: 39,04%±25,32, $p=0,020$, Mann-Whitney-U-Test). In der linearen Regression wurde dieser Zusammenhang bei Hinzuziehen der Kofaktoren Alter, Geschlecht, Raucherstatus und approximaler Plaqueindex nicht bestätigt.

Eine weitere Analyse der Bedeutung von genetischen Besonderheiten im $\text{TNF}\alpha$ -Gen auf parodontale Risikofaktoren ergab signifikante Assoziationen zur subgingivalen Besiedlung mit *P.gingivalis* (Abbildung 9). Homozygote GG-Genotypträger des c.-238G>A SNPs waren in der Gruppe der AP-Patienten häufiger *P.gingivalis* positiv im Vergleich zu AG- und AA-Genotypträgern. Bei CP-Patienten und parodontal Gesunden wurde dieser Zusammenhang nicht bestätigt. Die Analyse der Allelverteilung ergab ein ähnliches Bild. In der Gesamtgruppe (G-Allel: 60,2% *P.g.* positiv vs. A-Allel: 38,7% *P.g.* positiv, $p=0,030$, Yates Korrektur) sowie in der AP-Patientengruppe (G-Allel: 77,5% *P.g.* positiv vs. A-Allel: 28,6% *P.g.* positiv, $p=0,010$, exakter Test nach Fisher) wurde eine erhöhte subgingivale Besiedlung mit *P.gingivalis* bei Vorliegen des G-Allels nachgewiesen. In der Gruppe der CP+AP-Patienten ($p=0,084$, exakter Test nach Fisher), der CP-Patienten ($p=1,00$, exakter Test nach Fisher) sowie in der parodontitisfreien Kontrollgruppe ($p=1,00$, exakter Test nach Fisher) wurde keine Assoziation gezeigt. Bezüglich aller weiteren in die Auswertung einbezogenen parodontalen Risikofaktoren wurden keine Assoziationen zur Genotyp-, Allel- oder Haplotypverteilung der untersuchten $\text{TNF}\alpha$ -SNPs c.-308G>A und c.-238G>A in den Untersuchungsgruppen ermittelt.

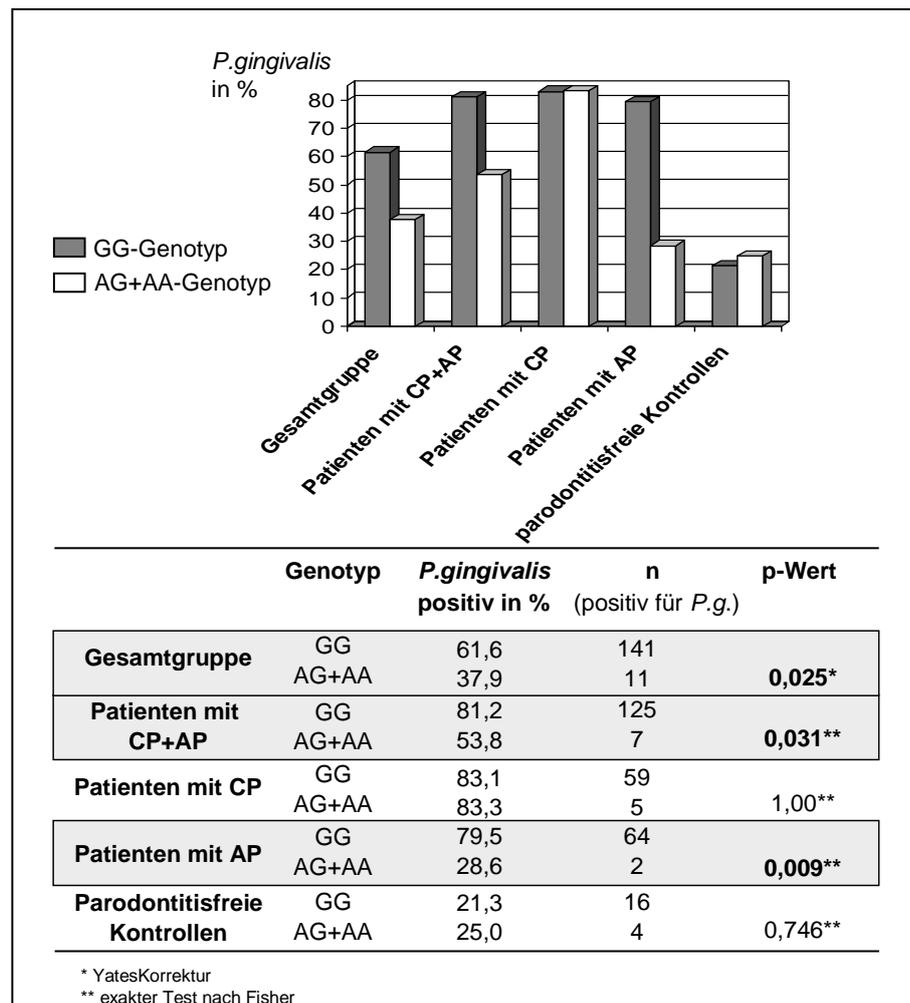


Abbildung 9: Assoziation der individuellen Genotypkonstellation des c.-238G>A-SNPs mit dem subgingivalen Vorkommen von *P.gingivalis* (*P.g.*).

4.3 Longitudinalstudie „Parodontitis als Risikofaktor für koronare Sekundärereignisse“ (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01045070) – Studie C: Erfassung der Basisdaten

Im Rahmen dieser longitudinalen Kohortenuntersuchung sollte in den Basisuntersuchungen die Bedeutung der $TNF\alpha$ -Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A für das Auftreten von schweren Parodontitiden bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen ermittelt werden.

In die Studie wurden im Zeitraum 10/2009 bis 02/2011 insgesamt 1002 Patienten (Kaukasier, Mitteldeutschland) konsekutiv eingeschlossen.

4.3.1 Klinische Charakterisierung der in die Studie eingeschlossenen Patienten mit koronarer Herzerkrankung

Von den 1002 konsekutiv in die Studie eingeschlossenen Patienten mit angiographisch gesichertem Koronarstatus konnten 942 Patienten in die genetischen Untersuchungen einbezogen werden. Von diesen Personen wiesen zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses 493 Patienten keine oder eine milde Form einer parodontalen Erkrankung auf, während 449 Koronarpatienten unter einer schweren Parodontitis litten. Die demographischen und klinischen Daten sind in Tabelle 21 zusammengefasst. In der Gruppe der Patienten ohne bzw. mit milder Parodontitis waren signifikant häufiger Frauen und aktuelle Nichtraucher. Patienten, die an einer schweren Parodontitis erkrankt waren, wiesen die höheren Serumspiegel an C-reaktivem Protein, Interleukin-6 und Kreatinin auf.

Hinsichtlich zahnärztlich klinischer Parameter wurden in der Gruppe mit schwerer Parodontitis deutlich höhere Werte für Plaque, Karies sowie fehlende Zähne ermittelt (Tabelle 22). Bei Patienten mit schwerer Parodontitis wurden signifikant häufiger Bakterien des roten Komplexes und des orangen Komplexes (mit Ausnahme von *F. nucleatum*), aber nicht *A. actinomycetemcomitans* und Bakterien des grünen Komplexes (Tabelle 22) nachgewiesen. Insgesamt war die Summe der bakteriellen Keime bei Patienten mit schwerer Parodontitis signifikant größer im Vergleich zu Probanden, die nicht unter einer schweren Parodontitis litten (Abbildung 10).

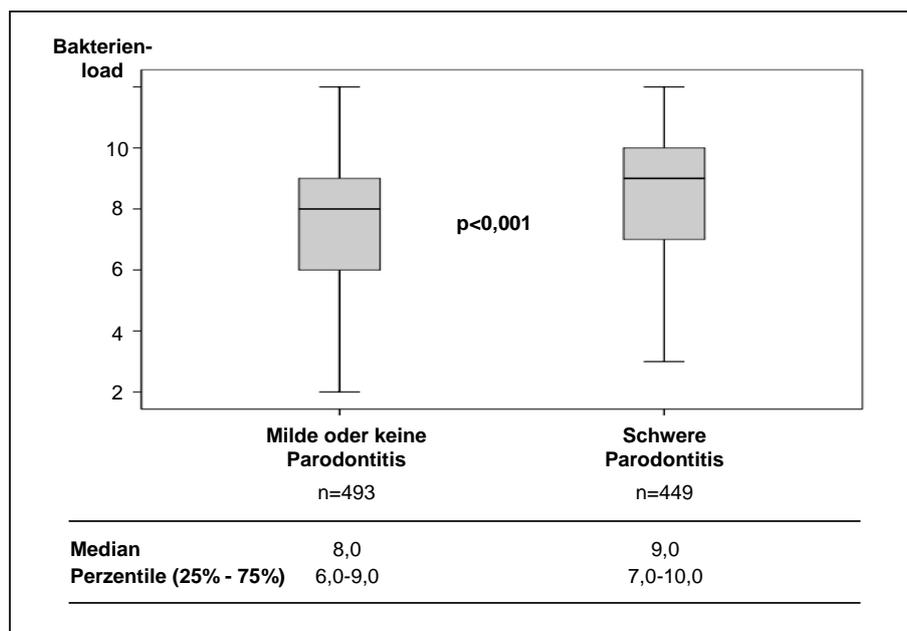


Abbildung 10: Bakterielle Belastung in Abhängigkeit von der Schwere der parodontalen Erkrankung.

Tabelle 21. Demographische, anamnestische und biochemische Daten der Koronarpatienten (MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, Ref.: laborinterne Referenzwerte, M: Männer, F: Frauen).

	keine o. milde Parodontitis (n=493)	schwere Parodontitis (n=449)	p-Wert
<i>Demographische Parameter</i>			
Alter in Jahre (MW±SD)	66,3±11,2	67,4±10,8	0,377*
Geschlecht (weiblich, %)	30,2	21,4	0,003**
<i>Anamnestische Daten</i>			
Raucher (%)	8,9	16,0	0,001**
BMI, kg/m ² , (MW ±SD)	28,4±4,3	28,3±4,6	0,923*
<i>Vorerkrankungen</i>			
Diabetes mellitus (%)	31,6	37,0	0,098**
Hypertonie (%)	88,2	86,9	0,589**
Hyperlipoproteinämie (%)	61,3	55,9	0,109**
Rheumatoide Arthritis (%)	4,5	5,6	0,530**
Gicht (%)	9,5	12,2	0,217**
<i>Biochemische Parameter</i>			
C-reaktives Protein (mg/l±SD) (Ref.: <5mg/l)	26,1±43,1	33,4±54,2	0,007***
Leukozyten (Gpt/l±SD) (Ref.: 3,8-9,8Gpt/l)	8,2±2,6	8,3±3,1	0,528***
Interleukin 6 (pg/ml±SD) (Ref.: <11pg/ml)	12,6±21,1	17,7±29,9	0,003***
Harnsäure (µmol/l±SD) (Ref.: M5,3-8,9, F3,6-8µmol/l)	6,5±3,7	7,0±4,7	0,433***
Kreatinin (µmol/l±SD) (Ref.: M<102, F<88µmol/l)	100,3±82,2	106,8±73,7	0,033***
Total-Cholesterol (mmol/l±SD) (Ref.: <6,2mmol/l)	4,6±1,4	4,5±1,2	0,304***
HDL-cholesterol (mmol/l±SD) (Ref.: >1,5mmol/l)	1,04±0,4	1,02±0,3	0,564***
LDL-cholesterol (mmol/l±SD) (Ref.: <3,9mmol/l)	2,8±1,0	2,7±1,0	0,385***
Triglyzeride (mmol/l±SD) (Ref.: M<1,6, F<2,3mmol/l)	1,7±3,1	1,7±1,8	0,173***

* t-Test nach Students, ** Yates Korrektur, *** Mann-Whitney-U-Test

Tabelle 22: Zahnärztlich klinische Daten der Koronarpatienten, einschließlich der subgingivalen Besiedlung mit parodontpathogenen Bakterien (MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, DMF: „decayed, missing filled“).

	keine o. milde Parodontitis (n=493)	schwere Parodontitis (n=449)	p-Wert
<i>Zahnärztlich klinische Parameter</i>			
Plaqueindex (MW±SD)	0,75±0,6	1,4±0,8	<0,001*
Blutungsindex (MW±SD)	7,2±12,4	12,4±15,0	<0,001*
Sondiertiefe in mm (MW±SD)	3,0±0,6	4,1±0,8	<0,001*
Klinischer Attachmentverlust in mm (MW±SD)	3,3±0,7	5,5±1,3	<0,001*
Fehlende Zähne (MW±SD)	9,0±6,8	14,5±7,2	<0,001*
Kariöse Zähne (MW±SD)	0,21±0,7	0,39±1,1	0,004*
Gefüllte Zähne (MW±SD)	6,98±4,1	4,27±3,6	<0,001*
Früher Zahnverlust infolge Zahnlockerung bei Verwandten 1. Grades (%)	2,4	1,8	0,640**
DMF Index (MW±SD)	16,09±6,7	19,09±6,34	<0,001*
<i>Positiver subgingivaler Bakteriennachweis</i>			
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (%)	10,8	9,1	0,472**
Roter Komplex			
<i>P. gingivalis</i> (%)	55,2	72,6	<0,001**
<i>T. forsythia</i> (%)	72,8	81,5	0,002**
<i>T. denticola</i> (%)	55,6	65,3	0,003**
Oranger Komplex			
<i>P. intermedia</i> (%)	19,9	27,2	0,010**
<i>P. micros</i> (%)	75,3	82,0	0,015**
<i>F. nucleatum</i> (%)	97,2	98,4	0,267**
<i>C. rectus</i> (%)	57,4	66,8	0,004**
<i>E. nodatum</i> (%)	24,5	37,4	<0,001**
Grüner Komplex			
<i>E. corrodens</i> (%)	69,2	71,5	0,479**
<i>C. sputigena</i> , <i>C. gingivalis</i> , <i>C. ochracea</i> (%)	70,0	68,2	0,592**

* Mann-Whitney-U-Test

** Yates Korrektur

4.3.2 Einfluss der TNF α -SNPs c.-308G>A und c.-238G>A auf den Schweregrad einer Parodontitis bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung

In Abhängigkeit der Schwere der parodontalen Erkrankung wurde die Bedeutung der Genotyp-, Allel- und Haplotypverteilung der TNF α -SNPs c.-308G>A und c.-238G>A in der Gruppe der Koronarpatienten untersucht. Es wurde gezeigt, dass weder die Genotyp-, noch die Allelverteilung mit dem Schweregrad der Parodontitis assoziiert war (Tabelle 23). Bei der Analyse der Haplotypverteilung wurde ein tendenziell protektiver Einfluss des GG-GG-Haplotyps ermittelt ($p=0,070$, Yates Korrektur).

Tabelle 23: Bedeutung der Genotyp-, Allel- und Haplotypverteilung (c.-308G>A, c.-238G>A) für die Schwere der Parodontitis.

	keine o. milde Parodontitis	schwere Parodontitis	p-Wert
Genotypen	(n=493)	(n=449)	
c.-308G>A			
GG (%)	71.0	67.9	
AG (%)	26.8	28.8	
AA (%)	2.2	3.3	0.430*
AG+AA (%)	29.0	32.1	0.342*
c.-238G>A			
GG (%)	91.5	89.1	
AG (%)	8.1	10.7	
AA (%)	0.4	0.2	0.355*
AG+AA (%)	8.5	10.9	0.258*
Allele	(n=986)	(n=898)	
c.-308G>A			
G (%)	84.4	82.3	
A (%)	15.6	17.7	0.220*
c.-238G>A			
G (%)	95.5	94.4	
A (%)	4.5	5.6	0.271*
Haplotypkombinationen	(n=493)	(n=449)	
c.-308G>A/c.-238G>A			
GG-GG (%)	63.9	58.1	
GG-AG (%)	25.6	27.4	
GG-GA (%)	6.7	9.4	
AG-AG (%)	2.2	3.3	
AG-GA (%)	1.2	1.6	
GA-GA (%)	0.4	0.2	0.397*
Haplotypen, die mind. ein A- Allel tragen (%)	36.1	41.9	0.070*
Haplotypen	(n=986)	(n=898)	
GG (%)	80.0	76.6	
AG (%)	15.6	17.8	
GA (%)	4.4	5.6	0.179*

* Yates Korrektur

4.3.3 Die Bedeutung der individuellen genetischen Konstellation für weitere parodontale und koronare Risikofaktoren

In weitere Assoziationsuntersuchungen wurden alle in den Tabellen 21 und 22 aufgeführten parodontalen und koronaren Risikofaktoren einbezogen. Eine Analyse der parodontologischen Risikofaktoren, Plaqueindex, klinischer Attachmentverlust, Sulkusblutung nach Sondierung und Sondiertiefe ergab Assoziationen zwischen dem c.-238G>A Polymorphismus und dem Level an klinischem Attachmentverlust sowie zwischen dem c.-308G>A Polymorphismus und der Blutungsneigung in der Gesamtstudiengruppe.

GG-Genotypträger des c.-238G>A Polymorphismus wiesen einen geringeren Attachmentverlust auf als Träger der Genotypen AG und AA (GG-Genotypträger: $4,31 \pm 1,50$ mm vs. AG+AA-Genotypträger: $4,50 \pm 1,70$ mm) (Abbildung 11). Jedoch war diese Tendenz statistisch nicht signifikant ($p=0,292$).

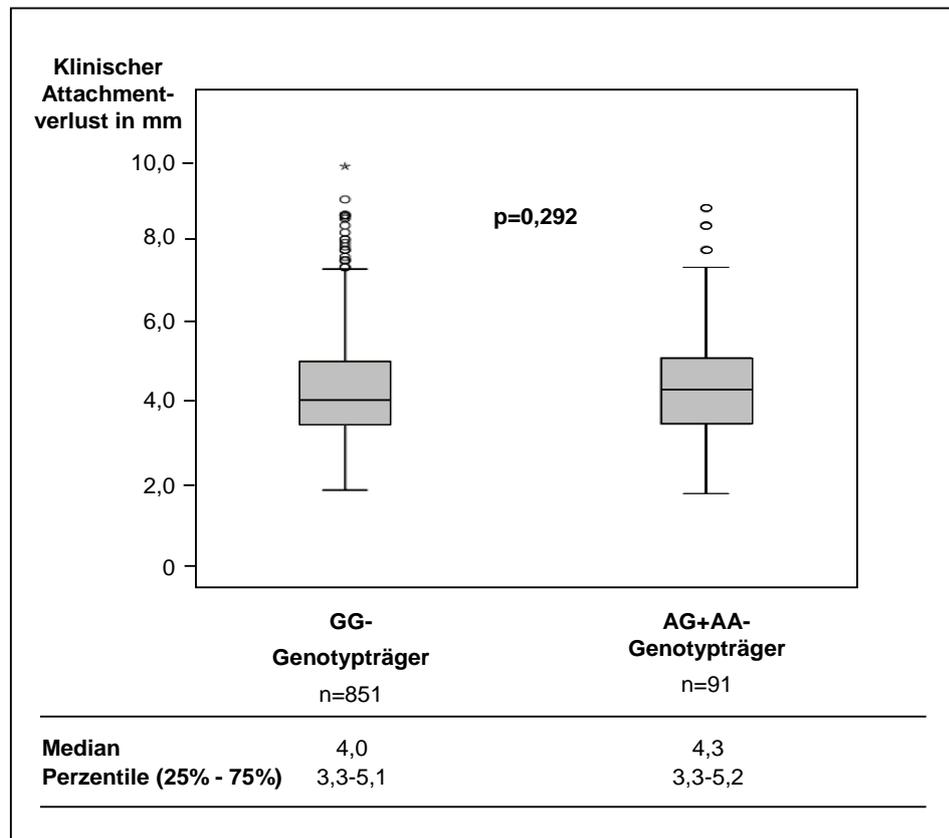


Abbildung 11: Abhängigkeit des klinischen Attachmentverlusts von der Genotypkonstellation des c.238G>A Polymorphismus im $TNF\alpha$ -Gen in der Gesamtgruppe.

Berücksichtigt man jedoch in einem komplexen Risikomodell weitere parodontale Risikofaktoren, einschließlich Alter, Geschlecht, Raucherstatus, approximaler Plaqueindex und Diabetes mellitus, so wurde der AG+AA-Genotyp des c.-238G>A

Polymorphismus als unabhängiger Risikofaktor für einen erhöhten klinischen Attachmentverlust bestätigt (Tabelle 24).

Tabelle 24: Assoziation zwischen Genotypkonstellation des c.-238G>A Polymorphismus und dem Level an klinischem Attachmentverlust in der Gesamtstudiengruppe:

Lineare Regressionsanalyse unter Berücksichtigung der Kofaktoren Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Plaqueindex (PI), Diabetes mellitus, AG+AA-Genotyp des TNF α -SNPs c.-238G>A.

	Standardisierter Korrelationskoeffizient	p- Wert	t-Statistik	
eingeschlossene Variablen				
PI	0,580	<0,001	21,80	
Diabetes mellitus	0,059	0,024	2,26	
Geschlecht (♂)	0,058	0,027	2,21	
AG+AA-Genotyp	0,056	0,032	2,13	
ausgeschlossene Variablen				
Alter	0,039	0,144		
Raucher	0,029	0,279		
Modellzusammenfassung	R²	Adjustiertes R²	p- Wert	SE
	0,360	0,358	0,033	1,21

Patienten mit AG+AA-Genotyp des Polymorphismus c.-308G>A zeigten eine signifikant erhöhte Sulkusblutungsneigung nach Sondierung (GG-Genotyp: 9,2±13,5 vs. AG+AA-Genotyp: 10,8±14,8, p=0,023, Mann-Whitney-U-Test). Ebenso zeigten Patienten, die Träger von Haplotypkombinationen waren, die mindestens ein A-Allel enthielten, eine Erhöhung des Sulkusblutungsindex auf (GG-GG-Haplotypkombination: 9.4±14.2 vs. Haplotypkombinationen mit A-Allel: 10.0±13.6, p=0,038, Mann-Whitney-U-Test). Eine Unterteilung der Patienten hinsichtlich der Schwere der parodontalen Erkrankung ergab ausschließlich Signifikanzen in Bezug auf den Genotyp in der Gruppe mit milder bzw. ohne Parodontitis (p=0,033, Mann-Whitney-U-Test, Tabelle 25 a). Auch unter Berücksichtigung weiterer potentieller Kofaktoren blieb diese Signifikanz erhalten (Tabelle 25 b). Alle weiteren in der Gesamtgruppe ermittelten Assoziationen erreichten keine statistische Signifikanz in den Patientenuntergruppen (Milde oder keine Parodontitis: Haplotyp p=0,079; Schwere Parodontitis: Genotyp p=0,495, Haplotyp p=0,676; Mann-Whitney-U-Test).

Tabelle 25. Assoziation zum Genotyp des c.-308G>A Polymorphismus und der Sulkusblutung auf Sondierung in der Gruppe mit milder bzw. ohne Parodontitis (MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, SE: Standardfehler, API: approximaler Plaqueindex).

a) Bivariate Korrelation.

	Sulkusblutungsindex (MW±SD)	p-Wert
c.-308G>A, Genotypen		
GG (n=655)	6,29±9,62	0.033
AG+AA (n=287)	9,61±17,35	

Mann-Whitney-U-Test

b) Schrittweise lineare Regressionsanalyse unter Berücksichtigung der Kofaktoren Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Plaqueindex (PI), Diabetes mellitus, AG+AA-Genotyp des TNF α -SNPs c.-308G>A.

	Standardisierter Korrelationskoeffizient	p- Wert	t-Statistik	
eingeschlossene Variablen				
PI	0,363	<0,001	8,71	
AG+AA-Genotyp	0,130	0,002	3,12	
ausgeschlossene Variablen				
Alter	-0,015	0,722		
Geschlecht (♂)	0,071	0,093		
Raucher	0,029	0,488		
Diabetes mellitus	0,077	0,069		
Modellzusammenfassung	R²	Adjustiertes R²	p- Wert	SE
	0,147	0,144	<0,001	11,52

Bei der Analyse der Entzündungsmediatoren wurde für den Interleukin 6-Serumspiegel eine Assoziation zur individuellen TNF α -Genkonstellation ermittelt. In der Gesamtstudiengruppe wiesen Träger des GG-Genotyps (c.-238G>A, p=0,003, Mann-Whitney-U-Test), des G-Allels (c.-238G>A, p=0,003, Mann-Whitney-U-Test) und des GG-Haplotyps (c.-308G>A/c.-238G>A, p=0,014, Kruskal-Wallis-Test) signifikant höhere Serumwerte für Interleukin 6 auf. Diese Assoziation wurde ebenfalls in der Patientengruppe ohne bzw. mit milder Parodontitis bestätigt (Abbildung 12) während in der Gruppe mit schwerer Parodontitis keine Abhängigkeiten ermittelt wurden. In der multivariaten linearen Regressionsanalyse bei Berücksichtigung der Kofaktoren Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus, C-reaktives Protein und genetische Besonderheit (GG-Genotyp, G-Allel oder GG-

Haplotyp) wurde der genetische Hintergrund nicht als unabhängiger Prädiktor für einen erhöhten Interleukin 6-Spiegel bestätigt.

Weitere Zusammenhänge zwischen demographischen bzw. anamnestisch erfassten Daten, bestehenden Vorerkrankungen, sowie biochemischen Parametern zum genetischen Hintergrund wurden nicht ermittelt.

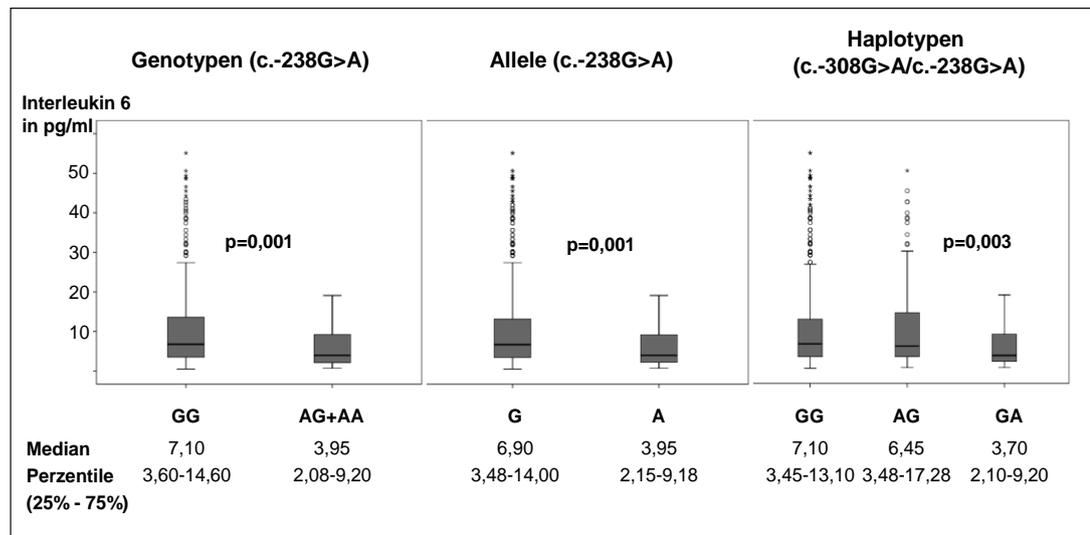


Abbildung 12: Abhängigkeit des Interleukin 6 Serumlevels von genetischen Besonderheiten im $TNF\alpha$ -Gen in der Gruppe der Koronarpatienten mit milder bzw. ohne Parodontitis.

4.3.4 Zusammenhang zwischen Besonderheiten im Gen für $TNF\alpha$ und der subgingivalen Keimbesiedlung

In weiteren bivariaten Vergleichen wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen genetischem Hintergrund und der subgingivalen Besiedlung mit parodontopathogenen Bakterien analysiert. Für alle Bakterien wurde kein Zusammenhang zur Genotyp-, Allel- und Haplotypverteilung ermittelt. Einzige Ausnahme bildete hierbei das subgingivale Vorkommen von *P.intermedia*. In der Gesamtstudiengruppe zeigten Träger der AG+AA Genotypen und des A-Allels des c.-308G>A SNPs eine signifikant höhere *P.i.*-Prävalenz (Tabelle 26). Nach Unterteilung der Patienten hinsichtlich des Schweregrads der Parodontitis wurde ein ähnlicher Trend, jedoch ohne statistische Signifikanz gezeigt (Milde oder keine Parodontitis: Genotyp $p=0,079$, Allel $p=0,051$; Schwere Parodontitis: Genotyp $p=0,320$ Allel $p=0,404$; alle p-Werte mit Yates Korrektur).

Tabelle 26: Assoziation der individuellen Genotyp- und Allelfrequenz des c.-308G>A SNPs mit dem subgingivalen Auftreten von *P.intermedia* in der Gesamtstudiengruppe.

<i>P. intermedia</i> positive Patienten (%)		p-Wert Odds Ratio (95% Konfidenzintervall)
Genotypen		
GG (n=655)	21,4	0,037* 1,422 (1,034-1,955)
AG + AA (n=287)	27,9	
Allele		
G-Allele (n=1570)	22,4	0,036* 1,353 (1,030-1,779)
A-allele (n=313)	28,1	

* Yates Korrektur

Unter Berücksichtigung weiterer möglicher Kofaktoren wurde im multivariaten Modell getestet, ob die genetische Konstellation des c.-308G>A Polymorphismus als unabhängiger Risikoindikator für das Auftreten von *P.intermedia* bestätigt werden konnte. Sowohl Träger des AG+AA-Genotyps als auch des A-Allels zeigten im komplexen Modell ein signifikant erhöhtes relatives Risiko für die subgingivale Besiedlung mit *P.intermedia* (Tabelle 27).

Tabelle 27: Binäre logistische Regression (schrittweise vorwärts) für das Auftreten von *P.intermedia* in Abhängigkeit der Kofaktoren Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Diabetes mellitus und Plaqueindex (PI) und

a) des AG+AA-Genotyps des TNF α -SNPs c.-308G>A

b) des A-Allels des TNF α -SNPs c.-308G>A.

Signifikante Variable	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert	Odds Ratio	Konfidenzintervall (95%)
a) eingeschlossene Variablen					
Rauchen	0,61	0,22	0,004	1,84	1,21-2,80
AG+AA-Genotyp	0,37	0,16	0,024	1,45	1,05-2,00
b) eingeschlossene Variablen					
PI	0,006	0,002	0,002	1,01	1,002-1,01
Alter	0,016	0,005	0,003	1,02	1,01-1,03
A-Allel	0,318	0,141	0,024	1,38	1,04-1,80

4.4 Auswertung des einjährigen Follow-ups – Studie C

4.4.1 Klinische Charakterisierung der Patienten entsprechend eines kardiovaskulären Sekundärereignisses

Im Zeitraum 11/2010 bis 04/2012 wurde das Follow-up durchgeführt. Von den 1002 in die Studie eingeschlossenen Patienten beendeten 1000 Patienten das Follow-up. Damit beträgt im gesamten Untersuchungskollektiv die Loss to Follow-up-Rate 0,2%. Von den 942 in die genetischen Subuntersuchungen einbezogenen Patienten vollendeten 941 das Follow-up. In Abbildung 13 sind die im Zeitraum des Follow-ups aufgetretenen Ereignisse aller in den genetischen Analysen untersuchten Patienten zusammengefasst.

Als Endpunkt der vorliegenden Studie wurden kardiovaskuläre Sekundärereignisse (nichttödlicher Myokardinfarkt, kardiovaskulärer Tod und Schlaganfall) definiert. Entsprechend dieser Definition erlitten 7,2% der kardiovaskulären Patienten kardiovaskuläres Sekundärereignis.

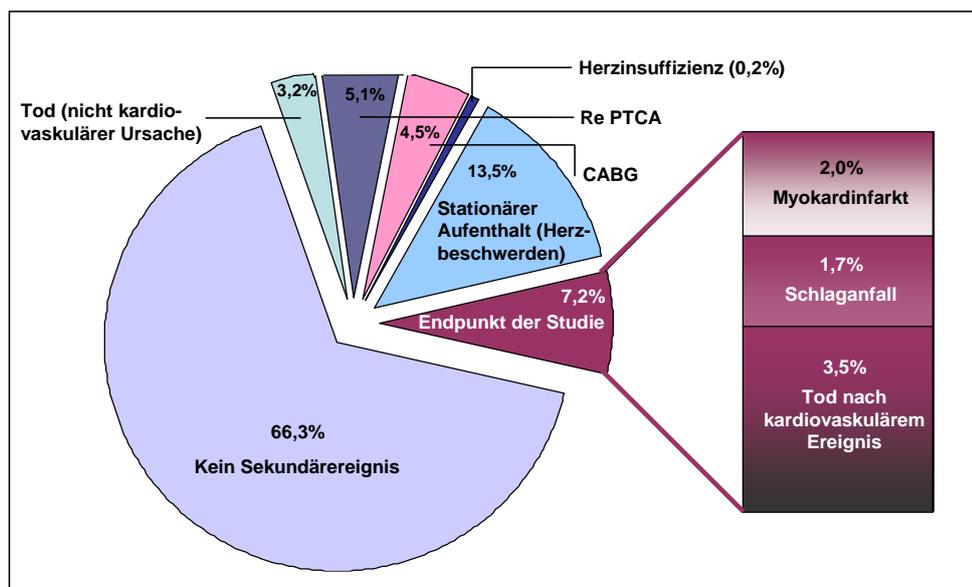


Abbildung 13: Verteilung der erfassten Sekundärereignisse nach einjährigem Follow-up in der Gesamtstudiengruppe (n=941). Es erlitten 7,2% der kardiovaskulären Patienten einen nichttödlichen Myokardinfarkt, einen Schlaganfall oder verstarben aufgrund eines kardiovaskulären Ereignisses. Diese Ereignisse wurden als Endpunkt der Studie definiert. (CABG: „coronary artery bypass graft“, Koronararterien Bypass, re PTCA: Perkutane transluminale Angioplastie (rechts)).

Patienten, die im Zeitraum des einjährigen Follow-ups einen Myokardinfarkt oder Schlaganfall erlitten bzw. aufgrund eines kardiovaskulären Ereignisses verstarben, zeigten signifikant erhöhte CRP- und Interleukin 6-Werte als Patienten ohne Ereignis (Tabelle 28). Bezüglich der weiteren in die Analyse einbezogenen

biochemischen und anamnestischen Daten wurden keine signifikanten Verteilungsunterschiede ermittelt.

Tabelle 28: Demographische, anamnestische und biochemische Daten der Patienten (P: Patienten, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, Ref.: laborinterne Referenzwerte, M: Männer, F: Frauen).

	P. ohne Sekundär- ereignis (n=873)	P., die Sekundär- ereignis erlitten (n=68)	p-Wert
<i>Demographische Parameter</i>			
Alter in Jahre (MW \pm SD)	66,7 \pm 11,0	67,9 \pm 11,2	0.412*
Geschlecht (weiblich, %)	29,4	25,8	0.606**
<i>Anamnestische Daten</i>			
Raucher (%)	12,3	11,8	1.000**
BMI, kg/m ² , (MW \pm SD)	28,4 \pm 4,4	27,5 \pm 5,1	0.097*
<i>Vorerkrankungen</i>			
Diabetes mellitus (%)	33,3	45,6	0,055**
Hypertonie (%)	87,7	86,8	0,964**
Hyperlipoproteinämie (%)	59,1	54,4	0,529**
Rheumatoide Arthritis (%)	4,9	5,9	0,952**
Gicht (%)	10,5	14,7	0,389**
<i>Biochemische Parameter</i>			
C-reaktives Protein (mg/l \pm SD) (Ref.: <5mg/l)	29,4 \pm 49,4	33,3 \pm 40,6	0,002****
Leukozyten (Gpt/l \pm SD) (Ref.: 3,8-9,8Gpt/l)	8,3 \pm 2,9	8,2 \pm 2,5	0,983****
Interleukin 6 (pg/ml \pm SD) (Ref.: <11pg/ml)	14,8 \pm 26,1	17,9 \pm 20,9	0,015****
Harnsäure (μ mol/l \pm SD) (Ref.: M5,3-8,9, F3,6- 8,0 μ mol/l)	6,7 \pm 4,2	7,4 \pm 4,2	0,129****
Kreatinin (μ mol/l \pm SD) (Ref.: M<102, F<88 μ mol/l)	102,0 \pm 74,4	122,7 \pm 116,0	0,146****
Total-Cholesterol (mmol/l \pm SD) (Ref.: <6,2mmol/l)	4,6 \pm 1,3	4,3 \pm 1,2	0,085****
HDL-cholesterol (mmol/l \pm SD) (Ref.: >1,5mmol/l)	1,04 \pm 0,4	0,98 \pm 0,4	0,217****

LDL-cholesterol (mmol/l \pm SD) (Ref.: <3,9mmol/l)	2,8 \pm 1,0	2,7 \pm 1,0	0,502****
Triglyzeride (mmol/l \pm SD) (Ref.: M<1,6, F<2,3mmol/l)	1,7 \pm 2,7	1,4 \pm 0,7	0,361****

* t-Test nach Students

** Yates Korrektur

*** Exakter Test nach Fisher

**** Mann-Whitney-U-Test

Das Vorliegen einer schweren Parodontitis wurde nicht als signifikanter Prädiktor für das Auftreten eines kardiovaskulären Sekundärereignisses bestätigt (Tabelle 29). Jedoch wurde gezeigt, dass Patienten mit Sekundärereignis einen signifikant erhöhten Plaqueindex aufwiesen ($p < 0,001$). Im Gegensatz dazu waren Patienten ohne Sekundärereignis 3-mal häufiger Träger des parodontopathogenen Keimes *A.actinomycescomitans* ($p = 0,075$) und fast doppelt so häufig Träger des Keimes *E.corrodens* ($p < 0,001$).

Tabelle 29: Zahnärztlich klinische Daten der Koronarpatienten, einschließlich der subgingivalen Besiedlung mit parodontopathogenen Bakterien (P: Patienten, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, DMF: „decayed, missing filled“).

	P. ohne Sekundär- ereignis (n=873)	P., die Sekundärer- ereignis erlitten (n=68)	p-Wert
<i>Schwere Parodontitis (%)</i>	47,0	57,4	0,127*
<i>Zahnärztlich klinische Parameter</i>			
Plaqueindex (MW \pm SD)	1,04 \pm 0,8	1,29 \pm 0,7	0,001**
Sulkusblutungsindex (MW \pm SD)	9,5 \pm 13,8	11,6 \pm 15,8	0,211**
Sondiertiefe in mm (MW \pm SD)	3,5 \pm 0,9	3,7 \pm 1,0	0,190**
Klinischer Attachmentverlust in mm (MW \pm SD)	4,3 \pm 1,5	4,5 \pm 1,4	0,092**
Fehlende Zähne (außer 8.) (MW \pm SD)	11,5 \pm 7,6	13,3 \pm 7,1	0,056**
Kariöse Zähne (MW \pm SD)	0,29 \pm 0,9	0,32 \pm 0,9	0,581**
Gefüllte Zähne (MW \pm SD)	5,7 \pm 4,1	5,0 \pm 4,6	0,057**
DMF Index (MW \pm SD)	17,4 \pm 6,7	18,6 \pm 6,9	0,160**

Früher Zahnverlust infolge Zahnlockerung bei Verwandten 1. Grades (%)	1,8	5,9	0,050*
<i>Positiver subgingivaler Bakteriennachweis</i>			
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (%)	10,4	2,9	0,075*
Roter Komplex			
<i>P. gingivalis</i> (%)	63,0	69,1	0,380*
<i>T. forsythia</i> (%)	77,2	73,5	0,587*
<i>T. denticola</i> (%)	60,5	55,9	0,537*
Oranger Komplex			
<i>P. intermedia</i> (%)	23,5	22,1	0,906*
<i>P. micros</i> (%)	78,4	79,4	0,959*
<i>F. nucleatum</i> (%)	97,9	95,6	0,402*
<i>C. rectus</i> (%)	62,1	58,8	0,686*
<i>E. nodatum</i> (%)	31,0	25,0	0,366*
Grüner Komplex			
<i>E. corrodens</i> (%)	71,9	48,5	<0,001*
<i>C. sputigena</i> , <i>C. gingivalis</i> , <i>C. ochracea</i> (%)	69,8	60,3	0,136*

* Yates Korrektur

** Mann-Whitney-U-Test

4.4.2 Die Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A im TNF α -Gen als mögliche Prädiktoren für ein kardiovaskuläres Sekundärereignis

Es wurde die Bedeutung der Genotyp-, Allel- und Haplotypverteilung der TNF α -SNPs c.-308G>A und c.-238G>A als prognostische Faktoren für einen Myokardinfarkt, Schlaganfall sowie einen kardialen Tod untersucht. Es wurde gezeigt, dass weder die Genotyp-, noch die Allelverteilung als Prädiktoren für das Eintreten eines definierten Sekundärereignisses herangezogen werden können (Tabelle 30).

Tabelle 30: Bedeutung der Genotyp-, Allel- und Haplotypverteilung (c.-308G>A, c.-238G>A) als mögliche Prädiktoren für ein kardiovaskuläres Sekundärereignis.

	Patienten ohne Sekundärereignis	Patienten, die Sekundärereignis erlitten	p-Wert
Genotypen	(n=873)	(n=68)	
c.-308G>A			
GG (%)	70,0	63,2	
AG (%)	27,1	35,3	
AA (%)	2,9	1,5	0,340*
AG+AA (%)	30,0	36,8	0.304**
c.-238G>A			
GG (%)	90,1	92,6	
AG (%)	9,5	7,4	
AA (%)	0,4	0	0,736*
AG+AA (%)	9,9	7,4	0.647**
Allele	(n=1746)	(n=136)	
c.-308G>A			
G (%)	83,6	80,9	
A (%)	16,4	19,1	0,491**
c.-238G>A			
G (%)	94,9	96,3	
A (%)	5,1	3,7	0,598**
Haplotypkombinationen	(n=873)	(n=68)	
c.-308G>A/c.-238G>A			
GG-GG (%)	61,5	55,9	
GG-AG (%)	25,8	35,3	
GG-GA (%)	8,0	7,4	
AG-AG (%)	2,9	1,5	
AG-GA (%)	1,5	0	
GA-GA (%)	0,3	0	0,644*
Haplotypen, mit mind. 1 A-Allel (%)	38,5	44,1	0,431**
Haplotypen	(n=1746)	(n=136)	
GG (%)	78,5	77,2	
AG (%)	16,5	19,1	
GA (%)	5,0	3,7	0,593**

* Exakter Test nach Fisher, ** Yates Korrektur

In weiteren Untersuchungen wurde der Zeitraum bis zur Manifestation des Sekundärereignisses in der statistischen Evaluation berücksichtigt. Sowohl die Genotyp-, die Allel- und die Haplotypverteilung der Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A im TNF α -Gen wurden nicht als prognostische Faktoren für einen Myokardinfarkt, einen Schlaganfall oder kardiovaskulären Tod bestätigt (Abbildung 14).

Bei Berücksichtigung weiterer, kardiovaskuläre Sekundärereignisse möglicherweise beeinflussender Faktoren, wie Alter, Geschlecht, Rauchen, Diabetes mellitus oder schwere Parodontitis erwies sich die genetische Konstellation (c.-308G>A und c.-238G>A-SNP im TNF α -Gen) ebenfalls nicht als Prädiktor für Sekundärereignisse (Tabelle 31). Bei Betrachtung der Genotyp-, der Allel- und der Haplotypfrequenzen wurde nur das Vorliegen von Diabetes mellitus als prognostischer Faktor bestätigt.

In Tabelle 32 sind die Ergebnisse der Cox-Regression dargestellt, unter Berücksichtigung des Plaqueindexes als weiteren, möglicherweise kardiovaskuläre Sekundärereignisse beeinflussenden, Marker. Auch hier wurde die genetische Konstellation nicht als Prädiktor für kardiovaskuläre Sekundärereignisse bestätigt. Es wurde jedoch die prognostische Bedeutung des Plaqueindexes als signifikanter prognostischer Marker für kardiovaskuläre Sekundärereignisse hervorgehoben.

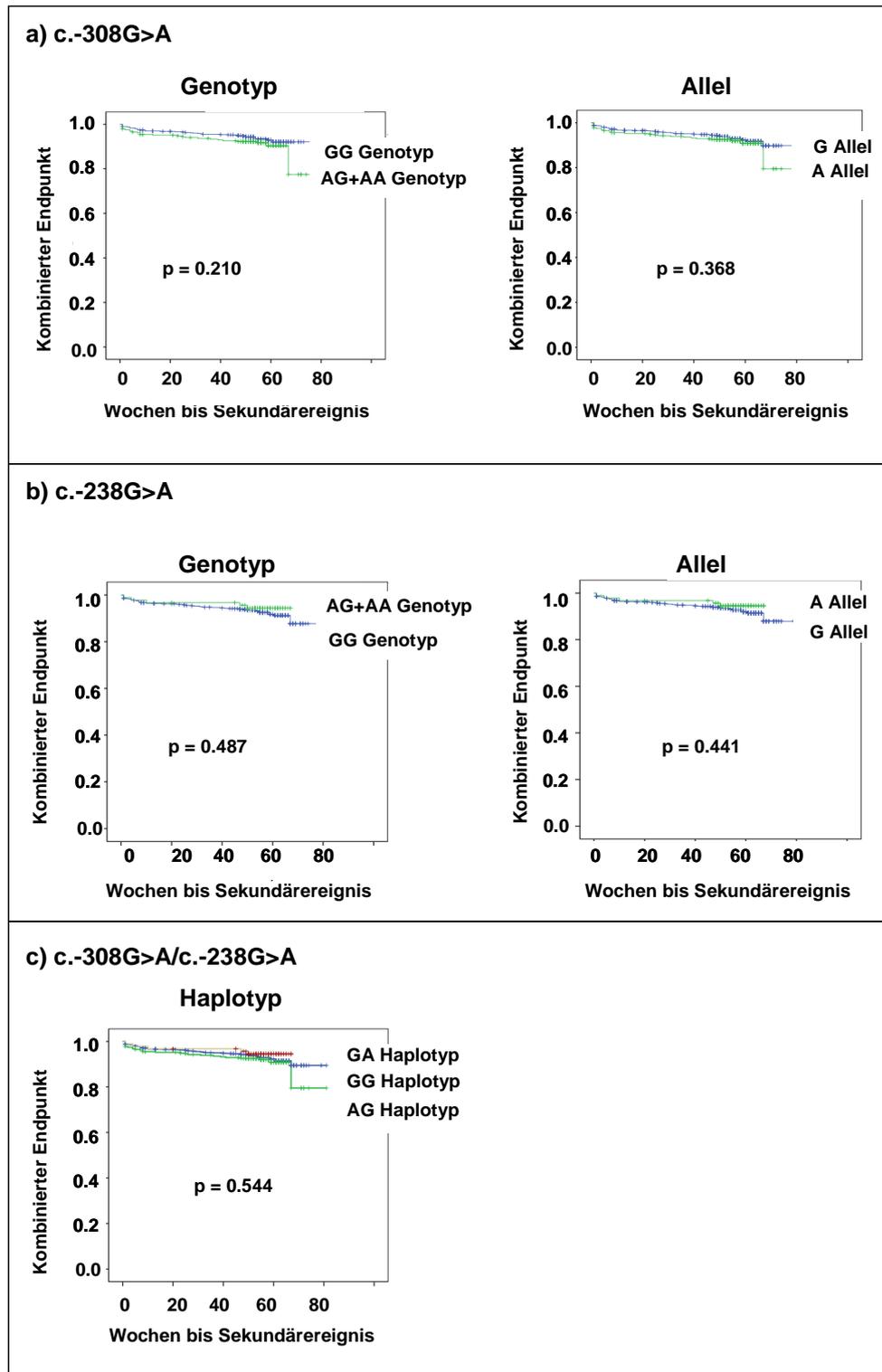


Abbildung 14: Kaplan-Meier Plot für den Einfluss der Genotyp- und Allelkonstellation des c.-308G>A Polymorphismus (a), c.-238G>A Polymorphismus (b) und die Haplotypverteilung auf das Auftreten von kardiovaskulären Sekundäreignissen (Myokardinfarkt, Schlaganfall und kardiovaskulärer Tod). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Log-rank-Test.

Tabelle 31: Cox-Regression (schrittweise vorwärts) für das Eintreten eines kardiovaskulären Sekundärereignis (Myokardinfarkt, Schlaganfall, kardiovaskulärer Tod) in Abhängigkeit der Kofaktoren Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Diabetes mellitus, Parodiagnostik und

a) der Genotypverteilung des $TNF\alpha$ -SNPs c.-308G>A und c.-238G>A

b) der Allelverteilung des $TNF\alpha$ -SNPs c.-308G>A und c.-238G>A sowie die Haplotypverteilung c.-308G>A/c.-238G>A.

Für alle Genotypen, Haplotypen und Allele wurden jeweils separate Cox-Regressionen durchgeführt.

Signifikante Variable	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert	Hazard Ratio	Konfidenzintervall (95%)
a) eingeschlossene Variablen					
Diabetes mellitus	0,50	0,25	0,044	1,64	1,02-2,65
ausgeschlossene Variablen					
Genotyp: c.-308G>A			0,247		
Genotyp: c.-238G>A			0,490		
b) eingeschlossene Variablen					
Diabetes mellitus	0,48	0,17	0,006	1,62	1,15-2,26
schwere Parodontitis	0,36	0,17	0,040	1,43	1,02-2,01
ausgeschlossene Variablen					
Allel: c.-308G>A			0,459		
Allel: c.-238G>A			0,425		
Haplotyp: c.-308G>A/c.-238G>A			0,901		

Tabelle 32: Cox-Regression (schrittweise vorwärts) für das Eintreten eines kardiovaskulären Sekundärereignis (Myokardinfarkt, Schlaganfall, kardiovaskulärer Tod) in Abhängigkeit der Kofaktoren Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Diabetes mellitus, Plaqueindex und

a) der Genotypverteilung des $TNF\alpha$ -SNPs c.-308G>A und c.-238G>A sowie die Haplotypverteilung c.-308G>A/c.-238G>A

b) der Allelverteilung des $TNF\alpha$ -SNPs c.-308G>A und c.-238G>A.

Für alle Genotypen, Haplotypen und Allele wurden jeweils separate Cox-Regressionen durchgeführt.

Signifikante Variable	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert	Hazard Ratio	Konfidenzintervall (95%)
a) eingeschlossene Variablen					
Plaqueindex	0,01	0,004	0,017	1,01	1,002-1,01
ausgeschlossene Variablen					
Genotyp: c.-308G>A			0,217		
Genotyp: c.-238G>A			0,517		
b) eingeschlossene Variablen					
Diabetes mellitus	0,431	0,17	0,013	1,54	1,19-2,16
Plaqueindex	0,010	0,01	0,003	1,01	1,003-1,01
ausgeschlossene Variablen					
Allel: c.-308G>A			0,416		
Allel: c.-238G>A			0,482		
Haplotyp: c.-308G>A/c.-238G>A			0,989		

5 Diskussion

Komplexe entzündliche Erkrankungen und deren Wechselwirkungen stehen heute immer mehr im Mittelpunkt vieler klinisch-genetischer Studien. Bereits seit längerem wird ein Zusammenhang zwischen der Parodontitis und systemischen Entzündungserkrankungen, wie atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen vermutet. Neben exogenen Faktoren (wie Rauchen oder Stress), die die Entstehung entzündlicher Erkrankungen befördern können, wird zunehmend auch eine genetische Prädisposition in inflammatorischen Kandidatengen als Erkrankungsursache diskutiert. Veränderungen innerhalb der genomischen DNA-Sequenz können funktionelle Störungen auf RNA- oder Proteinebene verursachen. Polymorphe Varianten können die Transkriptionsrate von Genen und damit die Menge an verfügbarer mRNA beeinflussen (208-210). Dies kann zur verminderten bzw. verstärkten Expression des entsprechenden Proteins führen. Bedingt durch die veränderte Verfügbarkeit des biologisch aktiven Enzyms oder Rezeptors werden möglicherweise komplexe Stoffwechselwege beeinträchtigt und damit die Manifestation von Erkrankungen befördert. So erhöht z.B. eine genotypabhängig veränderte Expression von Interleukin 18 die Suszeptibilität für Atherosklerose (211). Darüber hinaus können genetische Besonderheiten direkt zu Veränderungen in der Aminosäuresequenz von Proteinen führen, und so die Funktion des Proteins beeinflussen. Durch eine Punktmutation wird z.B. im Gerinnungsfaktor V an Position 506 des Proteins Arginin durch Glutamin ersetzt. Durch diese Substitution wird der Abbau des Faktor V durch das aktivierte Protein C inhibiert (APC-Resistenz). Patienten mit heterozygotem bzw. homozygotem Genotyp weisen eine erhöhte Thromboseneigung verbunden mit einer gesteigerten Anfälligkeit für kardiovaskuläre Erkrankungen auf (212).

Deshalb bildet die Untersuchung genomischer Varianten von Kandidatengen und deren funktionelle Konsequenzen eine wichtige Grundlage für die weitere Prävention, Diagnostik und Prognostik von inflammatorischen Erkrankungen.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte zum einen ein Beitrag zur detaillierteren Charakterisierung der individuellen genetischen Risikokonstellation bei schweren Parodontitiden geleistet werden. Zum anderen sollte die Bedeutung einer genetischen Prädisposition als prognostischer Marker für kardiovaskuläre Sekundärereignisse (Mykardinfarkt, Schlaganfall, kardiovaskulärer Tod) analysiert werden. Hierfür wurden genomische und funktionelle Untersuchungen zum Tumornekrosefaktor alpha, einem Kandidatengen der Parodontitis- und Atheroskleroseentstehung, auf DNA-, RNA- und Proteinebene durchgeführt.

5.1 Regulation des TNF α - Funktionelle Auswirkungen von polymorphen Besonderheiten im TNF α -Gen – Studie A

Der humane Tumornekrosefaktor alpha ist an der Regulation einer Vielzahl von immunologischen Prozessen beteiligt, welche eine wichtige Rolle sowohl bei der wirtspezifischen Abwehr als auch bei der Pathogenese verschiedener komplexer Erkrankungen spielen. Eine sensible Regulation der Expression dieses pro-inflammatorischen Zytokins ist von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems. Der Spiegel an membrangebundenem und zirkulierendem TNF α , dessen Aktivität und Synthese- bzw. Turnover-Rate unterliegen der strengen Kontrolle von exogenen und endogenen Faktoren.

Es wurde gezeigt, dass sowohl die Aktivität der TNF α -prozessierenden Metalloproteinasen (213) als auch der Plasmaspiegel weiterer Zytokine (214) eine wichtige Rolle bei der Regulation der biologischen Verfügbarkeit von TNF α spielen. Weiterhin sind für die Wirkung von TNF α die Aktivität und der Spiegel von löslichen (215) sowie membrangebundenen TNF-Rezeptoren von großer Bedeutung (216).

Die Vielfalt der Regulationsmechanismen auf verschiedenen Ebenen, wie z.B. auf der Ebene der Transkription, der prä-mRNA Prozessierung, der mRNA Stabilität und der Translation spiegeln die Komplexität der Kontrolle wider, der die TNF α -Expression unterliegt (217-223).

Einen wichtigen Stellenwert bei der Steuerung der TNF α -Aktivität auf der Ebene der Transkription werden polymorphen Veränderungen des TNF α -Gens beigemessen (224). Die am intensivsten funktionell untersuchten SNPs im TNF α -Gen sind die Promotorpolymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A. Beide SNPs liegen in einem genomischen Bereich, der Sequenzhomologien zu einer Y-Box, einem typischen Regulationsmotiv von Promotoren der Gene der MHC-Klasse II-Moleküle aufweisen (225). Veränderungen in diesem Bereich könnten deshalb in einer veränderten TNF α mRNA-Expression resultieren. In einem Mausmodell wurde gezeigt, dass durch Sequenzveränderungen innerhalb dieser Y-Box, vermittelt durch das veränderte Bindungsvermögen von NF κ B, die TNF α -Transkriptionsrate beeinflusst werden kann (226). Jedoch sind die Ergebnisse der vorliegenden *in vitro* und *ex vivo* Studien bezüglich der funktionellen Auswirkungen dieser Polymorphismen hoch kontrovers (135).

Deshalb wurden für unsere Studie eigene funktionelle Voruntersuchungen zur Bedeutung von TNF α -Polymorphismen für die Expression auf transkriptioneller bzw. translationeller Ebene durchgeführt. Für diese Voruntersuchungen wurden Patienten mit koronarer Herzerkrankung ausgewählt, da in der sich anschließenden Studie die Bedeutung der genetischen Konstellation für die Schwere einer

parodontalen Erkrankung und für die Prognose eines kardiovaskulären Zweitereignisses ebenfalls an Koronarpatienten evaluiert werden sollte.

Es wurden SNPs im Promotor (c.-863C>A, c.-857C>T, c.-308G>A, c.-238G>A), im Exon 2 (P84L) sowie im Intron 3 (IVS3+51A>G) des TNF α -Gens untersucht. Wir zeigten in unserer Studie, dass ausschließlich der SNP c.-238G>A im TNF α -Promotor mit einer veränderten mRNA-Expression assoziiert war. Das A-Allel korrelierte mit einer erhöhten TNF α mRNA-Expression (A-Allel: 8,4 \pm 6,1 ag/Zelle vs. G-Allel: 6,5 \pm 6,1 ag/Zelle) in nativen Monozyten. Im Gegensatz dazu wurde in einer weiteren *ex vivo* Studie an Patienten mit rheumatoider Arthritis eine Erhöhung der TNF α mRNA-Expression bei GG-Genotypträgern gezeigt (144). Im Einklang dazu war das A-Allel in einer *in vitro* Studie an B-Zell- (Raji-Zellen) und T-Zelllinien (Jurkat Zellen) mit einer erniedrigten TNF α mRNA-Expression assoziiert (156). Diese differenten Ergebnisse könnten zum einen Indikator für Unterschiede in der Regulation des TNF α im Rahmen der angeborenen (Monozyten) bzw. adaptiven Immunabwehr (Lymphozyten) sein. Zum anderen wird die Genexpression auch durch die metabolische Komplexität *in vivo* beeinflusst, bedingt u.a. durch krankheitsbedingt veränderte Stoffwechselsituationen, und ist nicht mit den Daten von *in vitro* Studien vergleichbar.

In unserer Studie wurde die mit dem A-Allel des SNP c.-238G>A assoziierte mRNA-Erhöhung jedoch nicht mit einer Erhöhung der Plasmaproteinexpression korreliert. Auch in anderen Patienten-assoziierten Studien wurde kein Zusammenhang zwischen dem SNPs c.-238G>A und der TNF α -Plasmaproteinexpression gezeigt werden (159, 160). Diese Ergebnisse lassen einen weiteren wichtigen post-transkriptionellen Mechanismus vermuten, der eine sensible Regulation der TNF α -Plasmaproteinverfügbarkeit erlaubt. Auch in Untersuchungen an humanen Blutkulturen oder mononukleären Zellen wurde nach LPS-Stimulation keine genotypabhängige Änderung der Proteinexpression gezeigt (135, 149, 157, 158). Im Gegensatz dazu wurde der SNP c.-238G>A mit einer veränderten TNF α -Proteinexpression bei Patienten mit Sarkoidose oder Multipler Sklerose assoziiert (148, 161). Nicht auszuschließen ist jedoch, dass diese Assoziation durch weitere, in diese komplexen Krankheitsgeschehen involvierte Faktoren beeinflusst werden könnte.

Für den SNP an Position c.-308G>A wurde in der vorliegenden Arbeit keine Assoziation zur mRNA-Expression in Monozyten und zur Plasmaproteinexpression nachgewiesen. Für diesen Polymorphismus ist die Datenlage ebenfalls kontrovers. Während in *ex vivo* Studien keine übereinstimmenden Ergebnisse für die Bedeutung der genetischen Konstellation auf TNF α -Expression (mRNA und/oder Protein)

gezeigt wurden (142-154), wurde in *in vitro*-Studien (Transfektionsanalysen) das A-Allel mit einer erhöhten TNF α -Expression assoziiert (137-140). Auch hier könnten die unterschiedlichen Ergebnisse u.a. durch das komplexe Zusammenspiel weiterer, die Regulation der TNF α -Expression beeinflussender, Mediatoren *in vivo* zurückzuführen sein. In unserer Studie wurde diesbezüglich gezeigt, dass die TNF α Plasmaproteinexpression mit einem erhöhten Lebensalter, sowie einem erhöhtem Body Mass Index und Harnsäurespiegel korreliert ist. Diese Ergebnisse stehen im Einklang zu Untersuchungen anderer, die ebenfalls eine Korrelation des TNF α zum Alter (227, 228), zum Body Mass index (229, 230) und zum Harnsäurespiegel (231, 232) nachwiesen.

Es ist bekannt, dass das Altern durch einen leichten Anstieg inflammatorischer Aktivität, verbunden u.a. mit einer Erhöhung des Zytokin-Serumspiegels, gekennzeichnet ist (227). Ebenso wurde in anderen Studien eine Altersabhängigkeit des Harnsäurespiegels (233) und des Body Mass Indexes (234) beschrieben, welche in der vorliegenden Studie jedoch für beide Parameter nicht bestätigt wurde. Harnsäure und Body Mass Index waren, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer (235, 236) schwach positiv korreliert (Korrelationskoeffizient nach Spearman, $r=0,186$, $p<0,016$). Beide Marker wurden mit einer verstärkten Entzündungsaktivität assoziiert und spielen damit ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Manifestation und Progression komplexer Erkrankungen (237, 238). Daraus schlussfolgernd trägt eine Erhöhung der inflammatorischen Aktivität als ein starker unabhängiger Risikofaktor zur allgemeinen Morbidität und Mortalität bei kardiovaskulären Erkrankungen bei.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von den in dieser Studie untersuchten TNF α -Polymorphismen ausschließlich der SNP c.-238G>A bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen mit der mRNA-Expression des TNF α in Monozyten korreliert war. Keiner der Polymorphismen zeigte Auswirkungen auf die TNF α -Proteinexpression im Serum. Der TNF α -Serumspiegel wurde mit dem Alter der Patienten, dem Body Mass Index und dem Harnsäurespiegel korreliert.

5.2 Die Bedeutung der SNPs c.-308G>A und c.-238G>A für das Auftreten von schweren Parodontitiden – Studie B

Bereits 1997 wies Kornman darauf hin, dass neben der als Auslöser von entzündlichen Parodontitiden charakterisierten mikrobiellen Plaque auch die individuelle inflammatorische Wirtsreaktion eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielt (239). Die individuelle Entzündungskompetenz in der Ätiologie von Parodontitiden wird u.a. durch genetische Varianten in den für die

Immunantwort relevanten Genen getriggert (240). Untersuchungen an mono- und dizygoten Zwillingspärchen bestätigten, dass genetische Besonderheiten als kausale Faktoren für die unterschiedlichen Verläufe der Parodontitis anzusehen sind (241). Aufgrund der exponierten Stellung des Tumornekrosefaktors α im entzündlichen Geschehen wurde bereits in verschiedenen klinischen Studien die Bedeutung genetischer Besonderheiten in diesem Gen für die Ätiologie von entzündlichen Parodontitiden untersucht. In diesen Studien wurden bisher Polymorphismen im Promotor des Gens (c.-1030T>C, c.-863C>A, c.-857C>T, c.-308G>A und c.-238G>A) und deren mögliche Assoziation zu schweren Parodontitiden untersucht. In wenigen Fall-Kontrollstudien mit geringer Fallzahl (46 bzw. 64 japanische Parodontitispatienten) wurde die Assoziation der Polymorphismen an Position -1030, -863 und -857 auf das parodontale Geschehen untersucht (169, 176). Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind jedoch widersprüchlich. Die größte Beachtung wurde den funktionell bedeutsamen Polymorphismen an Position -308 und -238 beigemessen (siehe Tabelle 3).

Im Rahmen der vorliegenden retrospektiven Fall-Kontroll-Studie sollten mögliche Assoziationen zwischen der genetischen Konstellation im $\text{TNF}\alpha$ -Gen und chronischer bzw. aggressiver Parodontitis getestet werden. Das Studiendesign einer Fall-Kontroll-Studie wurde gewählt, da im Vorfeld an koronar unauffälligen Parodontitispatienten und parodontal Gesunden abgeklärt werden sollte, ob die SNPs c.-308G>A und c.-238G>A das Risiko an einer schweren Parodontitis zu erkranken, beeinflussen könnten. Mit Hilfe dieses Studienansatzes können keine absoluten Risiken bzw. kausale Zusammenhänge aufgedeckt werden. Jedoch ist die Fall-Kontroll-Studie eine sehr kostengünstige Untersuchungsmethode, um schnell valide Aussagen zu krankheitsassoziierten relativen Risiken eines oder mehrerer Faktoren treffen zu können (242).

Wir belegten in unserer Studie Assoziationen zwischen polymorphen Varianten im $\text{TNF}\alpha$ -Gen und schweren Parodontitiden. Patienten mit schwerer Parodontitis waren signifikant häufiger Träger des GG-Genotyps ($p=0,030$) bzw. G-Allels ($p=0,031$) des c.-238G>A Polymorphismus als parodontitisfreie Kontrollprobanden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Ergebnissen vorangegangener Fall-Kontroll-Studien, in denen keine Assoziation zwischen dem Auftreten schwerer Parodontitiden und diesem SNP gezeigt wurden (169, 176-178). Diese Diskrepanz könnte zum einen durch ethnisch bedingte Besonderheiten in der Genotyp-Verteilung hervorgerufen worden sein. So zeigten Pooja et al., 2011, dass in verschiedenen ethnischen Gruppen die Genotypverteilung des $\text{TNF}\alpha$ Polymorphismus c.-238G>A different ist (243). Somit könnte in verschiedenen

Bevölkerungsgruppen diese genetische Variante möglicherweise andere krankheitsbezogene Assoziationen aufweisen. Darüber hinaus spielt es eine wesentliche Rolle, ausreichend Patienten und Kontrollen zu integrieren, um statistische Fehler zu minimieren und einen durch genetische Varianten bedingten Effekt zu erkennen. Die kleinen Fallzahlen der vorliegenden Studien (zwischen 32 und 90 Parodontitispatienten) könnten, bedingt durch eine möglicherweise zu geringe Power ($1-\beta$), dazu führen, dass ein tatsächlich vorhandener Zusammenhang nicht erkannt werden kann. Auch in unserer Studie ist die Aussagekraft der Ergebnisse durch eine niedrige Power beeinträchtigt (Power von 57% für Genotypverteilung und 56% für Allelverteilung) und erfordert das Reproduzieren der Ergebnisse an größeren Patientengruppen. Darüber hinaus ist Parodontitis eine multifaktorielle entzündliche Erkrankung, deren Manifestation durch das Zusammenspiel einer Vielzahl exogener und endogener Faktoren bestimmt wird. Klassische Risikofaktoren der Parodontitis sind neben beeinflussbaren Risikofaktoren, wie z.B. Rauchen, auch Faktoren wie männliches Geschlecht und Alter (244-249). Deshalb wurde in unserer Studie ein komplexes Risikomodell zur Beurteilung des genetischen Einflusses auf das Auftreten von Parodontitiden herangezogen. Nach Einschluss der Kofaktoren Alter, männliches Geschlecht, Raucherstatus und approximaler Plaqueindex in die logistische Regression wurden sowohl der GG-Genotyp als auch das G-Allel als unabhängige Risikofaktoren für schwere Parodontitiden bestätigt.

Für den c.-308G>A Polymorphismus im $TNF\alpha$ -Gen wurden im bivariaten Vergleich ebenfalls Assoziationen zum Auftreten von Parodontitiden gezeigt. Das A-Allel ($p=0,040$) und der AG+AA-Genotyp (n.s.) waren mit einem erhöhten Risiko für schwere parodontale Erkrankungen korreliert. Nach Einbeziehung weiterer parodontaler Kofaktoren (Rauchen, männliches Geschlecht, Alter, approximaler Plaqueindex) wurde das A-Allel als unabhängiger Risikofaktor evaluiert. Unsere Daten stehen in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Erciyas et al., 2010, die ebenfalls ein erhöhtes parodontales Risiko für AG-Genotypträger des c.-308G>A SNP nachwiesen (164). Andere zeigten demgegenüber, dass Patienten mit schwerer Parodontitis häufiger GG-Genotypträger waren (165, 166). Weitere Studien zeigten keine Assoziation zwischen c.-308G>A SNP und dem Auftreten von parodontalen Erkrankungen (168-176). Auch für die klinischen Assoziationsstudien zum SNP c.-308G>A treffen die im oberen Abschnitt bereits ausgeführten Limitationen zu, die den direkten Vergleich zu unserer Studie erschweren.

Des Weiteren wurde in unserer Studie zum ersten Mal eine Assoziation des $TNF\alpha$ -Haplotyps c.-308G>A/c.-238G>A zu parodontalen Erkrankungen gezeigt. Im

komplexen Risikomodell wurde der TNF α -Haplotyp jedoch nicht als unabhängiger Risikoindikator bestätigt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die SNPs c.-308G>A und c.-238G>A im TNF α -Gen innerhalb der Grenzen unserer Studie, zum Auftreten von schweren Parodontitiden (aggressive und chronische Parodontitis) assoziiert sind.

5.3 TNF α -SNPs c.-308G>A und c.-238G>A und parodontale Risikofaktoren

Für den c.-238G>A Polymorphismus wurde in unserer Studie eine Assoziation des GG-Genotyps zu einer erhöhten Sulkusblutungsneigung nach Sondierung gezeigt. Sowohl im bivariaten als auch im multivariaten Vergleich bei Berücksichtigung der Kofaktoren Alter, Geschlecht, Raucherstatus und approximaler Plaqueindex wurde in der Gesamtstudiengruppe die Bedeutung des GG-Genotyps für die Sulkusblutungsneigung bestätigt. Als eine mögliche Ursache dieser GG-Genotyp assoziierten erhöhten Blutungsneigung könnte eine höhere bakterielle Belastung dieser Genotypträger diskutiert werden. Tatsächlich wurde gezeigt, dass in der Gesamtstudiengruppe bei GG-Genotypträger häufiger *P.gingivalis* in der subgingivalen Plaque nachzuweisen war. In einer Studie belegten Andrukhov et al., dass das Vorkommen von *P.gingivalis* mit einem erhöhten Serumspiegel an TNF α verbunden war (250). In *ex vivo* und *in vitro* Blutkulturen wurde ebenso gezeigt, dass parodontpathogene Keime in der Lage sind die TNF α -Expression zu induzieren (251, 252). Der TNF α -Serumspiegel unterliegt einer strengen Kontrolle. Als mögliche Regulatoren werden auch genetische Besonderheiten diskutiert (134, 135). Obwohl wir in eigenen Voruntersuchungen an Koronarpatienten keine Assoziation des TNF α -Genotyps zur TNF α -Serumkonzentration zeigten (167), wurde in anderen Studien eine genotypabhängige Veränderung der TNF α -Expression belegt (148, 161).

5.4 Longitudinalstudie „Parodontitis als Risikofaktor für koronare Sekundärereignisse“ – Studie C: Basisuntersuchungen

In den Basisuntersuchungen der Longitudinalstudie C sollte die Bedeutung dieser SNPs als Risikoindikatoren für eine schwere Parodontalerkrankung an einer Kohorte mitteldeutscher Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen analysiert werden.

5.4.1 Differenzierung des Patientenkollektivs

Für die Querschnittsuntersuchungen wurden Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen konsekutiv eingeschlossen und hinsichtlich ihres Parodontalstatus differenziert. Für die Beurteilung der Schwere der Parodontalerkrankung (schwere Parodontitis: approximaler Attachmentverlust von $\geq 3\text{mm}$ in $\geq 30\%$ der Zähne) wurde hierbei die Einteilung nach Tonetti et al., 2005 herangezogen (202). Unter Berücksichtigung der klassischen parodontalen Risikofaktoren, Rauchen und männliches Geschlecht (244-248), traten in der vorliegenden Studie in der Gruppe mit schwerer Parodontitis signifikant häufiger Männer und Raucher auf.

In unserer Studie belegten wir, dass Patienten mit schwerer Parodontitis signifikant höhere Serumwerte der Entzündungsmarker C-reaktives Protein (CRP) und Interleukin 6 aufwiesen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, in denen ebenfalls erhöhte Interleukin 6- bzw. CRP-Serumspiegel mit dem Auftreten von Parodontitiden assoziiert wurden (97, 253-256). Darüber hinaus wiesen wir in unserer Studie in Übereinstimmung mit den Daten anderer (257) eine positive Korrelation zwischen dem IL-6- und dem CRP-Spiegel nach (Korrelationskoeffizient nach Spearman, $r=0,551$, $p<0,001$). Wie bereits beschrieben wurde, induziert IL-6 in der Leber die Produktion von Akutphaseproteinen, wie z.B. dem CRP (258). Erhöhte Werte sowohl an IL-6 als auch an CRP werden als Risikomarker für kardiovaskuläre (259, 260) und parodontale Erkrankungen diskutiert (257). Deshalb unterstützen unsere Ergebnisse die These, dass parodontale Entzündungen - vermittelt durch systemisch wirkende Faktoren wie IL-6 und CRP - vaskuläre inflammatorische Prozesse der Atheroskleroseentstehung befördern.

Darüber hinaus zeigten wir, dass bei Patienten mit schwerer Parodontitis der Kreatininspiegel signifikant erhöht war. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass bei Parodontitispatienten die Nierenfunktion und damit die Clearance von Kreatinin eingeschränkt sind. Im Einklang dazu zeigten andere Arbeitsgruppen, dass das Vorliegen einer Parodontalerkrankung das Risiko für Nierenfunktionsstörungen erhöht (97, 261). Auch wiesen in unserer Studie Patienten mit akutem Nierenversagen während des Krankenhausaufenthaltes die signifikant höheren

Kreatininwerte auf (Patienten ohne Ereignis: $n=876$, $101,1 \pm 72,0 \mu\text{mol/l}$ vs. Patienten mit akutem Nierenversagen: $n=9$, $139,4 \pm 70,2 \mu\text{mol/l}$, $p=0,002$). Ein wichtiger Risikofaktor für Nierenerkrankung ist ein erhöhter Serumspiegel an CRP (262). Im Rahmen unserer Studie wurde eine positive Korrelation zwischen CRP- und Kreatininspiegel gezeigt (Korrelationskoeffizient nach Spearman, $r=0,153$, $p<0,001$).

Alle weiteren demographischen, anamnestischen und biochemischen Parameter waren nicht mit der Schwere der Parodontalerkrankung in der vorliegenden Studie assoziiert.

Wie zu erwarten wiesen die Patienten mit einer ausgeprägten Parodontalerkrankung hinsichtlich der dentalen Parameter, Plaqueindex, Sulkusblutungsindex, Sondiertiefe, klinischer Attachmentverlust, fehlende, kariöse bzw. gefüllte Zähne (DMF Index) die schwereren klinischen Symptome auf. Auch war die subgingivale bakterielle Belastung zur Schwere der Parodontitis assoziiert. Patienten mit schwerer Parodontalerkrankung wiesen eine signifikant höhere bakterielle Last im Vergleich zu Patienten ohne oder mit milder Parodontitis ($p<0,001$) auf. Jedoch war die Verteilung der einzelnen Bakterienspezies in den Patientensubgruppen unterschiedlich. Die Bakterien des roten (*P.gingivalis*, *T.forsythia*, *T.denticola*) und des orangen Komplexes (*P.intermedia*, *P.micros*, *C.rectus*, *E.nodatum*) waren in der Gruppe der Patienten mit schwerer Parodontitis signifikant häufiger präsent. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bisherigen Daten, die bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis eine stärkere subgingivale Besiedlung mit Bakterien des roten und orangen Komplexes belegen (263). Den Bakterien des roten Komplexes werden als sogenannte Spätbesiedler stark parodontopathogene Eigenschaften zugeschrieben (264). Es wurde für diese Bakterien gezeigt, dass sie in der Lage sind, ihre hohe parodontschädigende Wirkung über das Ausschütten einer Vielzahl an Proteasen zu vermitteln (265-268). Im orangen Komplex sind die sogenannten Brückenkeime zusammengefasst, die nach dem subgingivalen Auftreten der frühen Plaquebesiedler die Grundlage für das Wachstum der späten und hoch pathogenen Keime bilden. Auch Bakterien dieses Komplexes wird eine wichtige Bedeutung im parodontalen Geschehen zugeschrieben.

In Übereinstimmung mit der Studie von Rescala et al., 2010, zeigten in unserer Untersuchung Patienten mit schwerer Parodontitis kein signifikant häufigeres Vorkommen der Bakterien des grünen Komplexes (*E.corrodens*, *C.sputingena*, *C.gingivalis*, *C.ochracea*) und *A.actinomycetemcomitans* (263). Bakterien des grünen Komplexes und *A.actinomycetemcomitans* spielen eine wichtige Rolle in der Ätiologie von aggressiven Parodontitiden. In einer Studie von Heller et al. 2012

wurde belegt, dass *A.actinomycetemcomitans*, *C.sputigena* und *C.ochracea* bei Patienten mit aggressiver Parodontitis deutlich häufiger auftreten als bei Patienten mit chronischer Parodontitis (269). Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass in unserer Studie die schwer parodontal erkrankten Patienten hauptsächlich unter der chronischen Form litten und deshalb keine signifikanten Verteilungsunterschiede bezüglich dieser Bakterien auftraten.

5.4.2 Die Rolle der Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A als Risikoindikatoren für die Schwere einer parodontalen Erkrankung bei Koronarpatienten

In der vorliegenden Studie sollte die Bedeutung von genetischen Varianten im TNF α -Gen (SNPs c.-308G>A und c.-238G>A) als mögliche Risikoindikatoren für schwere Parodontitis überprüft werden.

Für die in die Studie eingeschlossenen Koronarpatienten wurde keine Assoziation des genetischen Hintergrundes im TNF α -Gen (einschließlich der Genotyp-, Allel- und Haplotypfrequenzen) zum Auftreten schwerer Parodontitiden aufgezeigt. Im Gegensatz dazu zeigten wir in eigenen Voruntersuchungen für Kaukasier des Mitteldeutschen Raumes, dass der GG-Genotyp und das G-Allel des c.-238G>A Polymorphismus sowie das A-Allel des c.-308G>A Polymorphismus mit einer schweren Parodontitis assoziiert war. In dieser Voruntersuchung wurden die Patienten mit schweren Parodontitiden mit parodontitisfreien Kontrollen verglichen. In der Longitudinalstudie waren jedoch in der Subgruppe ohne oder mit milder Parodontitis (n=493) nur 22 parodontal gesunde Patienten. Verglich man die Genotyp- und Allelverteilungen des c.-238G>A Polymorphismus in den Patientengruppen der Longitudinalstudie mit den hochselektierten parodontal Gesunden der Pilotstudie (Studie B), so waren die parodontal erkrankten Koronarpatienten häufiger GG-Genotyp- (parodontisfreie Kontrollen: 82,4% vs. keine bzw. milde Parodontitis: 91,5%, $p_{\text{korr.}}=0,014$, schwere Parodontitis: 89,1%, $p_{\text{korr.}}=0,108$) bzw. G-Allelträger (parodontisfreie Kontrollen: 90,7% vs. keine bzw. milde Parodontitis: 95,5%, $p_{\text{korr.}}=0,011$, schwere Parodontitis: 94,4%, $p_{\text{korr.}}=0,079$). Für den c.-308G>A Polymorphismus wurde eine vergleichbare Tendenz nicht ermittelt. Aus anderen klinischen Studien liegen bisher keine Ergebnisse bezüglich einer möglichen Assoziation genetischer Besonderheiten im TNF α -Gen (siehe Tabelle 3) und dem Auftreten von schweren Parodontitiden bei Koronarpatienten vor.

Da es sich in der Longitudinalstudie um eine Kohortenstudie an Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen handelte, könnten weitere Einflussfaktoren den möglichen genetischen Effekt auf die Manifestation der Parodontitis maskieren.

1002 Koronarpatienten der Klinik für Innere Medizin III der Martin-Luther-Universität, die die Einschlusskriterien erfüllten, wurden konsekutiv im Zeitraum 10/2009 bis 02/2011, zunächst ohne Berücksichtigung ihres Parodontalstatus, in die Studie eingeschlossen. Alle Patienten waren koronar vorbelastet und waren, da eine bestehende kardiovaskuläre Erkrankung mit dem Auftreten von Parodontitiden assoziiert ist, nicht mit den hochselektierten Probanden der Pilotstudie (Studie B) vergleichbar (99, 270). Auch wurden in der vorliegenden Longitudinalstudie Begleiterkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus (270, 271), Rheumatoide Arthritis (272, 273) oder Hypertonie (274), die ebenfalls zur Parodontitis assoziiert sind, nicht ausgeschlossen.

5.4.3 Besonderheiten im Gen für $\text{TNF}\alpha$ und parodontale Risikofaktoren

In einer multivariaten Risikoanalyse wurde eine Assoziation des c.-238G>A $\text{TNF}\alpha$ -Polymorphismus zum Level des klinischen Attachmentverlustes ermittelt. Bei Berücksichtigung des Plaqueindex, einer diabetischen Vorerkrankung, des Geschlechts, des Alters und des Raucherstatus wurde der AG+AA-Genotyp als unabhängiger Risikoindikator für einen höheren Attachmentverlust in der Gesamtstudiengruppe beschrieben. Berücksichtigt man, dass eine schwere Parodontitis mit einem stärkeren Attachmentverlust einhergeht, so wurde gezeigt, dass in der Gruppe mit schwerer Parodontitis tendenziell häufiger AG+AA-Genotypträger anzutreffen waren als in der Gruppe der Patienten ohne oder mit milder Parodontitis (Keine oder milde Parodontitis: 8,5% vs. schwere Parodontitis: 10,9%, $p_{\text{kor.}}=0,258$).

Diese Ergebnisse stehen nicht im Einklang mit den Resultaten unserer Voruntersuchungen, die eine Assoziation zwischen dem GG-Genotyp dieses SNPs und schwerer Parodontitis aufzeigten. Mögliche Ursache dieser Diskrepanz könnte wiederum darin begründet sein, dass bei den in die Longitudinalstudie eingeschlossenen Patienten aufgrund ihrer koronaren Vorerkrankung weitere Faktoren maßgeblich zur Entstehung der Parodontitis beitragen könnten (270).

In weiteren funktionellen Analysen wurde darüber hinaus ein Zusammenhang zwischen der Genotypverteilung des c.-238G>A Polymorphismus und dem Interleukin 6-Spiegel aufgezeigt. In der Gruppe ohne bzw. mit milder Parodontitis waren die GG-Genotyp- und die G-Allelträger mit einem erhöhten Serumspiegel an IL-6 assoziiert. Jedoch wurde diese Assoziation in der multivariaten Analyse nicht bestätigt. $\text{TNF}\alpha$ ist ein potenter Induktor der IL-6 Expression, das in der Leber die Ausschüttung von CRP anregt (258). Wie bereits beschrieben, wurde in unserer Studie eine positive Korrelation zwischen dem IL-6- und dem CRP-Spiegel

nachgewiesen. In Übereinstimmung dazu wurden bei GG-Genotyp- (GG: $15,6 \pm 26,7 \text{ mg/l}$ vs. AG+AA: $10,3 \pm 14,7 \text{ mg/l}$, $p=0,104$) und G-Allelträgern (G-Allel: $15,3 \pm 26,2 \text{ mg/l}$ vs. A-Allel: $10,1 \pm 14,5 \text{ mg/l}$, $p=0,139$) ebenfalls erhöhte CRP-Spiegel gemessen. In einer anderen klinischen Studie wurde jedoch keine Assoziation der Genotypverteilung dieses Polymorphismus zum IL-6- bzw. CRP-Spiegel an älteren dänischen Probanden nachgewiesen (275). Aufgrund der altersabhängigen Erhöhung der Serumspiegel sowohl des IL-6 als auch des CRPs (276, 277) lassen sich die Ergebnisse unserer Studie nur eingeschränkt mit den Resultaten der dänischen Studie vergleichen. IL-6 und CRP spielen im Einklang mit einer Vielzahl weiterer Entzündungsmediatoren eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Immunantwort. Demzufolge könnten sich in der vorliegenden Studie GG-Genotyp- bzw. G-Allelträger durch eine stärkere Immunantwort auszeichnen und damit besser in der Lage sein, auf parodontopathogene Keime zu reagieren. Übereinstimmend mit dieser Überlegung wiesen in unserer Studie GG-Genotypträger einen geringeren Attachmentverlust und seltener eine schwere Parodontitis auf.

Der $\text{TNF}\alpha$ -Polymorphismus c.-308G>A wurde in der Patientengruppe ohne bzw. mit milder Parodontitis zum Ausmaß der Sulkusblutung nach Sondierung korreliert. AG+AA-Genotypträger wiesen eine stärkere Sulkusblutungsneigung auf als GG-Genotypträger ($p=0,033$). Auch im komplexen Risikomodell unter Berücksichtigung der Kofaktoren Alter, männliches Geschlecht, Raucherstatus, Plaqueindex und Diabetes mellitus wurde diese Assoziation bestätigt ($p=0,002$). Gleichzeitig zeigten wir, dass die AG+AA-Genotypträger eine signifikant höhere subgingivale Belastung mit *P.intermedia* aufwiesen (bivariater Vergleich: $p_{\text{korr.}}=0,037$, multivariater Vergleich: $p=0,024$). Eine stärkere bakterielle Besiedlung mit *P.intermedia* wurde bereits mit einer erhöhten Sulkusblutungsneigung bzw. den schwereren parodontalen Symptomen in klinischen Studien assoziiert (278, 279). Jedoch zeigten andere einen ähnlichen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von *P.intermedia* Serotypen und dem Parodontalstatus nicht (280). Mögliche Ursache dieser unterschiedlichen Ergebnisse könnte darin begründet sein, dass die Zusammensetzung der subgingivalen Plaque bei Parodontitispatienten starken geografischen Schwankungen unterliegt (281). Bisher wurden keine Untersuchungen zur Bedeutung der genetischen Konstellation im $\text{TNF}\alpha$ -Gen für die subgingivale Besiedlung mit *P.intermedia* durchgeführt. In einer *in vitro* Studie an einer humanen Monozytenzelllinie wurde gezeigt, dass *P.intermedia* die Expression von $\text{TNF}\alpha$ unabhängig von weiteren Faktoren induziert und damit die Signaltransduktionskaskade der wirtsspezifischen Immunantwort anschalten kann

(282). Genetische Besonderheiten im TNF α -Gen könnten einen Einfluss auf das Vermögen des Organismus besitzen, durch die Regulation der TNF α -Expression in die individuelle Immunantwort einzugreifen (148, 161).

5.5 Longitudinalstudie „Parodontitis als Risikofaktor für koronare Sekundärereignisse“ – Studie C: einjähriges Follow-up

Ziel des Follow-ups war die Beurteilung der genetischen Besonderheiten im TNF α -Gen (c.-308G>A und c.-238G>A) als prognostische Marker für ein koronares Sekundärereignis (Myokardinfarkt, Schlaganfall, kardialer Tod).

5.5.1 Patientencharakterisierung entsprechend des kardiovaskulären Sekundärereignisses

Nach 52 bis 81 Wochen wurde ein Follow-up in Form eines standardisierten Fragebogens durchgeführt. Die Drop-Out Rate lag mit 0,2% weit unter der erwarteten Rate von ca. 10-20% (283). Mögliche Ursache dieser geringen Drop-Out Rate war die intensive und umfangreiche Befragung und die Recherche nach dem Verbleib der Patienten. Alle Patienten wurden zunächst postalisch kontaktiert und in einem ausführlichen Fragebogen u.a. nach kardiovaskulären Ereignissen und stattgefundenen Parodontalbehandlungen befragt. Bei Patienten, bei denen keine postalische Rückantwort erfolgte, wurden die Informationen telefonisch erfragt. Bei Versterben des Patienten wurden die zuletzt behandelnden Hausärzte oder Kliniken, bzw. die Standesämter bzgl. der Todesursachen kontaktiert.

Als Endpunkt der Studie wurde in Übereinstimmung mit anderen klinischen Längsschnittuntersuchungen (284-286) ein kombinierter Endpunkt mit der Summe folgender Ereignisse: nichttödlicher Myokardinfarkt, kardiovaskulärer Tod und Schlaganfall definiert. In der vorliegenden Studie erlitten mit 7,2% weniger kardiovaskuläre Patienten den Endpunkt als erwartet. Gullestad et al. zeigten beispielsweise für ihre Kohorte, dass bereits nach 3 Monaten 12,7% der Patienten den Endpunkt erreichten (285). Ursachen dieses besseren Outcomes sind hoch spekulativ. Möglicherweise wurden die Patienten unserer Studie durch die aufwendigen Befragungen und Parodontaluntersuchungen im stärkeren Maße sensibilisiert, ihr Gesundheitsverhalten zu verbessern und damit das Risiko für Sekundärereignisse zu reduzieren. So erhielten beispielsweise 60 Personen (6,4%) im Zeitraum des Follow-ups eine Parodontaltherapie und der Anteil der aktiven Raucher verringerte sich von 12,3% zu Studienbeginn auf 8,3% im Follow-up. Nicht auszuschließen sind jedoch auch rein zufällige Besonderheiten im einge-

schlossenen Patientenkollektiv, die mit einem verbesserten Outcome korreliert werden können.

In weiteren Analysen wurde die prognostische Bedeutung der demographischen, anamnestischen und biochemischen Charakteristika der Patienten bewertet. Eine Einteilung der Patienten hinsichtlich des Auftretens eines Sekundärereignisses ergab signifikante Unterschiede bezüglich der Höhe des CRP- und des Interleukin-6-Spiegels. Patienten, die ein kardiovaskuläres Sekundärereignis erlitten, wiesen höhere CRP- und IL-6-Serumwerte auf. Dieses Ergebnis steht im Einklang zu den Untersuchungen anderer, die ebenfalls zeigten, dass ein erhöhter IL-6-Wert als prognostischer Marker für eine gesteigerte kardiovaskuläre Mortalität herangezogen werden kann (277, 287). Weitere Studien bestätigen ebenso einen erhöhten CRP-Spiegel als Prädiktor für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse (288, 289).

5.5.2 Die Bedeutung einer schweren Parodontalerkrankung und parodontalen Risikofaktoren als prognostischer Marker für kardiovaskuläre Sekundärereignisse

Entsprechend der Ergebnisse verschiedener Querschnittsuntersuchungen können Parodontitiden als Risikoindikatoren für kardiovaskuläre Erkrankungen angesehen werden (270). Darüber hinaus wurde ebenfalls belegt, dass parodontale Erkrankungen mit einer schlechteren kardialen Prognose einhergehen (98). Aus diesem Grund war in der vorliegenden Studie zu erwarten, dass Patienten mit einer schweren parodontalen Erkrankung eine schlechtere Prognose bezüglich der kombinierten Endpunkte aufzeigen sollten. Wir belegten, dass Patienten mit schwerer Parodontitis häufiger ein kardiovaskuläres Sekundärereignis erlitten als Patienten mit milder oder ohne Parodontitis (Sekundärereignis: 8,7% der Patienten mit schwerer Parodontitis vs. 5,9% der Patienten mit milder oder ohne Parodontitis). Jedoch war dieser Zusammenhang statistisch nicht signifikant ($p=0,127$). Da die Odds Ratio mit 1,52 hierfür in den durchgeführten Untersuchungen unter dem für die Fallzahlplanung angenommenen von 2,0 lag, wurden möglicherweise nicht ausreichend Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen in die Studie aufgenommen. Andererseits könnten weitere stärker atherogene Faktoren, insbesondere kardiovaskuläre Vorerkrankungen, das Outcome beeinflussen und somit die mögliche Auswirkung schwerer Parodontalerkrankungen überdecken. Unter Umständen kommt der Einfluss von Parodontitiden auf koronare Sekundärereignisse auch erst im späteren Verlauf zum Tragen. Aus diesem Grund werden weitere Follow-ups nach 2 und 5 Jahren folgen.

Als klinische parodontaler Marker war der Plaqueindex mit dem Auftreten des kombinierten Endpunktes assoziiert ($p=0,001$). Patienten mit einem höheren Plaqueindex erlitten 1,2mal häufiger einen Myokardinfarkt, einen Schlaganfall oder starben aus kardiovaskulären Gründen. Da ein erhöhter Plaqueindex einen starken parodontalen Risikofaktor darstellt, steht dieses Ergebnis im Einklang zu dem bereits beschriebenen Trend der Patienten mit schwerer Parodontitis, häufiger ein koronares Sekundärereignis zu erleiden. Demzufolge müsste anzunehmen sein, dass Patienten mit Sekundärereignis, die durch einen erhöhten Plaqueindex auffällig waren, eine stärkere subgingivale Belastung mit parodontopathogenen Bakterien aufweisen würden. Im starken Gegensatz dazu wurde interessanterweise bei detaillierter Betrachtung gezeigt, dass Patienten, die ein kardiovaskuläres Sekundärereignis erlitten, subgingival seltener mit parodontopathogenen Bakterien belastet waren. Alle in der vorliegenden Studie untersuchten Keime, außer *P.gingivalis* und *P.micros*, waren überraschenderweise häufiger in der Gruppe der Patienten ohne Koronarereignis nachzuweisen. So war z.B. das Vorkommen von *A.actinomycetemcomitans* in der Gruppe ohne Sekundärereignis mehr als 3fach erhöht ($p=0,075$). Für *E.corrodens* ergab sich sogar ein signifikanter Zusammenhang ($p<0,001$).

Jedoch könnten diese Ergebnisse einen Hinweis auf andere möglicherweise stärker atherogen wirkende bakterielle Bestandteile der subgingivalen Plaque liefern, die mit dem in der vorliegenden Studie verwendeten Test nicht erfasst wurden. Da die subgingivale Plaque sich aus einer Vielzahl unterschiedlicher Bakterien zusammensetzt (290), müsste in weiterführenden Studien differenziert geklärt werden, welche oralen Bakterien in der Ätiologie kardiovaskulärer Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen.

5.5.3 Polymorphe Besonderheiten im $TNF\alpha$ -Gen als Prädiktor für kardiovaskuläre Sekundärereignisse

In der vorliegenden klinischen Studie sollte die Bedeutung der $TNF\alpha$ -SNPs c.-308G>A, c.-238G>A als prognostische Marker für das Auftreten eines Myokardinfarktes, Schlaganfalls und Tod nach kardiovaskulärem Ereignis untersucht werden. Im bivariaten Vergleich wurden keine Assoziationen zwischen genetischer Konstellation (Genotyp-, Allel- und Haplotypverteilung) und dem Auftreten eines kardiovaskulären Sekundärereignisses ermittelt. Auch bei Berücksichtigung der Dauer bis zum Erreichen des Endpunktes und bei Einbeziehung weiterer klinischer Marker wurden beide Polymorphismen nicht als Prädiktoren für ein kardiovaskuläres Sekundärereignis bestätigt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der einzigen

bisher durchgeführten prospektiven Studie, der *AtheroGene* Studie, welche die mögliche Bedeutung von Polymorphismen im $\text{TNF}\alpha$ -Gen als Prädiktoren für kardiovaskuläre Sekundärereignisse untersuchte (179). Im Rahmen dieser Studie wurde ebenfalls für die $\text{TNF}\alpha$ -SNPs c.-308G>A und c.-238G>A sowie die SNPs c.-863C>A und c.-857C>T keine Assoziation zur kardiovaskulären Mortalität nach einer durchschnittlichen Follow-up-Zeit von 5,9 Jahren ermittelt. Die in diese Studie eingeschlossenen Patienten waren ebenso deutsche Staatsbürger europäischen Ursprungs. Die Ergebnisse der vorliegenden Studien belegen, dass die Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A im $\text{TNF}\alpha$ -Gen im deutschen Raum keine Vorhersagekraft für zukünftige koronare Ereignisse tragen.

Jedoch wurden in klinischen Studien eine Erhöhung der $\text{TNF}\alpha$ -Serumwerte mit einem kardiovaskulären Sekundärereignis korreliert (69, 277, 287). Bereits im Jahr 1996 belegten die Forscher der SOLVD-Studie, dass erhöhte $\text{TNF}\alpha$ -Werte bei Patienten mit eingeschränkter linksventrikulärer Funktion eine hohe Vorhersagekraft für die allgemeine Mortalität besitzen ($p < 0,07$, Cox-Regression, (291)). Deswal et al. bestätigten, dass ein erhöhter $\text{TNF}\alpha$ -Spiegel die kardiovaskuläre Mortalität bei Patienten der VEST-Studie signifikant erhöht ($p < 0,007$, Log-rank-Test (277)). In der Studie von Orus et al. wurden ebenfalls erhöhte $\text{TNF}\alpha$ -Werte als Prädiktor für kardiovaskulären Tod, akutes Herzversagen, und Hospitalisierung aufgrund koronarer Beschwerden bestätigt ($p = 0,004$, Log-rank-Test, (287)).

In unserer Studie wurden multivariate Auswertungen durchgeführt, in denen neben der genetischen Konstellation auch weitere, kardiovaskuläre Ereignisse beeinflussende Kofaktoren, wie Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Diabetes mellitus und schwere Parodontitis einbezogen wurden. Hier wurde in der Cox-Regression nur Diabetes mellitus als prognostischer Faktor ermittelt. Dem Diabetes mellitus wurde bereits in anderen klinischen Studien eine große Bedeutung als Prädiktor für kardiovaskuläre Sekundärereignisse beigemessen (292). Wurde in unserer Studie der Plaqueindex in die multivariate Cox-Regression einbezogen so wurde dieser bei Berücksichtigung der Allel- bzw. Haplotypverteilung der Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A als Prädiktor für das Auftreten von kardiovaskulären Sekundärereignissen bestätigt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit vorangegangenen Studien, die ebenfalls den Plaqueindex als prognostischen Faktor für Koronarereignisse identifizierten (99, 293).

Zusammenfassend lässt sich formulieren, dass die genetische Konstellation des $\text{TNF}\alpha$ -Gens (SNPs c.-308G>A und c.-238G>A) in der vorliegenden Studie nicht als Prädiktor für kardiovaskuläre Sekundärereignisse, wie Myokardinfarkt, Schlaganfall oder kardiovaskulärer Tod herangezogen werden kann.

6 Schlussfolgerungen

Die Verfügbarkeit von biologisch aktivem $\text{TNF}\alpha$ -Protein spielt eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung des inflammatorischen Gleichgewichts und ist bedeutsam in der Ätiologie einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen. *In vitro* und *ex vivo* Studien lieferten Hinweise dafür, dass genetische Besonderheiten im $\text{TNF}\alpha$ -Gen Auswirkungen auf die $\text{TNF}\alpha$ -Expression haben. In unseren Voruntersuchungen (Studie A) wurden funktionelle Auswirkungen der $\text{TNF}\alpha$ -SNPs (c.-863C>A, c.-857C>T, c.-308G>A, c.-238G>A, P84L, IVS3+51A>G) auf die mRNA-Expression in humanen Monozyten und die Serumproteinkonzentration im komplexen Stoffwechselgeschehen analysiert. Ausschließlich der SNP c.-238G>A im $\text{TNF}\alpha$ -Gen zeigte eine Assoziation zur $\text{TNF}\alpha$ -Expression auf transkriptioneller Ebene. Die Erhöhung der mRNA-Expression bei A-Allelträgern des c.-238G>A Polymorphismus war jedoch nicht mit einer veränderten Serumproteinkonzentration verbunden. Alle anderen untersuchten Polymorphismen im $\text{TNF}\alpha$ -Gen waren weder mit der mRNA-Expression in nativen Monozyten noch der Serumproteinkonzentration assoziiert. Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass das proinflammatorische Zytokin $\text{TNF}\alpha$ einer hochsensiblen Regulation auf verschiedenen Ebenen der Genexpression unterliegt. Die individuelle genetische Konstellation im $\text{TNF}\alpha$ -Gen konnte in der vorliegenden Studie im komplexen Stoffwechselgeschehen als Risikomarker für die mRNA-Expression in Monozyten (A-Allel des c.-238G>A) jedoch nicht als Indikator für eine veränderte $\text{TNF}\alpha$ -Proteinexpression herangezogen werden.

Die Ätiologie von schweren Parodontitiden ist geprägt durch das komplexe Zusammenspiel einer Vielzahl exogener und endogener Risikofaktoren. Für die Diagnose, Prognose und Therapie sowie die Einschätzung einer möglichen Erkrankungsmanifestation weiterer Familienmitglieder sind stabile individuelle genetische Risikomarker von besonderem Wert. Aufgrund des entzündlichen Charakters der Erkrankung steht dabei die Suche nach genetischen Varianten in inflammatorischen Kandidatengenen, wie z.B. dem $\text{TNF}\alpha$ -Gen, im Vordergrund. Belegt durch eigene funktionelle Voruntersuchungen (Studie A) und funktionelle Studien anderer (siehe Tabelle 2) wurden in unserer Pilotstudie (Studie B) mögliche Assoziationen der $\text{TNF}\alpha$ -SNPs, c.-308G>A und c.-238G>A, zu schweren Parodontitiden untersucht. In Studie B wurde das G-Allel des c.-238G>A-Polymorphismus und das A-Allel des c.-308G>A-Polymorphismus als Risikomarker für das Auftreten von schweren Parodontitiden auch in komplexen statistischen Auswertungen bestätigt. Daraus schlussfolgernd sollte Personen und deren

Familienmitgliedern mit einer entsprechenden genetischen Prädisposition im $\text{TNF}\alpha$ -Gen eine engmaschigere Parodontitisprophylaxe und eine individuelle Aufklärung angeboten werden.

Aufgrund der bei multifaktoriellen Erkrankungen zu vermutenden Komplexität des genetischen Einflusses auf deren Ätiologie, sollte die Suche nach weiteren genetischen parodontalen Risikofaktoren in anderen Kandidatengenen weitergeführt werden. Möglicherweise spielen bisher nicht untersuchte genetische Besonderheiten in weiteren Kandidatengenen eine ebenso bedeutende Rolle in der Ätiologie von schweren Parodontitiden. Deshalb sollte in genomweiten Assoziationsstudien nach weiteren möglichen Kandidatengenen gescreent werden und deren Bedeutung in solide durchgeführten Fall-Kontrollstudien an hochselektierten Patienten und parodontisfreien Kontrollen geprüft werden. In einer ersten genomweiten Assoziationsstudie (294) wurde für aggressive Parodontitis eine Assoziation zu den Genen *CDKN2A* und *CDKN2B* auf Chromosom 9p21.3 beschrieben. In weiteren funktionellen Untersuchungen wurde ein genotypspezifischer Einfluss auf die Genexpression gezeigt (295). Da diese Untersuchungen an einem kleinen Patientenkollektiv ($n=159$) durchgeführt wurden, sollten diese Ergebnisse in großangelegten Multizenterstudien bestätigt werden.

Das Vorliegen einer Parodontalerkrankung wird bereits seit langem mit der Manifestation anderer entzündlicher systemischer Erkrankungen, wie z.B. kardiovaskulärer Erkrankungen, in Zusammenhang gebracht (95). Als eine mögliche Schnittstelle zwischen parodontalen und kardiovaskulären Erkrankungen wird das Wirken inflammatorischer Mediatoren angesehen. So wurde in der Ätiologie beider Erkrankungen ein verändertes Expressionsmuster verschiedener Akutphaseproteine und Zytokine, wie z.B. des $\text{TNF}\alpha$, beschrieben. Genetischen Veränderungen in diesen Genen, insbesondere im $\text{TNF}\alpha$ -Gen, wird darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Pathogenese beider Erkrankungen beigemessen. Wie in Studie B gezeigt, sind polymorphe Varianten (c.-308G>A, c.-238G>A) mit dem Auftreten von schweren Parodontitiden assoziiert. In der vorliegenden Kohortenstudie (Studie C) wurde diese Assoziation der $\text{TNF}\alpha$ -Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A zur Schwere der Parodontalerkrankung bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen nicht bestätigt. Möglicherweise stehen jedoch bei Patienten, die an systemischen entzündlichen, wie z.B. kardiovaskulären Erkrankungen leiden, andere Faktoren bei der Entstehung bzw. dem Fortschreiten der Parodontitis im Vordergrund.

Genetische Veränderungen in Genen der Immunantwort, wie z.B. dem $\text{TNF}\alpha$ -Gen, könnten auch prognostische Relevanz für kardiovaskuläre Sekundärereignisse besitzen und würden eine gezieltere individuelle Therapie nach Primärereignis, wie z.B. engmaschigere Recalls, ermöglichen.

Jedoch wurden in der vorliegenden Studie die $\text{TNF}\alpha$ -Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A nicht als Prädiktoren für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse, wie Schlaganfälle, Myokardinfarkte oder kardiovaskulären Tod ermittelt. Als stärkster prognostischer Faktor im kardiovaskulären Geschehen wurde das Vorliegen einer diabetischen Vorerkrankung bzw. der Plaqueindex beschrieben. Obwohl in der vorliegenden Studie keine Assoziation zwischen den untersuchten $\text{TNF}\alpha$ -Polymorphismen und kardiovaskulären Sekundärereignissen gezeigt wurde, wäre in größeren Studien mit längerem Follow-up zu untersuchen, ob der genetische Konstellation im $\text{TNF}\alpha$ -Gen unter Berücksichtigung weiterer Polymorphismen möglicherweise eine prognostische Relevanz beigemessen werden kann.

Aus den durchgeführten Untersuchungen (Studie A) lässt sich folgern, dass genetische Besonderheiten im $\text{TNF}\alpha$ -Gen als Prädiktoren einer veränderten mRNA-Expression in humanen Monozyten zu betrachten sind. Jedoch liefern sie im komplexen Stoffwechselgeschehen keine Hinweise auf eine veränderte $\text{TNF}\alpha$ -Serumproteinexpression.

Die $\text{TNF}\alpha$ -Polymorphismen, c.-308G>A und c.-238G>A, wurden als Risikoindikatoren für schwere Parodontitiden ermittelt (Studie B). Sie stellen somit stabile Marker zur differenzierten Beurteilung des individuellen Risikoprofils bei Parodontalerkrankung dar und tragen zur effizienteren Prävention und Therapie bei.

Als prognostische Marker für den weiteren klinischen Verlauf einer kardiovaskulären Erkrankung besitzen die SNPs c.-308G>A und c.-238G>A keine Relevanz (Studie C).

7 Zusammenfassung

Bereits seit langem wird ein Zusammenhang zwischen entzündlichen Erkrankungen des Zahnhalteapparates und anderen systemischen inflammatorischen Erkrankungen vermutet. In einer Reihe von Untersuchungen wurde die biologische Plausibilität der Wechselwirkung zwischen entzündlichen Parodontitiden und kardiovaskulären Erkrankungen hervorgehoben. Eine wichtige Schnittmenge stellt dabei das ähnliche Expressionsmuster der an der Pathogenese beider Erkrankungen beteiligten Entzündungsmediatoren dar. So wurde für beide Erkrankungen entzündlicher Genese ein erhöhter Serumspiegel proinflammatorischer Zytokine, wie $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und Akutphaseproteinen (z.B. CRP) gezeigt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Tumornekrosefaktor alpha als mögliche Schnittstelle zwischen schwerer Parodontitis und kardiovaskulären Erkrankungen untersucht werden.

Genetischen Besonderheiten insbesondere in der Promotorregion der Gene wird bei der individuellen Regulation der Genexpression vieler Proteine eine wichtige Rolle beigemessen. Bezüglich der Bedeutung von Polymorphismen auf die $\text{TNF}\alpha$ -Expression lieferten verschiedene *in vitro* und *ex vivo* Studien kontroverse Resultate. Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit funktionelle Untersuchungen zur Auswirkung verschiedener $\text{TNF}\alpha$ -Polymorphismen (c.-308G>A, c.-238G>A, c.-863C>A, c.-857C>T, c.-308G>A, P84L, IVS3+51A>G) auf die $\text{TNF}\alpha$ -mRNA- und Proteinexpression durchgeführt (Studie A). Jedoch wurde nur für den c.-238G>A Polymorphismus eine Korrelation zur mRNA-Expression gezeigt. Alle anderen Polymorphismen waren weder zur mRNA- noch zur Serumproteinkonzentration bei Patienten mit koronarer Vorerkrankung korreliert. Als signifikante unabhängige Prädiktoren eines erhöhten $\text{TNF}\alpha$ -Proteinspiegels wurden der Body mass index, Harnsäure und das Alter der Patienten ermittelt.

Genetische Besonderheiten in Kandidatengenen können wichtige Hilfsmittel zur individuellen Diagnose und Therapie von multifaktoriellen Erkrankungen darstellen. In der vorliegenden Arbeit sollte weiterhin die Bedeutung genetischer Varianten im $\text{TNF}\alpha$ -Gen als Risikomarker für das Auftreten von schweren Parodontitiden geprüft werden (Studie B). Hierfür wurde in einer Fall-Kontrollstudie an Patienten mit schwerer Parodontitis und parodontitisfreien Kontrollprobanden die Auswirkung der Genotyp-, Allel- und Haplotypverteilung der Promotorpolymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A untersucht. In komplexen Analysen unter Berücksichtigung weiterer parodontaler Risikofaktoren wurde gezeigt, dass Patienten die unter schweren Parodontitiden leiden häufiger G-Allelträger des SNP c.-238G>A bzw. A-Allelträger des SNP c.-308G>A waren. Auch weitere parodontale Marker, wie eine stärkere subgingivale Besiedlung mit *P.gingivalis* und eine erhöhte Blutungsneigung nach

Sondierung wurden zum G-Allel des SNP c.-238G>A assoziiert. Die vorliegenden Ergebnisse begründen die Aufnahme der TNF α -SNPs c.-238G>A und c.-308G>A in das parodontale Risikoprofil.

Unter Berücksichtigung der Resultate der Pilotstudie (Studie B) sollte in der Hauptstudie (Studie C; n=1002) die Rolle der individuellen genetischen Konstellation im TNF α -Gen als parodontaler Risikoindikator für Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen untersucht werden. Jedoch wurde weder die Genotyp-, Allel- bzw. Haplotypkonstellation des c.-238G>A noch des c.-308G>A-Polymorphismus in dieser Kohorte zum Auftreten von schweren Parodontitiden signifikant assoziiert. Es wurde gezeigt, dass GG-Genotyp- bzw. G-Allelträger des c.-238G>A-Polymorphismus den geringeren Attachmentverlust aufwiesen. Diese mit dem GG-Genotyp assoziierte Tendenz war mit einem höheren Serumspiegel der Entzündungsmarker IL-6 und CRP verbunden, was Hinweise auf eine intensivere Immunantwort und damit möglicherweise einen besseren Schutz vor Parodontopathogenen geben könnte. Der AG+AA-Genotyp- bzw. das A-Allel des c.-308G>A-Polymorphismus stand bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen im Zusammenhang mit einer erhöhten Sulkusblutungsneigung auf Sondierung und einer erhöhten subgingivalen Besiedlung mit *P.intermedia*.

Des Weiteren sollte die prognostische Relevanz der TNF α -Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A für die kardiovaskuläre Sekundärereignisse, Myokardinfarkt, Schlaganfall, kardialer Tod ermittelt werden. In komplexen Analysen wurden jedoch durchgängig das Vorliegen einer diabetischen Vorerkrankung und nicht die individuelle genetische Konstellation als starker Prädiktor für kardiovaskuläre Sekundärereignisse bestätigt.

Neben einer Vielzahl gemeinsamer Risikofaktoren wie Rauchen, Alter, Geschlecht oder Stress wird auch genetischen Veränderungen in inflammatorischen Kandidatengenen eine wichtige Rolle in der Ätiologie entzündlicher Parodontitiden und kardiovaskulärer Erkrankungen beigemessen.

Studie A: In funktionellen Studien zeigten wir, dass im komplexen Stoffwechselgeschehen der TNF α -SNP c.-238G>A mit der transkriptionellen Regulation des Gens assoziiert ist.

Studie B: Wir bestätigten in krankheitsbezogenen Voruntersuchungen, dass Polymorphismen im TNF α -Gen (c.-308G>A, c.-238G>A) als Risikoindikatoren für schwere Parodontitiden heranzuziehen sind.

Studie C: In einer Longitudinalstudie belegten wir, dass genetischen Varianten im TNF α -Gen keine Prognosemarker für kardiovaskuläre Sekundärereignisse bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen darstellen.

8 Literaturverzeichnis Reference List

- (1) Falvo JV, Tsytzykova AV, Goldfeld AE. Transcriptional Control of the TNF Gene. *Curr Dir Autoimmun* 2010;11:27-60.
- (2) Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, et al. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res* 1985 Sep 11;13(17):6361-6373.
- (3) Spies T, Morton CC, Nedospasov SA, Fiers W, Pious D, Strominger JL. Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986 Nov;83(22):8699-8702.
- (4) Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988 Apr 8;53(1):45-53.
- (5) Tang P, Hung M-C, Klostergaard J. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* 1996 Jun 25;35(25):8216-8225.
- (6) Perez C, Albert I, DeFay K, Zachariades N, Gooding L, Kriegler M. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* 1990 Oct 19;63(2):251-258.
- (7) Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)* 2010 Jul;49(7):1215-1228.
- (8) Eissner G, Kolch W, Scheurich P. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004 Oct;15(5):353-366.
- (9) Domonkos A, Udvardy A, Laszlo L, Nagy T, Duda E. Receptor-like properties of the 26 kDa transmembrane form of TNF. *Eur Cytokine Netw* 2001 Jul;12(3):411-419.
- (10) Engelmann H, Holtmann H, Brakebusch C, Avni YS, Sarov I, Nophar Y, et al. Antibodies to a soluble form of a tumor necrosis factor (TNF) receptor have TNF-like activity. *J Biol Chem* 1990 Aug 25;265(24):14497-14504.
- (11) Stevenson FT, Bursten SL, Locksley RM, Lovett DH. Myristyl acylation of the tumor necrosis factor alpha precursor on specific lysine residues. *J Exp Med* 1992 Oct 1;176(4):1053-1062.
- (12) Utsumi T, Takeshige T, Tanaka K, Takami K, Kira Y, Klostergaard J, et al. Transmembrane TNF (pro-TNF) is palmitoylated. *FEBS Lett* 2001 Jun 29;500(1-2):1-6.
- (13) Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 2000 Aug 1;50(3):184-195.

- (14) Mukai Y, Nakamura T, Yoshioka Y, Tsunoda S, Kamada H, Nakagawa S, et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the tumour necrosis factor alpha-tumour necrosis factor receptor type 2 complex. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 2009 Mar 1;65(Pt 3):295-298.
- (15) Faustman D, Davis M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2010 Jun;9(6):482-493.
- (16) Pimentel-Muinos FX, Seed B. Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation. *Immunity* 1999 Dec;11(6):783-793.
- (17) Naude PJ, den Boer JA, Luiten PG, Eisel UL. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *FEBS J* 2011 Apr;278(6):888-898.
- (18) Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1995 Dec 1;83(5):793-802.
- (19) Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 1993 Sep 10;74(5):845-853.
- (20) Walczak H. TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. *Immunol Rev* 2011 Nov;244(1):9-28.
- (21) Silke J. The regulation of TNF signalling: what a tangled web we weave. *Curr Opin Immunol* 2011 Oct;23(5):620-626.
- (22) Marchetti L, Klein M, Schlett K, Pfizenmaier K, Eisel UL. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity is enhanced by N-methyl-D-aspartate receptor activation. Essential role of a TNF receptor 2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappa B pathway. *J Biol Chem* 2004 Jul 30;279(31):32869-32881.
- (23) Rauert H, Wicovsky A, Muller N, Siegmund D, Spindler V, Waschke J, et al. Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2). *J Biol Chem* 2010 Mar 5;285(10):7394-7404.
- (24) Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 2012 Jan 19;119(3):651-665.
- (25) Eigler A, Loher F, Endres S. [Suppression of synthesis of tumor necrosis factor]. *Internist (Berl)* 2001 Jan;42(1):28-34.
- (26) David JP, Schett G. TNF and bone. *Curr Dir Autoimmun* 2010;11:135-144.
- (27) Rickert RC, Jellusova J, Miletic AV. Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease. *Immunol Rev* 2011 Nov;244(1):115-133.

- (28) Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 2008 Feb;35(2):89-105.
- (29) Garlet GP. Destructive and Protective Roles of Cytokines in Periodontitis: A Reappraisal from Host Defense and Tissue Destruction Viewpoints. *J Dent Res* 2010 Aug 25.
- (30) Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 2007 Feb;65(1):1-13.
- (31) Verstappen J, Von den Hoff JW. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J Dent Res* 2006 Dec;85(12):1074-1084.
- (32) Garlet GP, Martins W, Jr., Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004 Aug;31(8):671-679.
- (33) Goncalves LD, Oliveira G, Hurtado PA, Feitosa A, Takiya CM, Granjeiro JM, et al. Expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors in inflamed gingival biopsies. *J Periodontal Res* 2008 Oct;43(5):570-577.
- (34) Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci* 2008 Nov;1143:123-150.
- (35) Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol* 2006 Feb;21(1):12-20.
- (36) Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol* 2011;3.
- (37) Kajiya M, Giro G, Taubman MA, Han X, Mayer MP, Kawai T. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. *J Oral Microbiol* 2010;2.
- (38) Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003 Mar;74(3):391-401.
- (39) Dag A, Firat ET, Kadiroglu AK, Kale E, Yilmaz ME. Significance of elevated gingival crevicular fluid tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 levels in chronic hemodialysis patients with periodontal disease. *J Periodontal Res* 2010 Aug;45(4):445-450.
- (40) Kurtis B, Tuter G, Serdar M, Akdemir P, Uygur C, Firatli E, et al. Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2005 Nov;76(11):1849-1855.

- (41) Javed F, Al Hezaimi K, Salameh Z, Almas K, Romanos GE. Proinflammatory cytokines in the crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Cytokine* 2011 Jan;53(1):8-12.
- (42) Venza I, Visalli M, Cucinotta M, De Grazia G, Teti D, Venza M. Proinflammatory gene expression at chronic periodontitis and peri-implantitis sites in patients with or without type 2 diabetes. *J Periodontol* 2010 Jan;81(1):99-108.
- (43) Duarte PM, de Mendonca AC, Maximo MB, Santos VR, Bastos MF, Nociti Junior FH. Differential cytokine expressions affect the severity of peri-implant disease. *Clin Oral Implants Res* 2009 May;20(5):514-520.
- (44) Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000 Aug;118(2):503-508.
- (45) Musacchio E, Valvason C, Botsios C, Ostuni F, Furlan A, Ramonda R, et al. The tumor necrosis factor- α -blocking agent infliximab inhibits interleukin 1beta (IL-1beta) and IL-6 gene expression in human osteoblastic cells. *J Rheumatol* 2009 Aug;36(8):1575-1579.
- (46) Sato H, Seiki M. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* 1993 Feb;8(2):395-405.
- (47) Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol* 2007 Jan;147(1):128-138.
- (48) Zhao B, Grimes SN, Li S, Hu X, Ivashkiv LB. TNF-induced osteoclastogenesis and inflammatory bone resorption are inhibited by transcription factor RBP-J. *J Exp Med* 2012 Feb 13;209(2):319-334.
- (49) Schett G, Teitelbaum SL. Osteoclasts and arthritis. *J Bone Miner Res* 2009 Jul;24(7):1142-1146.
- (50) Ross R. Atherosclerosis: current understanding of mechanisms and future strategies in therapy. *Transplant Proc* 1993 Apr;25(2):2041-2043.
- (51) Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999 Jan 14;340(2):115-126.
- (52) Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999 Nov;138(5 Pt 2):S419-S420.
- (53) Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991 Feb 15;251(4995):788-791.
- (54) Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the

- ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998 May;18(5):842-851.
- (55) Tardy Y, Resnick N, Nagel T, Gimbrone MA, Jr., Dewey CF, Jr. Shear stress gradients remodel endothelial monolayers in vitro via a cell proliferation-migration-loss cycle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 Nov;17(11):3102-3106.
- (56) Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hulten LM, Wiklund O, Innerarity TL, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 2002 Jun 13;417(6890):750-754.
- (57) Dai G, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S, Zhang Y, Vaughn S, Blackman BR, et al. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Oct 12;101(41):14871-14876.
- (58) Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998 Aug 27;394(6696):894-897.
- (59) Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 1998 Aug;2(2):275-281.
- (60) Sakaguchi H, Takeya M, Suzuki H, Hakamata H, Kodama T, Horiuchi S, et al. Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice. *Lab Invest* 1998 Apr;78(4):423-434.
- (61) McLaren JE, Ramji DP. Interferon gamma: a master regulator of atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009 Apr;20(2):125-135.
- (62) Hansson GK, Jonasson L, Lojsthe B, Stemme S, Kocher O, Gabbiani G. Localization of T lymphocytes and macrophages in fibrous and complicated human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 1988 Aug;72(2-3):135-141.
- (63) Hansson GK, Hellstrand M, Rymo L, Rubbia L, Gabbiani G. Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells. *J Exp Med* 1989 Nov 1;170(5):1595-1608.
- (64) Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1991 Sep;11(5):1223-1230.
- (65) Libby P. The molecular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J Intern Med* 2008 May;263(5):517-527.
- (66) Andersson J, Libby P, Hansson GK. Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol* 2010 Jan;134(1):33-46.

- (67) Szekanecz Z, Kerekes G, Soltesz P. Vascular effects of biologic agents in RA and spondyloarthropathies. *Nat Rev Rheumatol* 2009 Dec;5(12):677-684.
- (68) Mann DL. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annu Rev Physiol* 2003;65:81-101.
- (69) Valgimigli M, Ceconi C, Malagutti P, Merli E, Soukhomovskaia O, Francolini G, et al. Tumor necrosis factor-alpha receptor 1 is a major predictor of mortality and new-onset heart failure in patients with acute myocardial infarction: the Cytokine-Activation and Long-Term Prognosis in Myocardial Infarction (C-ALPHA) study. *Circulation* 2005 Feb 22;111(7):863-870.
- (70) Mizia-Stec K, Gasior Z, Zahorska-Markiewicz B, Janowska J, Szulc A, Jastrzebska-Maj E, et al. Serum tumour necrosis factor-alpha, interleukin-2 and interleukin-10 activation in stable angina and acute coronary syndromes. *Coron Artery Dis* 2003 Sep;14(6):431-438.
- (71) Dunlay SM, Weston SA, Redfield MM, Killian JM, Roger VL. Tumor necrosis factor-alpha and mortality in heart failure: a community study. *Circulation* 2008 Aug 5;118(6):625-631.
- (72) Kleinbongard P, Schulz R, Heusch G. TNFalpha in myocardial ischemia/reperfusion, remodeling and heart failure. *Heart Fail Rev* 2011 Jan;16(1):49-69.
- (73) Ghezzi P, Dinarello CA, Bianchi M, Rosandich ME, Repine JE, White CW. Hypoxia increases production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human mononuclear cells. *Cytokine* 1991 May;3(3):189-194.
- (74) Spengler RN, Allen RM, Remick DG, Strieter RM, Kunkel SL. Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. *J Immunol* 1990 Sep 1;145(5):1430-1434.
- (75) Jensen JC, Buresh C, Norton JA. Lactic acidosis increases tumor necrosis factor secretion and transcription in vitro. *J Surg Res* 1990 Oct;49(4):350-353.
- (76) Zwaka TP, Manolov D, Ozdemir C, Marx N, Kaya Z, Kochs M, et al. Complement and dilated cardiomyopathy: a role of sublytic terminal complement complex-induced tumor necrosis factor-alpha synthesis in cardiac myocytes. *Am J Pathol* 2002 Aug;161(2):449-457.
- (77) Maekawa N, Wada H, Kanda T, Niwa T, Yamada Y, Saito K, et al. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha. *J Am Coll Cardiol* 2002 Apr 3;39(7):1229-1235.
- (78) Labruto F, Yang J, Vaage J, Valen G. Role of tumor necrosis factor alpha and its receptor I in preconditioning by hyperoxia. *Basic Res Cardiol* 2005 May;100(3):198-207.
- (79) Dawn B, Guo Y, Rezazadeh A, Wang OL, Stein AB, Hunt G, et al. Tumor necrosis factor-alpha does not modulate ischemia/reperfusion injury in naive myocardium but is essential for the development of late preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2004 Jul;37(1):51-61.

- (80) Flaherty MP, Guo Y, Tiwari S, Rezazadeh A, Hunt G, Sanganalmath SK, et al. The role of TNF-alpha receptors p55 and p75 in acute myocardial ischemia/reperfusion injury and late preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2008 Dec;45(6):735-741.
- (81) Gurevitch J, Frolkis I, Yuhas Y, Lifschitz-Mercer B, Berger E, Paz Y, et al. Anti-tumor necrosis factor-alpha improves myocardial recovery after ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1997 Nov 15;30(6):1554-1561.
- (82) Belosjorow S, Bolle I, Duschin A, Heusch G, Schulz R. TNF-alpha antibodies are as effective as ischemic preconditioning in reducing infarct size in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003 Mar;284(3):H927-H930.
- (83) Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res* 2002 Nov 29;91(11):988-998.
- (84) Schulz R, Heusch G. Tumor necrosis factor-alpha and its receptors 1 and 2: Yin and Yang in myocardial infarction? *Circulation* 2009 Mar 17;119(10):1355-1357.
- (85) Schulz R. TNFalpha in myocardial ischemia/reperfusion: damage vs. protection. *J Mol Cell Cardiol* 2008 Dec;45(6):712-714.
- (86) Wang M, Markel T, Crisostomo P, Herring C, Meldrum KK, Lillemoen KD, et al. Deficiency of TNFR1 protects myocardium through SOCS3 and IL-6 but not p38 MAPK or IL-1beta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007 Apr;292(4):H1694-H1699.
- (87) Hamid T, Gu Y, Ortines RV, Bhattacharya C, Wang G, Xuan YT, et al. Divergent tumor necrosis factor receptor-related remodeling responses in heart failure: role of nuclear factor-kappaB and inflammatory activation. *Circulation* 2009 Mar 17;119(10):1386-1397.
- (88) Lecour S, James RW. When are pro-inflammatory cytokines SAFE in heart failure? *Eur Heart J* 2011 Mar;32(6):680-685.
- (89) Lecour S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *J Mol Cell Cardiol* 2009 Jul;47(1):32-40.
- (90) Somers SJ, Frias M, Lacerda L, Opie LH, Lecour S. Interplay Between SAFE and RISK Pathways in Sphingosine-1-Phosphate-Induced Cardioprotection. *Cardiovasc Drugs Ther* 2012 Mar 6.
- (91) Xuan YT, Guo Y, Han H, Zhu Y, Bolli R. An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Jul 31;98(16):9050-9055.
- (92) Deuchar GA, Opie LH, Lecour S. TNFalpha is required to confer protection in an in vivo model of classical ischaemic preconditioning. *Life Sci* 2007 Apr 10;80(18):1686-1691.

- (93) Deswal A, Bozkurt B, Seta Y, Parilti-Eiswirth S, Hayes FA, Blosch C, et al. Safety and efficacy of a soluble P75 tumor necrosis factor receptor (Enbrel, etanercept) in patients with advanced heart failure. *Circulation* 1999 Jun 29;99(25):3224-3226.
- (94) Anker SD, Coats AJ. How to RECOVER from RENAISSANCE? The significance of the results of RECOVER, RENAISSANCE, RENEWAL and ATTACH. *Int J Cardiol* 2002 Dec;86(2-3):123-130.
- (95) Manjunath BC, Praveen K, Chandrashekar BR, Rani RM, Bhalla A. Periodontal infections: a risk factor for various systemic diseases. *Natl Med J India* 2011 Jul;24(4):214-219.
- (96) Mattila KJ, Nieminen MS, Valtonen VV, Rasi VP, Kesaniemi YA, Syrjala SL, et al. Association between dental health and acute myocardial infarction. *BMJ* 1989 Mar 25;298(6676):779-781.
- (97) Fisher MA, Borgnakke WS, Taylor GW. Periodontal disease as a risk marker in coronary heart disease and chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010 Nov;19(6):519-526.
- (98) Kebschull M, Demmer RT, Papapanou PN. "Gum bug, leave my heart alone!" - epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *J Dent Res* 2010 Sep;89(9):879-902.
- (99) Humphrey LL, Fu R, Buckley DI, Freeman M, Helfand M. Periodontal disease and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. *J Gen Intern Med* 2008 Dec;23(12):2079-2086.
- (100) Janket SJ, Baird AE, Chuang SK, Jones JA. Meta-analysis of periodontal disease and risk of coronary heart disease and stroke. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003 May;95(5):559-569.
- (101) Renvert S, Pettersson T, Ohlsson O, Persson GR. Bacterial profile and burden of periodontal infection in subjects with a diagnosis of acute coronary syndrome. *J Periodontol* 2006 Jul;77(7):1110-1119.
- (102) Nonnenmacher C, Stelzel M, Susin C, Sattler AM, Schaefer JR, Maisch B, et al. Periodontal microbiota in patients with coronary artery disease measured by real-time polymerase chain reaction: a case-control study. *J Periodontol* 2007 Sep;78(9):1724-1730.
- (103) Spahr A, Klein E, Khuseyinova N, Boeckh C, Muche R, Kunze M, et al. Periodontal infections and coronary heart disease: role of periodontal bacteria and importance of total pathogen burden in the Coronary Event and Periodontal Disease (CORODONT) study. *Arch Intern Med* 2006 Mar 13;166(5):554-559.
- (104) Leishman SJ, Do HL, Ford PJ. Cardiovascular disease and the role of oral bacteria. *J Oral Microbiol* 2010;2.
- (105) Iwai T. Periodontal bacteremia and various vascular diseases. *J Periodontal Res* 2009 Dec;44(6):689-694.

- (106) Ohki T, Itabashi Y, Kohno T, Yoshizawa A, Nishikubo S, Watanabe S, et al. Detection of periodontal bacteria in thrombi of patients with acute myocardial infarction by polymerase chain reaction. *Am Heart J* 2012 Feb;163(2):164-167.
- (107) Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol* 2000 Oct;71(10):1554-1560.
- (108) Elkaim R, Dahan M, Kocgozlu L, Werner S, Kanter D, Kretz JG, et al. Prevalence of periodontal pathogens in subgingival lesions, atherosclerotic plaques and healthy blood vessels: a preliminary study. *J Periodontal Res* 2008 Apr;43(2):224-231.
- (109) Padilla C, Lobos O, Hubert E, Gonzalez C, Matus S, Pereira M, et al. Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 2006 Aug;41(4):350-353.
- (110) Kozarov EV, Dorn BR, Shelburne CE, Dunn WA, Jr., Progulske-Fox A. Human atherosclerotic plaque contains viable invasive *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 Mar;25(3):e17-e18.
- (111) Giacona MB, Papapanou PN, Lamster IB, Rong LL, D'Agati VD, Schmidt AM, et al. *Porphyromonas gingivalis* induces its uptake by human macrophages and promotes foam cell formation in vitro. *FEMS Microbiol Lett* 2004 Dec 1;241(1):95-101.
- (112) Roth GA, Moser B, Roth-Walter F, Giacona MB, Harja E, Papapanou PN, et al. Infection with a periodontal pathogen increases mononuclear cell adhesion to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 2007 Feb;190(2):271-281.
- (113) Roth GA, Moser B, Huang SJ, Brandt JS, Huang Y, Papapanou PN, et al. Infection with a periodontal pathogen induces procoagulant effects in human aortic endothelial cells. *J Thromb Haemost* 2006 Oct;4(10):2256-2261.
- (114) Deshpande RG, Khan MB, Genco CA. Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 1998 Nov;66(11):5337-5343.
- (115) Dorn BR, Dunn WA, Jr., Progulske-Fox A. Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens. *Infect Immun* 1999 Nov;67(11):5792-5798.
- (116) Kerrigan SW, Jakubovics NS, Keane C, Maguire P, Wynne K, Jenkinson HF, et al. Role of *Streptococcus gordonii* surface proteins SspA/SspB and Hsa in platelet function. *Infect Immun* 2007 Dec;75(12):5740-5747.
- (117) Sharma A, Novak EK, Sojar HT, Swank RT, Kuramitsu HK, Genco RJ. *Porphyromonas gingivalis* platelet aggregation activity: outer membrane vesicles are potent activators of murine platelets. *Oral Microbiol Immunol* 2000 Dec;15(6):393-396.

- (118) Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D. The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol* 2006 Jun;4(6):445-457.
- (119) Nakajima T, Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Ito H, et al. Periodontitis-associated up-regulation of systemic inflammatory mediator level may increase the risk of coronary heart disease. *J Periodontal Res* 2010 Feb;45(1):116-122.
- (120) Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PM, van d, V. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol* 2000 Oct;71(10):1528-1534.
- (121) Kanaparthi R, Kanaparthi A, Mahendra M. C-reactive protein as a marker of periodontal disease. *Gen Dent* 2012 Jan;60(1):e1-e5.
- (122) Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 2000 May 9;101(18):2149-2153.
- (123) Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000 Apr 18;101(15):1767-1772.
- (124) Stoll LL, Denning GM, Weintraub NL. Potential role of endotoxin as a proinflammatory mediator of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 Dec;24(12):2227-2236.
- (125) Ide M, Jagdev D, Coward PY, Crook M, Barclay GR, Wilson RF. The short-term effects of treatment of chronic periodontitis on circulating levels of endotoxin, C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6. *J Periodontol* 2004 Mar;75(3):420-428.
- (126) D'Aiuto F, Parkar M, Tonetti MS. Acute effects of periodontal therapy on biomarkers of vascular health. *J Clin Periodontol* 2007 Feb;34(2):124-129.
- (127) Tonetti MS, D'Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, et al. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med* 2007 Mar 1;356(9):911-920.
- (128) Elter JR, Hinderliter AL, Offenbacher S, Beck JD, Caughey M, Brodala N, et al. The effects of periodontal therapy on vascular endothelial function: a pilot trial. *Am Heart J* 2006 Jan;151(1):47.
- (129) Duarte PM, da Rocha M, Sampaio E, Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, et al. Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: a pilot study. *J Periodontol* 2010 Jul;81(7):1056-1063.
- (130) D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, Suvan J, Brett PM, Ready D, et al. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *J Dent Res* 2004 Feb;83(2):156-160.

- (131) Teles FR, Teles RP, Martin L, Socransky SS, Haffajee AD. Relationships Among IL-6, TNF-alpha, Adipokines, Vitamin D and Chronic Periodontitis. *J Periodontol* 2011 Dec 19.
- (132) D'Aiuto F, Parkar M, Brett PM, Ready D, Tonetti MS. Gene polymorphisms in pro-inflammatory cytokines are associated with systemic inflammation in patients with severe periodontal infections. *Cytokine* 2004 Oct 7;28(1):29-34.
- (133) Wu JR, Zeng R. Molecular basis for population variation: from SNPs to SAPs. *FEBS Lett* 2012 Aug 31;586(18):2841-2845.
- (134) Smith AJ, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009 Feb;20(1):43-59.
- (135) Mekinian A, Tamouza R, Pavy S, Gestermann N, Ittah M, Mariette X, et al. Functional study of TNF-alpha promoter polymorphisms: literature review and meta-analysis. *Eur Cytokine Netw* 2011 Jun;22(2):88-102.
- (136) Brinkman BM, Zuijdeest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CL. Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) -308 promoter polymorphism in TNF alpha gene regulation. *J Inflamm* 1995;46(1):32-41.
- (137) Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997 Apr;34(5):391-399.
- (138) Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Apr 1;94(7):3195-3199.
- (139) Kroeger KM, Steer JH, Joyce DA, Abraham LJ. Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. *Cytokine* 2000 Feb;12(2):110-119.
- (140) Karimi M, Goldie LC, Cruickshank MN, Moses EK, Abraham LJ. A critical assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: a reassessment of -308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter system. *Eur J Hum Genet* 2009 Nov;17(11):1454-1462.
- (141) Schulz S, Schagdarsurengin U, Suss T, Muller-Werdan U, Werdan K, Glaser C. Relation between the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene and protein expression, and clinical, biochemical, and genetic markers: age, body mass index and uric acid are independent predictors for an elevated TNF-alpha plasma level in a complex risk model. *Eur Cytokine Netw* 2004 Apr;15(2):105-111.
- (142) Brinkman BM, Huizinga TW, Breedveld FC, Verweij CL. Allele-specific quantification of TNFA transcripts in rheumatoid arthritis. *Hum Genet* 1996 Jun;97(6):813-818.

- (143) Kaijzel EL, Bayley JP, van Krugten MV, Smith L, van de LP, Bakker AM, et al. Allele-specific quantification of tumor necrosis factor alpha (TNF) transcription and the role of promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis patients and healthy individuals. *Genes Immun* 2001 May;2(3):135-144.
- (144) Oregon-Romero E, Vazquez-Del Mercado M, Ruiz-Quezada SL, Navarro-Hernandez RE, Rangel-Villalobos H, Martinez-Bonilla G, et al. Tumor necrosis factor alpha-308 and -238 polymorphisms in rheumatoid arthritis. Association with messenger RNA expression and sTNF-alpha. *J Investig Med* 2008 Oct;56(7):937-943.
- (145) Lu MC, Yang KL, Tung CH, Huang KY, Yu HC, Liu SQ, et al. Higher LPS-stimulated TNF-alpha mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells from Chinese ankylosing spondylitis patients with -308G/A polymorphism in promoter region of tumor necrosis factor: association with distinct A33/B58/Cw10 haplotypes. *Rheumatol Int* 2008 Dec;29(2):189-195.
- (146) Fernandes H, Koneru B, Fernandes N, Hameed M, Cohen MC, Raveche E, et al. Investigation of promoter polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in liver transplant patients. *Transplantation* 2002 Jun 27;73(12):1886-1891.
- (147) Pachman LM, Liotta-Davis MR, Hong DK, Kinsella TR, Mendez EP, Kinder JM, et al. TNFalpha-308A allele in juvenile dermatomyositis: association with increased production of tumor necrosis factor alpha, disease duration, and pathologic calcifications. *Arthritis Rheum* 2000 Oct;43(10):2368-2377.
- (148) Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langermans JA, et al. TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol* 1997 Feb;72(2):149-153.
- (149) Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Elouali AH, Verweij CL, Boomsma DI, et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 1997 Jan 18;349(9046):170-173.
- (150) Baseggio L, Bienvenu J, Charlot C, Picollet J, Felman P, Coiffier B, et al. Higher LPS-stimulated TNF-alpha mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells from non-Hodgkin's lymphoma patients. *Exp Hematol* 2001 Mar;29(3):330-338.
- (151) Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998 Sep;113(3):401-406.
- (152) Heesen M, Kunz D, Bachmann-Mennenga B, Merk HF, Bloemeke B. Linkage disequilibrium between tumor necrosis factor (TNF)-alpha-308 G/A promoter and TNF-beta NcoI polymorphisms: Association with TNF-alpha response of granulocytes to endotoxin stimulation. *Crit Care Med* 2003 Jan;31(1):211-214.
- (153) Kubota T, McNamara DM, Wang JJ, Trost M, McTiernan CF, Mann DL, et al. Effects of tumor necrosis factor gene polymorphisms on patients with

- congestive heart failure. VEST Investigators for TNF Genotype Analysis. Vesnarinone Survival Trial. *Circulation* 1998 Jun 30;97(25):2499-2501.
- (154) Gonzalez S, Rodrigo L, Martinez-Borra J, Lopez-Vazquez A, Fuentes D, Nino P, et al. TNF-alpha -308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF-alpha production and inflammatory activity in Crohn's patients with fistulizing disease. *Am J Gastroenterol* 2003 May;98(5):1101-1106.
- (155) Bayley JP, de Rooij H, van den Elsen PJ, Huizinga TW, Verweij CL. Functional analysis of linker-scan mutants spanning the -376, -308, -244, and -238 polymorphic sites of the TNF-alpha promoter. *Cytokine* 2001 Jun 21;14(6):316-323.
- (156) Kaluza W, Reuss E, Grossmann S, Hug R, Schopf RE, Galle PR, et al. Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism. *J Invest Dermatol* 2000 Jun;114(6):1180-1183.
- (157) Pociot F, D'Alfonso S, Compasso S, Scorza R, Richiardi PM. Functional analysis of a new polymorphism in the human TNF alpha gene promoter. *Scand J Immunol* 1995 Oct;42(4):501-504.
- (158) de Jong BA, Westendorp RG, Bakker AM, Huizinga TW. Polymorphisms in or near tumour necrosis factor (TNF)-gene do not determine levels of endotoxin-induced TNF production. *Genes Immun* 2002 Feb;3(1):25-29.
- (159) O'Dwyer MJ, Mankan AK, Ryan AW, Lawless MW, Stordeur P, Kelleher D, et al. Characterization of tumour necrosis factor-alpha genetic variants and mRNA expression in patients with severe sepsis. *Int J Immunogenet* 2008 Aug;35(4-5):279-285.
- (160) Gordon AC, Lagan AL, Aganna E, Cheung L, Peters CJ, McDermott MF, et al. TNF and TNFR polymorphisms in severe sepsis and septic shock: a prospective multicentre study. *Genes Immun* 2004 Dec;5(8):631-640.
- (161) Sharma S, Ghosh B, Sharma SK. Association of TNF polymorphisms with sarcoidosis, its prognosis and tumour necrosis factor (TNF)-alpha levels in Asian Indians. *Clin Exp Immunol* 2008 Feb;151(2):251-259.
- (162) Laine ML, Crielaard W, Loos BG. Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontol* 2000 2012 Feb;58(1):37-68.
- (163) Laine ML, Loos BG, Crielaard W. Gene polymorphisms in chronic periodontitis. *Int J Dent* 2010;2010:324719.
- (164) Erciyas K, Pehlivan S, Sever T, Igci M, Arslan A, Orbak R. Association between TNF-alpha, TGF-beta1, IL-10, IL-6 and IFN-gamma gene polymorphisms and generalized aggressive periodontitis. *Clin Invest Med* 2010;33(2):E85.
- (165) Galbraith GM, Hendley TM, Sanders JJ, Palesch Y, Pandey JP. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1999 Nov;26(11):705-709.

- (166) Qian W, Zhang J, Zhang Y. [The relationship between tumor necrosis factor A-308 gene polymorphism and susceptibility of severe periodontitis in adults]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2002 Mar;37(2):126-128.
- (167) Schulz S, Machulla HK, Altermann W, Klapproth J, Zimmermann U, Glaser C, et al. Genetic markers of tumour necrosis factor alpha in aggressive and chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2008 Jun;35(6):493-500.
- (168) Brett PM, Zygogianni P, Griffiths GS, Tomaz M, Parkar M, D'Aiuto F, et al. Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *J Dent Res* 2005 Dec;84(12):1149-1153.
- (169) Endo M, Tai H, Tabeta K, Kobayashi T, Yamazaki K, Yoshie H. Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of tumor necrosis factor-alpha gene in Japanese patients with early-onset periodontitis. *J Periodontol* 2001 Nov;72(11):1554-1559.
- (170) Fassmann A, Holla LI, Buckova D, Vasku A, Znojil V, Vanek J. Polymorphisms in the +252(A/G) lymphotoxin-alpha and the -308(A/G) tumor necrosis factor-alpha genes and susceptibility to chronic periodontitis in a Czech population. *J Periodontal Res* 2003 Aug;38(4):394-399.
- (171) Folwaczny M, Glas J, Torok HP, Mende M, Folwaczny C. Lack of association between the TNF alpha G -308 A promoter polymorphism and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004 Jun;31(6):449-453.
- (172) Donati M, Berglundh T, Hytonen AM, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Padyukov L. Association of the -159 CD14 gene polymorphism and lack of association of the -308 TNFA and Q551R IL-4RA polymorphisms with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. *J Clin Periodontol* 2005 May;32(5):474-479.
- (173) Sakellari D, Katsares V, Georgiadou M, Kouvatsi A, Arsenakis M, Konstantinidis A. No correlation of five gene polymorphisms with periodontal conditions in a Greek population. *J Clin Periodontol* 2006 Nov;33(11):765-770.
- (174) Tervonen T, Raunio T, Knuuttila M, Karttunen R. Polymorphisms in the CD14 and IL-6 genes associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2007 May;34(5):377-383.
- (175) Menezes NG, Colombo AP. Lack of association between the TNF-alpha -308 (G/A) genetic polymorphism and periodontal disease in Brazilians. *Braz Oral Res* 2008 Oct;22(4):322-327.
- (176) Soga Y, Nishimura F, Ohyama H, Maeda H, Takashiba S, Murayama Y. Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF-alpha) -1031/-863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. *J Clin Periodontol* 2003 Jun;30(6):524-531.
- (177) Craandijk J, van Krugten MV, Verweij CL, van d, V, Loos BG. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002 Jan;29(1):28-34.

- (178) Galbraith GM, Steed RB, Sanders JJ, Pandey JP. Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: influence of tumor necrosis factor genotype. *J Periodontol* 1998 Apr;69(4):428-433.
- (179) Morange PE, Tregouet DA, Godefroy T, Saut N, Bickel C, Rupprecht HJ, et al. Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha (TNF) and the TNF-alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) genes in relation to cardiovascular mortality: the AtheroGene study. *J Mol Med (Berl)* 2008 Oct;86(10):1153-1161.
- (180) Zhang HF, Xie SL, Wang JF, Chen YX, Wang Y, Huang TC. Tumor necrosis factor-alpha G-308A gene polymorphism and coronary heart disease susceptibility: an updated meta-analysis. *Thromb Res* 2011 May;127(5):400-405.
- (181) Herrmann SM, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Arveiler D, Evans A, et al. Polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity. *Eur J Clin Invest* 1998 Jan;28(1):59-66.
- (182) Padovani JC, Pazin-Filho A, Simoes MV, Marin-Neto JA, Zago MA, Franco RF. Gene polymorphisms in the TNF locus and the risk of myocardial infarction. *Thromb Res* 2000 Nov 15;100(4):263-269.
- (183) Koch W, Kastrati A, Bottiger C, Mehilli J, von Beckerath N, Schomig A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2001 Nov;159(1):137-144.
- (184) Bernard V, Pillois X, Dubus I, Benchimol D, Labouyrie JP, Couffignal T, et al. The -308 G/A tumor necrosis factor-alpha gene dimorphism: a risk factor for unstable angina. *Clin Chem Lab Med* 2003 Apr;41(4):511-516.
- (185) Tulyakova GH, Nasibullin TR, Zakirova AN, Khusnutdinova EK, Mustafina OE. Association of the-308 G/A polymorphism of tumor necrosis factor alpha gene with myocardial infarction and sudden cardiac death. *Atherosclerosis Supplements* 2006 Jun;7(3):396.
- (186) Tobin MD, Braund PS, Burton PR, Thompson JR, Steeds R, Channer K, et al. Genotypes and haplotypes predisposing to myocardial infarction: a multilocus case-control study. *Eur Heart J* 2004 Mar;25(6):459-467.
- (187) Antonicelli R, Olivieri F, Cavallone L, Spazzafumo L, Bonafe M, Marchegiani F, et al. Tumor necrosis factor-alpha gene -308G>A polymorphism is associated with ST-elevation myocardial infarction and with high plasma levels of biochemical ischemia markers. *Coron Artery Dis* 2005 Dec;16(8):489-493.
- (188) Dedoussis GV, Panagiotakos DB, Vidra NV, Louizou E, Chrysohoou C, Germanos A, et al. Association between TNF-alpha -308G>A polymorphism and the development of acute coronary syndromes in Greek subjects: the CARDIO2000-GENE Study. *Genet Med* 2005 Jul;7(6):411-416.

- (189) Bennet AM, van Maarle MC, Hallqvist J, Morgenstern R, Frostegard J, Wiman B, et al. Association of TNF-alpha serum levels and TNFA promoter polymorphisms with risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2006 Aug;187(2):408-414.
- (190) Allen RA, Lee EM, Roberts DH, Park BK, Pirmohamed M. Polymorphisms in the TNF-alpha and TNF-receptor genes in patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest* 2001 Oct;31(10):843-851.
- (191) Szalai C, Fust G, Duba J, Kramer J, Romics L, Prohaszka Z, et al. Association of polymorphisms and allelic combinations in the tumour necrosis factor-alpha-complement MHC region with coronary artery disease. *J Med Genet* 2002 Jan;39(1):46-51.
- (192) Vendrell J, Fernandez-Real JM, Gutierrez C, Zamora A, Simon I, Bardaji A, et al. A polymorphism in the promoter of the tumor necrosis factor-alpha gene (-308) is associated with coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis* 2003 Apr;167(2):257-264.
- (193) Georges JL, Rupprecht HJ, Blankenberg S, Poirier O, Bickel C, Hafner G, et al. Impact of pathogen burden in patients with coronary artery disease in relation to systemic inflammation and variation in genes encoding cytokines. *Am J Cardiol* 2003 Sep 1;92(5):515-521.
- (194) Sbarsi I, Falcone C, Boiocchi C, Campo I, Zorzetto M, De Silvestri A, et al. Inflammation and atherosclerosis: the role of TNF and TNF receptors polymorphisms in coronary artery disease. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2007 Jan;20(1):145-154.
- (195) Elahi MM, Gilmour A, Matata BM, Mastana SS. A variant of position -308 of the Tumour necrosis factor alpha gene promoter and the risk of coronary heart disease. *Heart Lung Circ* 2008 Feb;17(1):14-18.
- (196) Giacconi R, Cipriano C, Muti E, Costarelli L, Malavolta M, Caruso C, et al. Involvement of -308 TNF-alpha and 1267 Hsp70-2 polymorphisms and zinc status in the susceptibility of coronary artery disease (CAD) in old patients. *Biogerontology* 2006 Oct;7(5-6):347-356.
- (197) Spinarova L, Spinar J, Vasku A, Pavkova-Goldbergova M, Ludka O, Tomandl J, et al. Genetics of humoral and cytokine activation in heart failure and its importance for risk stratification of patients. *Exp Mol Pathol* 2008 Jun;84(3):251-255.
- (198) Chu H, Yang J, Mi S, Bhuyan SS, Li J, Zhong L, et al. Tumor necrosis factor-alpha G-308 A polymorphism and risk of coronary heart disease and myocardial infarction: A case-control study and meta-analysis. *J Cardiovasc Dis Res* 2012 Apr;3(2):84-90.
- (199) Bruggink AH, van Oosterhout MF, De Jonge N, Gmelig-Meyling FH, De Weger RA. TNFalpha in patients with end-stage heart failure on medical therapy or supported by a left ventricular assist device. *Transpl Immunol* 2008 Apr;19(1):64-68.

- (200) Lange DE. [Periodontal pretreatment of abutment teeth]. *Zahnärztl Mitt* 1977 Oct 16;67(20):1184-1188.
- (201) Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999 Dec;4(1):1-6.
- (202) Tonetti MS, Claffey N. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol* 2005;32 Suppl 6:210-213.
- (203) Silness J, Loe H. PERIODONTAL DISEASE IN PREGNANCY. II. CORRELATION BETWEEN ORAL HYGIENE AND PERIODONTAL CONDITION. *Acta Odontol Scand* 1964 Feb;22:121-135.
- (204) Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975 Dec;25(4):229-235.
- (205) Celi FS, Zenilman ME, Shuldiner AR. A rapid and versatile method to synthesize internal standards for competitive PCR. *Nucleic Acids Res* 1993 Feb 25;21(4):1047.
- (206) Forster E. Rapid generation of internal standards for competitive PCR by low-stringency primer annealing. *Biotechniques* 1994 Jun;16(6):1006-1008.
- (207) Bruggenjürgen B, McBride D, Bode C, Hamm CW, Kuck KH, Willich SN. Sirolimus-eluting versus bare-metal stents for the reduction of coronary restenosis: 18-month angiographic results from the GERSHWIN Study. *Herz* 2007 Dec;32(8):650-655.
- (208) Yan H, Yuan W, Velculescu VE, Vogelstein B, Kinzler KW. Allelic variation in human gene expression. *Science* 2002 Aug 16;297(5584):1143.
- (209) Pickrell JK, Marioni JC, Pai AA, Degner JF, Engelhardt BE, Nkadori E, et al. Understanding mechanisms underlying human gene expression variation with RNA sequencing. *Nature* 2010 Apr 1;464(7289):768-772.
- (210) Montgomery SB, Sammeth M, Gutierrez-Arcelus M, Lach RP, Ingle C, Nisbett J, et al. Transcriptome genetics using second generation sequencing in a Caucasian population. *Nature* 2010 Apr 1;464(7289):773-777.
- (211) Opstad TB, Pettersen AA, Arnesen H, Seljeflot I. Circulating levels of IL-18 are significantly influenced by the IL-18 +183 A/G polymorphism in coronary artery disease patients with diabetes type 2 and the metabolic syndrome: an observational study. *Cardiovasc Diabetol* 2011;10:110.
- (212) Forte GI, Vaccarino L, Palmeri M, Branzi A, Caldarera CM, Scola L, et al. Analysis of polymorphisms Leiden Factor V G1691A and prothrombin G20210A as risk factors for acute myocardial infarction. *Biogerontology* 2011 Oct;12(5):485-490.

- (213) Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W, Carter HL, et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 1997 Feb 20;385(6618):733-736.
- (214) Olofsson PS, Rosas-Ballina M, Levine YA, Tracey KJ. Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity. *Immunol Rev* 2012 Jul;248(1):188-204.
- (215) Nophar Y, Kemper O, Brakebusch C, Englemann H, Zwang R, Aderka D, et al. Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor. *EMBO J* 1990 Oct;9(10):3269-3278.
- (216) Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005 May;115(1):1-20.
- (217) Biragyn A, Nedospasov SA. Lipopolysaccharide-induced expression of TNF-alpha gene in the macrophage cell line ANA-1 is regulated at the level of transcription processivity. *J Immunol* 1995 Jul 15;155(2):674-683.
- (218) Han J, Brown T, Beutler B. Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level. *J Exp Med* 1990 Feb 1;171(2):465-475.
- (219) Han J, Huez G, Beutler B. Interactive effects of the tumor necrosis factor promoter and 3'-untranslated regions. *J Immunol* 1991 Mar 15;146(6):1843-1848.
- (220) Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* 1993 Jun 1;177(6):1675-1680.
- (221) Weil D, Brosset S, Dautry F. RNA processing is a limiting step for murine tumor necrosis factor beta expression in response to interleukin-2. *Mol Cell Biol* 1990 Nov;10(11):5865-5875.
- (222) Khera TK, Dick AD, Nicholson LB. Mechanisms of TNFalpha regulation in uveitis: focus on RNA-binding proteins. *Prog Retin Eye Res* 2010 Nov;29(6):610-621.
- (223) Khera TK, Dick AD, Nicholson LB. Fragile X-related protein FXR1 controls post-transcriptional suppression of lipopolysaccharide-induced tumour necrosis factor-alpha production by transforming growth factor-beta1. *FEBS J* 2010 Jul;277(13):2754-2765.
- (224) Qidwai T, Khan F. Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence. *Scand J Immunol* 2011 Dec;74(6):522-547.
- (225) D'Alfonso S, Richiardi PM. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics* 1994;39(2):150-154.

- (226) Drouet C, Shakhov AN, Jongeneel CV. Enhancers and transcription factors controlling the inducibility of the tumor necrosis factor- α promoter in primary macrophages. *J Immunol* 1991 Sep 1;147(5):1694-1700.
- (227) Bruunsgaard H, Pedersen BK. Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunol Allergy Clin North Am* 2003 Feb;23(1):15-39.
- (228) Woods JA, Wilund KR, Martin SA, Kistler BM. Exercise, inflammation and aging. *Aging Dis* 2012 Feb;3(1):130-140.
- (229) Popko K, Gorska E, Stelmaszczyk-Emmel A, Plywaczewski R, Stoklosa A, Gorecka D, et al. Proinflammatory cytokines Il-6 and TNF- α and the development of inflammation in obese subjects. *Eur J Med Res* 2010 Nov 4;15 Suppl 2:120-122.
- (230) Sas AA, Jamshidi Y, Zheng D, Wu T, Korf J, Alizadeh BZ, et al. The age-dependency of genetic and environmental influences on serum cytokine levels: A twin study. *Cytokine* 2012 Jun 4.
- (231) Leyva F, Anker SD, Godsland IF, Teixeira M, Hellewell PG, Kox WJ, et al. Uric acid in chronic heart failure: a marker of chronic inflammation. *Eur Heart J* 1998 Dec;19(12):1814-1822.
- (232) Olexa P, Olexova M, Gonsorcik J, Tkac I, Kisel'ova J, Olejnikova M. Uric acid--a marker for systemic inflammatory response in patients with congestive heart failure? *Wien Klin Wochenschr* 2002 Mar 28;114(5-6):211-215.
- (233) Chiou WK, Huang DH, Wang MH, Lee YJ, Lin JD. Significance and association of serum uric acid (UA) levels with components of metabolic syndrome (MS) in the elderly. *Arch Gerontol Geriatr* 2012 Apr 6.
- (234) Albanese E, Hardy R, Wills A, Kuh D, Guralnik J, Richards M. No association between gain in body mass index across the life course and midlife cognitive function and cognitive reserve-The 1946 British birth cohort study. *Alzheimers Dement* 2012 Aug 1.
- (235) Grigore C, Vintila AM, Stoian I, Dawkins L, Isacoff D, Bruckner IV. Uric Acid and Oxidative Stress in Non-Smoking Metabolic Syndrome Patients. *Journal of Hypertension* 2010 Jun;28:E575-E576.
- (236) Nakanishi N, Yoshida H, Nakamura K, Suzuki K, Tatara K. Predictors for development of hyperuricemia: an 8-year longitudinal study in middle-aged Japanese men. *Metabolism* 2001 Jun;50(6):621-626.
- (237) Gagliardi AC, Miname MH, Santos RD. Uric acid: A marker of increased cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2009 Jan;202(1):11-17.
- (238) Hursting SD, Hursting MJ. Growth signals, inflammation, and vascular perturbations: mechanistic links between obesity, metabolic syndrome, and cancer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012 Aug;32(8):1766-1770.

- (239) Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997 Jan;24(1):72-77.
- (240) Tarannum F, Faizuddin M. Effect of gene polymorphisms on periodontal diseases. *Indian J Hum Genet* 2012 Jan;18(1):9-19.
- (241) Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol* 2000 Nov;71(11):1699-1707.
- (242) Knol MJ, Vandenbroucke JP, Scott P, Egger M. What do case-control studies estimate? Survey of methods and assumptions in published case-control research. *Am J Epidemiol* 2008 Nov 1;168(9):1073-1081.
- (243) Pooja S, Francis A, Bid HK, Kumar S, Rajender S, Ramalingam K, et al. Role of ethnic variations in TNF-alpha and TNF-beta polymorphisms and risk of breast cancer in India. *Breast Cancer Res Treat* 2011 Apr;126(3):739-747.
- (244) Reichert S, Stein J, Gautsch A, Schaller HG, Machulla HK. Gender differences in HLA phenotype frequencies found in German patients with generalized aggressive periodontitis and chronic periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2002 Dec;17(6):360-368.
- (245) Timmerman MF, Van der Weijden GA. Risk factors for periodontitis. *Int J Dent Hyg* 2006 Feb;4(1):2-7.
- (246) Palmer RM. Should quit smoking interventions be the first part of initial periodontal therapy? *J Clin Periodontol* 2005 Aug;32(8):867-868.
- (247) Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005 Nov 19;366(9499):1809-1820.
- (248) Heasman L, Stacey F, Preshaw PM, McCracken GI, Hepburn S, Heasman PA. The effect of smoking on periodontal treatment response: a review of clinical evidence. *J Clin Periodontol* 2006 Apr;33(4):241-253.
- (249) Albandar JM. Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. *Dent Clin North Am* 2005 Jul;49(3):517-5vi.
- (250) Andrukhov O, Ulm C, Reischl H, Nguyen PQ, Matejka M, Rausch-Fan X. Serum cytokine levels in periodontitis patients in relation to the bacterial load. *J Periodontol* 2011 Jun;82(6):885-892.
- (251) Bodet C, Chandad F, Grenier D. Inflammatory responses of a macrophage/epithelial cell co-culture model to mono and mixed infections with *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*. *Microbes Infect* 2006 Jan;8(1):27-35.
- (252) Bodet C, Chandad F, Grenier D. *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammatory mediator profile in an ex vivo human whole blood model. *Clin Exp Immunol* 2006 Jan;143(1):50-57.

- (253) Paraskevas S, Huizinga JD, Loos BG. A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol* 2008 Apr;35(4):277-290.
- (254) de Oliveira C, Watt R, Hamer M. Toothbrushing, inflammation, and risk of cardiovascular disease: results from Scottish Health Survey. *BMJ* 2010;340:c2451.
- (255) Buhlin K, Hultin M, Norderyd O, Persson L, Pockley AG, Rabe P, et al. Risk factors for atherosclerosis in cases with severe periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009 Jul;36(7):541-549.
- (256) Wohlfeil M, Scharf S, Siegelin Y, Schacher B, Oremek GM, Sauer-Eppel H, et al. Increased systemic elastase and C-reactive protein in aggressive periodontitis (CLOI-D-00160R2). *Clin Oral Investig* 2011 Oct 19.
- (257) Haba D, Teslaru S, Ungureanu D, Hodorog D, Alecu C, Benghiac AG, et al. Evaluation of serum and gingival crevicular fluid C-reactive protein and IL-6 levels in patients with periodontitis and transient ischemic attacks. *Rom J Morphol Embryol* 2011;52(4):1243-1247.
- (258) Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003 Jun;111(12):1805-1812.
- (259) Helfand M, Buckley DI, Freeman M, Fu R, Rogers K, Fleming C, et al. Emerging risk factors for coronary heart disease: a summary of systematic reviews conducted for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2009 Oct 6;151(7):496-507.
- (260) Buckley DI, Fu R, Freeman M, Rogers K, Helfand M. C-reactive protein as a risk factor for coronary heart disease: a systematic review and meta-analyses for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2009 Oct 6;151(7):483-495.
- (261) Shultis WA, Weil EJ, Looker HC, Curtis JM, Shlossman M, Genco RJ, et al. Effect of periodontitis on overt nephropathy and end-stage renal disease in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007 Feb;30(2):306-311.
- (262) Lavin-Gomez BA, Palomar-Fontanet R, Gago-Fraile M, Quintanar-Lartundo JA, Gomez-Palomo E, Gonzalez-Lamuno D, et al. Inflammation markers, chronic kidney disease, and renal replacement therapy. *Adv Perit Dial* 2011;27:33-37.
- (263) Rescala B, Rosalem W, Jr., Teles RP, Fischer RG, Haffajee AD, Socransky SS, et al. Immunologic and microbiologic profiles of chronic and aggressive periodontitis subjects. *J Periodontol* 2010 Sep;81(9):1308-1316.
- (264) Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998 Feb;25(2):134-144.
- (265) Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol* 2000 2005;38:72-122.

- (266) Guo Y, Nguyen KA, Potempa J. Dichotomy of gingipains action as virulence factors: from cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins. *Periodontol 2000* 2010 Oct;54(1):15-44.
- (267) Karim AY, Kulczycka M, Kantyka T, Dubin G, Jabaiah A, Daugherty PS, et al. A novel matrix metalloprotease-like enzyme (karilysin) of the periodontal pathogen *Tannerella forsythia* ATCC 43037. *Biol Chem* 2010 Jan;391(1):105-117.
- (268) Koziel J, Karim AY, Przybyszewska K, Ksiazek M, Rapala-Kozik M, Nguyen KA, et al. Proteolytic inactivation of LL-37 by karilysin, a novel virulence mechanism of *Tannerella forsythia*. *J Innate Immun* 2010;2(3):288-293.
- (269) Heller D, Silva-Boghossian CM, do Souto RM, Colombo AP. Subgingival microbial profiles of generalized aggressive and chronic periodontal diseases. *Arch Oral Biol* 2012 Jul;57(7):973-980.
- (270) Azarpazhooh A, Tenenbaum HC. Separating fact from fiction: use of high-level evidence from research syntheses to identify diseases and disorders associated with periodontal disease. *J Can Dent Assoc* 2012;78:c25.
- (271) Noack B, Aslanhan Z, Boue J, Petig C, Teige M, Schaper F, et al. Potential Association of Paraoxonase 1, Type 2 Diabetes Mellitus and Periodontitis. *J Periodontol* 2012 Jul 6.
- (272) Ranade SB, Doiphode S. Is there a relationship between periodontitis and rheumatoid arthritis? *J Indian Soc Periodontol* 2012 Jan;16(1):22-27.
- (273) Rutger PG. Rheumatoid arthritis and periodontitis - inflammatory and infectious connections. Review of the literature. *J Oral Microbiol* 2012;4.
- (274) Vanderlei JM, Messoria MR, Fernandes PG, Novaes AB, Jr., Palioto DB, Grisi MF, et al. Arterial Hypertension Perpetuates Alveolar Bone Loss. *Clin Exp Hypertens* 2012 May 9.
- (275) Tiainen K, Thinggaard M, Jylha M, Bladbjerg E, Christensen K, Christiansen L. Associations between inflammatory markers, candidate polymorphisms and physical performance in older Danish twins. *Exp Gerontol* 2012 Jan;47(1):109-115.
- (276) Bartlett DB, Firth CM, Phillips AC, Moss P, Baylis D, Syddall H, et al. The age-related increase in low-grade systemic inflammation (Inflammaging) is not driven by cytomegalovirus infection. *Aging Cell* 2012 Jun 18.
- (277) Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation* 2001 Apr 24;103(16):2055-2059.
- (278) Alves AC, Napimoga MH, Klein MI, Hofling JF, Goncalves RB. Increase in probing depth is correlated with a higher number of *Prevotella intermedia* genotypes. *J Periodontol* 2006 Jan;77(1):61-66.

- (279) Matto J, Saarela M, Troil-Linden B, Alaluusua S, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Similarity of salivary and subgingival *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 1996 Dec;11(6):395-401.
- (280) He T, Hayashi J, Yamamoto M, Ishikawa I. Genotypic characterization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from periodontitis patients by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Periodontol* 1998 Jan;69(1):69-75.
- (281) Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol* 2004 Nov;31(11):996-1002.
- (282) Kim SJ, Choi EY, Kim EG, Shin SH, Lee JY, Choi JI, et al. *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide stimulates release of tumor necrosis factor- α through mitogen-activated protein kinase signaling pathways in monocyte-derived macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007 Nov;51(2):407-413.
- (283) Booker CL, Harding S, Benzeval M. A systematic review of the effect of retention methods in population-based cohort studies. *BMC Public Health* 2011;11:249.
- (284) van Peet PG, Drewes YM, de Craen AJ, Westendorp RG, Gussekloo J, de Ruijter W. Prognostic value of cardiovascular disease status: the Leiden 85-plus study. *Age (Dordr)* 2012 Jul 4.
- (285) Gullestad L, Ueland T, Kjekshus J, Nymo SH, Hulthe J, Muntendam P, et al. Galectin-3 predicts response to statin therapy in the Controlled Rosuvastatin Multinational Trial in Heart Failure (CORONA). *Eur Heart J* 2012 May 7.
- (286) Ruwald AC, Westergaard B, Sehested T, Kjeldsen SE, Lindholm LH, Wachtell K, et al. Losartan versus atenolol-based antihypertensive treatment reduces cardiovascular events especially well in elderly patients: the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension (LIFE) study. *J Hypertens* 2012 Jun;30(6):1252-1259.
- (287) Orus J, Roig E, Perez-Villa F, Pare C, Azqueta M, Filella X, et al. Prognostic value of serum cytokines in patients with congestive heart failure. *J Heart Lung Transplant* 2000 May;19(5):419-425.
- (288) Yin WH, Wei J, Huang WP, Chen JW, Young MS, Lin SJ. Prognostic Value of Circulating Adipokine Levels and Expressions of Adipokines in the Myocardium of Patients With Chronic Heart Failure. *Circ J* 2012 Jun 15.
- (289) Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, Pepys MB, Thompson SG, Collins R, et al. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet* 2010 Jan 9;375(9709):132-140.
- (290) Seneviratne CJ, Zhang CF, Samaranayake LP. Dental plaque biofilm in oral health and disease. *Chin J Dent Res* 2011;14(2):87-94.

- (291) Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol* 1996 Apr;27(5):1201-1206.
- (292) Yu SB, Zhao QY, Huang H, Chen DE, Cui HY, Qin M, et al. Prognosis investigation in patients with chronic heart failure and pericardial effusion. *Chin Med J (Engl)* 2012 Mar;125(5):882-887.
- (293) DeStefano F, Anda RF, Kahn HS, Williamson DF, Russell CM. Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. *BMJ* 1993 Mar 13;306(6879):688-691.
- (294) Schaefer AS, Richter GM, Groessner-Schreiber B, Noack B, Nothnagel M, El Mokhtari NE, et al. Identification of a shared genetic susceptibility locus for coronary heart disease and periodontitis. *PLoS Genet* 2009 Feb;5(2):e1000378.
- (295) Schaefer AS, Richter GM, Dommisch H, Reinartz M, Nothnagel M, Noack B, et al. CDKN2BAS is associated with periodontitis in different European populations and is activated by bacterial infection. *J Med Genet* 2011 Jan;48(1):38-47.

9 Anlagen

Patientenaufklärung zur Untersuchung „HLA und Parodontitis“

Ziel der Untersuchung

Bestimmung des Zusammenhangs zwischen Merkmalen des HLA-System bzw. bestimmter Zytokinpolymorphismen des Menschen und der Neigung, an bestimmten schweren Entzündungen des Zahnhalteapparates (Parodontitis) zu erkranken.

Hintergrund der Studie

Parodontitis ist eine durch bestimmte Bakterien ausgelöste Infektionserkrankung. Die individuelle Reaktion auf diese schädlichen Keime ist u.a. vom HLA-System und der Freisetzung von Entzündungsstoffen (Zytokinen) abhängig.

Das HLA-System umfasst mehrere Gruppen an Merkmalen, die blutgruppenartig über die Einzigartigkeit des Organismus eines jeden Menschen wachen, indem sie u.a. die Resistenz und Anfälligkeit gegenüber Krankheiten sowie die Abwehrstärken u. –schwächen jedes Menschen vor Infektionserregern wesentlich mit beeinflussen. Zytokine sind Stoffe, die Entzündungen auslösen oder unterdrücken können.

Der Nachweis bestimmter HLA-Marker bzw. Zytokinpolymorphismen bei Patienten mit schwerer oder aggressiver Parodontitis im Vergleich zu gesunden Probanden könnte mit dazu beitragen, einen Teil der Vorgänge zu erkennen, die die individuelle Anfälligkeit/Abwehrfähigkeit gegenüber diesen Mikroorganismen und damit der Erkrankung bedingen.

Welche Risiken und Vorteile ergeben sich aus der Teilnahme an der Studie?

Für die HLA-Untersuchung benötigen wir eine kleine Blutprobe von 20 ml von Ihnen, die nach medizinisch anerkanntem Standardverfahren von uns unter Verwendung sterilen Einwegmaterials entnommen wird. Somit kann ein Gesundheitsrisiko für Sie durch Infektion grundsätzlich ausgeschlossen werden. Die Blutproben werden ausschließlich durch uns ausgewertet. Eine kommerzielle Nutzung ist ausgeschlossen. Durch Ihren Beitrag würden Sie gemeinsam mit uns dazu beitragen,

neue Erkenntnisse zu erzielen, die für die Vorbeugung und Therapie von Erkrankungen des Zahnhalteapparates in Zukunft von Nutzen wären.

Widerruf der Einverständniserklärung

Zu jedem Zeitpunkt der Studie ist ohne Angaben von Gründen und persönlichen Nachteilen für Sie ein Widerruf der Einverständniserklärung für die Studie möglich.

Einverständniserklärung Studie „Assoziation von Besonderheiten im Gen für TNF α bei Parodontitiden“

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, mir zur Bestimmung meiner HLA-Merkmale bzw. Zytokinpolymorphismen eine kleine Blutprobe von 20 ml abnehmen zu lassen. Ich bin damit einverstanden, dass die gewonnenen Daten in anonymisierter Form ausgewertet werden.

Mir ist bekannt, dass die Teilnahme an dieser Studie freiwillig ist und jederzeit ohne Nennung von Gründen oder persönlichen Nachteilen widerrufen werden kann.

Name in Druckschrift.....

Unterschrift

Datum

Für die Terminvergabe bin ich unter folgender Telefonnummer erreichbar:
..... von bis..... Uhr

Terminwunsch für die Blutentnahme:

Wochentag:.....Uhrzeit:.....
.....

Patientenaufklärung für die Studie „Parodontitis als Risikofaktor für koronare Sekundärereignisse“ (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01045070)

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient!

Bei Ihnen ist im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung eine Koronare Herzerkrankung festgestellt worden (Verengung einer Herzkranzarterie um mindestens 50%). Die Ursachen für die Entstehung der Atherosklerose (Verkalkung/Verengung von Arterien) sind zum Teil noch unbekannt. Bei vielen Patienten findet man die so genannten klassischen Risikofaktoren Diabetes mellitus, Rauchen, Bluthochdruck, erhöhte Blutfettwerte oder eine bekannte Familienanamnese für diese Erkrankungen. Häufig ist jedoch kein Risikofaktor zu finden. Heutzutage ist bekannt, dass die Entzündungen, die man im Laufe seines Lebens erleidet, eine weitere potentielle Ursache für die Atherosklerose sein kann. Hierbei scheinen die Entzündungen der Mundschleimhaut durch bestimmte Mikroorganismen eine nicht unerhebliche Rolle zu spielen. Man hat zeigen können, dass Patienten mit einer so genannten Parodontitis (Entzündung des Zahnhalteapparates) vermehrt atherosklerotische Erkrankungen erleiden. Die vorliegende Studie soll erstmalig die Frage untersuchen, ob der Nachweis von bestimmten Keimen der Mundschleimhaut einen Risikofaktor für zukünftige Ereignisse bei Patienten mit Koronarer Herzerkrankung darstellt.

Studienablauf

Wir planen bei Ihnen, Ihr Einverständnis vorausgesetzt, eine Untersuchung des Zahnhalteapparates durchzuführen, die die Bestimmung der Bakterien der Mundschleimhaut mit beinhaltet. Weiterhin wollen wir bestimmte Marker im Blut untersuchen (weiße Blutkörperchen, Zytokinpolymorphismen und andere), die weitere Hinweise auf die Entzündung im Körper oder andere Risikokonstellationen aufzeigen können. Hierfür wird Ihnen ca. 50ml Blut aus einer Vene entnommen.

Ihr Arzt wird die Studie nochmals detailliert mit Ihnen besprechen. Nach Erhalt Ihres Einverständnisses werden Ihre Daten in einem Prüfbogen festgehalten, der nicht mit Ihrem Namen, sondern lediglich mit einer anonymen Kennziffer versehen ist. Dieses Verfahren nennt man Pseudonymisierung. Diese Daten werden pseudonymisiert in eine Datenbank eingegeben. Weiterhin wird Ihr Prüfarzt Sie nach 12 Monaten nach Einschluss erneut (postalisch oder telefonisch) kontaktieren und Sie zu Ihrem Befinden, Ihren potentiellen weiteren Krankenhausaufenthalten und Ihrer aktuellen Medikation befragen.

Risiken

Die Risiken für die Probanden sind in dieser Studie als gering einzuschätzen. Trotzdem bitten wir Sie, diesen Abschnitt sorgfältig zu lesen. Es kann im Rahmen von Blutentnahmen in seltensten Fällen zu Nervenverletzungen oder zur Entwicklung von relevanten Blutergüssen kommen. Eine Infektion ist bei sachgerechtem Vorgehen nicht zu erwarten. Ein relevanter Abfall des Blutfarbstoffs (Hämoglobin) ist nicht zu erwarten, jedoch potentiell möglich. Ein Risiko durch die zahnmedizinische Untersuchung ist nicht zu erwarten.

Dennoch bitten wir Sie - auch nach Beendigung der Studie - bei Auftreten von Beschwerden jederzeit den Prüfarzt zu kontaktieren.

Rechte

Die bei dieser Studie erhobenen Daten werden in einem Prüfbogen festgehalten, der nicht mit Ihrem Namen, sondern lediglich mit einer anonymen Kennziffer versehen ist. Der Prüfarzt kontrolliert die Daten. Vertreter der zuständigen Überwachungsbehörden erhalten auf Wunsch ebenfalls Einsicht in die Unterlagen. Wir garantieren Ihnen, dass Ihr Name und Ihre Teilnahme sowie alle anderen Informationen streng vertraulich behandelt werden.

Diese Studie wurde einer Ethikkommission zur Kenntnisnahme vorgelegt. Die international geltenden Richtlinien für die Durchführung von Register-Studien werden streng eingehalten werden.

Wenn Sie teilnehmen möchten, geben Sie dazu bitte Ihr schriftliches Einverständnis. Dieses können Sie während der Studie zu jedem Zeitpunkt zurückziehen und Ihre Studienteilnahme beenden. Wann immer Sie Fragen haben, wenden Sie sich bitte an Ihren Prüfarzt.

Name der Prüfarzte: Dr. med. dent. S. Reichert und Dr. med. A. Schlitt

Krankenhausadresse: Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie und Klinik für Innere Medizin III, Martin Luther-Universität Halle-Wittenberg

Telefon: 0345 557 0

Wir wären Ihnen dankbar, wenn Sie an dieser Studie teilnehmen. Sie wird einen wesentlichen Anteil zur weiteren Erforschung der Ursachen und eventuell auch der Therapie der Atherosklerose beitragen.

Einverständniserklärung für die Studie „Parodontitis als Risikofaktor für koronare Sekundärereignisse“ (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01045070)

Ich, (Name), wurde umfassend von Herrn/Frau über die Studie „Parodontale Erkrankungen und ihre mikrobiologischen Erreger als Risikofaktoren für kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit Koronarer Herzerkrankung.“ informiert und alle meine Fragen zur Studie wurden zu meiner Zufriedenheit beantwortet. Die Formulare „Probandeninformation“ und „Einverständniserklärung“ habe ich erhalten.

Ich verstehe meine Rechte und Verantwortlichkeiten als Teilnehmer an dieser Registerstudie und weiß, dass ich jederzeit und ohne Angabe von Gründen die Teilnahme widerrufen kann, ohne dass mir daraus irgendwelche Nachteile erwachsen. Weiterhin bin ich mit der Erhebung, Speicherung und Auswertung meiner personenbezogenen, pseudonymisierten Daten einverstanden.

Ich erkläre, aus eigenen und freien Willen teilzunehmen und gewissenhaft mit dem Prüfarzt/ der Prüfarztin und seinen Mitarbeitern zusammenzuarbeiten.

Ort.....

Datum.....

Unterschrift der Probandin/ des Probanden

Unterschrift des Prüfarztes/ der Prüfarztin, der/die hiermit erklärt, die Studie gemäß dem vorgelegten Protokoll durchzuführen.

Ort.....

Datum.....

Unterschrift der Prüfarztin/ des Prüfarztes

10 Thesen

1. Eine gegenseitige Beeinflussung entzündlicher Erkrankungen der Mundhöhle und systemischen, wie z.B. kardiovaskulären, Erkrankungen, wird seit langem vermutet. *In vitro* und *in vivo* Studien wurden durchgeführt, um die biologische Plausibilität des postulierten Zusammenhangs zu untersuchen.
2. Beide Erkrankungen entzündlicher Genese sind mit einem ähnlichen Expressionsmuster einer Vielzahl von Entzündungsmediatoren assoziiert. Eine besondere Rolle spielt der an der Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems beteiligte Tumornekrosefaktor alpha ($TNF\alpha$). Die Bedeutung von $TNF\alpha$ im entzündlichen Geschehen von parodontalen und kardiovaskulären Erkrankungen wurde in verschiedenen klinischen Studien belegt.

Funktionelle Voruntersuchungen: Studie A

3. Genetischen Besonderheiten, insbesondere in der Promotorregion der Gene, wird eine große Bedeutung bei der Regulation der Genexpression beigemessen. Im $TNF\alpha$ -Gen sind bereits verschiedene polymorphe Veränderungen beschrieben worden. Die Ergebnisse der *in vitro* und *ex vivo* Studien zu funktionellen Auswirkungen der $TNF\alpha$ -Polymorphismen sind hoch kontrovers.
4. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der $TNF\alpha$ -Polymorphismen c.-308G>A, c.-238G>A, c.-863C>A, c.-857C>T, c.-308G>A, P84L, IVS3+51A>G auf die mRNA-Expression in Monozyten und die Serumproteinexpression untersucht. Für den c.-238G>A-Polymorphismus wurde eine Assoziation zur mRNA-Expression ermittelt. Auf Proteinebene war eine funktionelle Auswirkung nicht detektierbar. Alle weiteren Polymorphismen zeigten keine Assoziation zur mRNA- und Proteinexpression. Dieses Ergebnis unterstützt die These einer sehr komplexen Regulation der $TNF\alpha$ -Expression auf verschiedenen Ebenen der Genexpression.

Assoziationsstudie zur Bedeutung von $TNF\alpha$ -Polymorphismen bei schweren Parodontitiden: Studie B

5. In Zwillingsstudien wurde belegt, dass in der Ätiologie von entzündlichen Parodontitiden neben klassischen Risikofaktoren wie mikrobielle Plaque, Rauchen,

männliches Geschlecht und Alter auch individuelle genetische Besonderheiten eine wichtige Rolle spielen. Eine besondere Bedeutung wird dabei polymorphen Varianten in inflammatorischen Kandidatengen, wie z.B. im $\text{TNF}\alpha$ -Gen, beigemessen.

6. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in einer Fall-Kontrollstudie eine mögliche Assoziation zwischen den $\text{TNF}\alpha$ -Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A und dem Auftreten von schweren Parodontitiden geprüft. Das A-Allel des c.-308G>A-Polymorphismus bzw. der GG-Genotyp und das G-Allel des c.-238G>A wurden als signifikante parodontale Risikoindikatoren identifiziert.
7. Darüber hinaus wurde in der Fall-Kontrollstudie das subgingivale Vorkommen von *P.gingivalis* und eine erhöhte Sulkusblutungsneigung auf Sondierung mit dem G-Allel des c.-238G>A Polymorphismus assoziiert.
8. Die Ergebnisse der vorliegenden Assoziationsstudie belegen, dass die Polymorphismen c.-238G>A und c.-308G>A im $\text{TNF}\alpha$ -Gen zur Beurteilung des individuellen Parodontitisrisikos heranzuziehen sind.

Longitudinalstudie zur Prüfung der Bedeutung der $\text{TNF}\alpha$ -Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A als parodontale Risikoindikatoren und kardiovaskuläre Prognosemarker: Studie C

9. In der vorliegenden Longitudinalstudie sollte zunächst anhand der Daten der Baseline-Untersuchungen überprüft werden, ob die $\text{TNF}\alpha$ -Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A ebenfalls bei kardiovaskulär vorbelasteten Patienten als parodontale Risikoindikatoren bestätigt werden können.
10. Im Gegensatz zu den Resultaten der Assoziationsstudie waren weder die Genotyp-, die Allel- noch die Haplotypkonstellation der $\text{TNF}\alpha$ -Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A zum Auftreten von schweren Parodontitiden signifikant assoziiert.
11. Der GG-Genotyp des c.-238G>A Polymorphismus korrelierte jedoch mit einem geringeren Attachmentverlust und einem höheren Serumspiegel der Entzündungsmarker CRP und IL-6. Dies könnte darauf hindeuten, dass GG-

Genotypträger möglicherweise bedingt durch eine stärkere Immunantwort besser in der Lage sind auf parodontpathogene Keime zu reagieren.

12. Träger des AG+AA-Genotyps und des A-Allels des c.-308G>A Polymorphismus zeigten eine erhöhte Sulkusblutungsneigung nach Sondierung, möglicherweise verursacht durch ein häufigeres Vorkommen des parodontpathogenen Keimes *P.intermedia*.
13. Im einjährigen Follow-Up sollte die Bedeutung der TNF α -Polymorphismen c.-308G>A und c.-238G>A als prognostische Faktoren für das Auftreten eines kardiovaskulären Sekundärereignisses, wie Myokardinfarkt, Schlaganfall oder kardiovaskulärer Tod, untersucht werden.
14. Eine prognostische Relevanz für kardiovaskuläre Sekundärereignisse wurde für beide TNF α -Polymorphismen nicht belegt. Als signifikanter Prädiktor für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse wurde in der vorliegenden Studie das Vorliegen des Diabetes mellitus und der Plaqueindex ermittelt.
15. In genomweiten Assoziationsstudien sollte nach weiteren parodontalen und kardiovaskulären Kandidatengenomen geforscht werden, deren Bedeutung im entzündlichen Geschehen in funktionellen Analysen bestätigt werden sollte. Zur detaillierten Aufklärung des vermuteten Zusammenhangs zwischen parodontaler Entzündung und kardiovaskulärer Erkrankung sollten weitere Longitudinal- und Interventionsstudien konzipiert werden.

Lebenslauf

Name: Dr. Susanne Schulz
Geburtsdatum: 14. April 1971
Geburtsort: Halle
Wohnanschrift: 06114 Halle, Wittekindstr. 31

Schulbildung:

1977-1987 Polytechnische Oberschule, Halle, Prädikat: „Mit Auszeichnung“
1987-1989 Erweiterte Oberschule, Halle, „Mit Auszeichnung“

Studium:

1989-1995 Studium der Biochemie an der Universität Halle,
Fachbereich
Biochemie/Biotechnologie,
Hauptfach: allgemeine Biochemie,
Biologisches Hauptfach: Genetik,
Nebenfach: Pathobiochemie
1994-1995 Diplomarbeit am Institut für Humangenetik und Medizinische
Biologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg, Thema: „Quantitative PCR zur
Bestimmung der mRNA-Expression des ACE-Gens in
humanen kultivierten Endothelzellen aus der
Nabelschnurvene.“
1995 Diplom im Fach Biochemie, Prädikat: „Sehr gut“.
2003 Studium der Medizinischen Ethik Fernuniversität Hagen

Wissenschaftliche Tätigkeit:

1995-1997 Förderung im Rahmen des Graduiertenförderungsgesetzes
des Landes Sachsen-Anhalt (GradFG GVBl.LSA Nr.
21/1992), Thema: „Untersuchungen zu genetischen
Varianten des „LDL-Rezeptor related Protein“ (LRP).“ Arbeit
am Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Institutsdirektor:
Prof. Dr. rer. nat Dr. med. I. Hansmann).
1997-2000 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen des
umweltmedizinischen Forschungsschwerpunktes der Martin-

- Luther-Universität Halle-Wittenberg im Drittmittelprojekt T5 am Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie, Thema: „Genetische Risikokonstellation bei Patienten mit koronarer Atherosklerose.“ (Institutsdirektor: Prof. Dr. rer. nat Dr. med. I. Hansmann).
- 3/2000-8/2000 wissenschaftliche Mitarbeiterin im BMBF-Projekt „Herz-Kreislauf-Forschung“ in der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Kliniksdirektor: Prof. Dr. med. K. Werdan).
- 3/2001 Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Thema: „Proteinbiochemische und molekulargenetische Untersuchungen zu metabolischen Risikofaktoren bei Myokardinfarkt“, Prädikat: „magna cum laude“.
- 5/2001-6/2003 wissenschaftliche Mitarbeiterin im BMBF-Projekt „Untersuchung von genetischen Risikofaktoren bei Patienten mit hypertrophen und proliferativen Herzkrankheiten“ am Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Institutsdirektor: Prof. Dr. rer. nat Dr. med. I. Hansmann).
- 10/2002-06/2006 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Sonderforschungsbereich 598 der DFG „Herzversagen im Alter: Zelluläre Mechanismen und therapeutische Einflussnahme“ in der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Kliniksdirektor: Prof. Dr. med. K. Werdan).
- Seit 3/2005 Leiterin des Forschungslabors am Department für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Kliniksdirektor: Prof. Dr. med. dent. H.-G. Schaller).

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 Habilitationsverfahrens einer anderen Fakultät oder Universität vorgelegt worden.

Halle (Saale), den

Dr. Susanne Schulz

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei den Direktoren der Poliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie Herrn Prof. Dr. H.-G. Schaller, der Klinik für Innere Medizin III Herrn Prof. Dr. K. Werdan, des Institut für Humangenetik Herrn Prof. Dr. I. Hansmann für die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten und für die während der Arbeit gewährten fachlichen Unterstützungen bei klinischen Fragestellungen ganz herzlich bedanken.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich an Herrn PD Dr. S. Reichert, leitender Oberarzt der Abteilung Parodontologie der Poliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie, für seine stete Diskussionsbereitschaft und seine freundliche Unterstützung am Fortgang dieser Arbeit richten. Weiterhin bin ich Prof. Dr. A. Schlitt für die jederzeit gewährte fachliche Hilfe und anregenden Diskussionen zu Dank verpflichtet.

Mein besonderer Dank gilt der Leiterin des molekularbiologischen Labors des Instituts für Humangenetik, Frau Dr. C. Gläser, für die über viele Jahre bestehende erfolgreiche wissenschaftliche Zusammenarbeit und ihr stetes förderndes Interesse.

Bei Frau Dr. S. Lischewski möchte ich mich für ihr Unterstützung bei der genetischen Charakterisierung der Patienten der Longitudinalstudie bedanken. Frau A. Lutze, Herrn T. Seifert und Herrn R. Gawe danke ich für ihre Hilfe bei der Rekrutierung und klinischen Charakterisierung der Probanden mit koronarer Herzerkrankung in dieser Studie.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich an alle Probandinnen und Probanden richten, ohne deren Bereitschaft zur Studienteilnahme diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke ganz herzlich allen Mitarbeitern der Poliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.