

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Analyse von TNF-alpha-, TGF-beta-, IL-10-, IL-6- und IFN-gamma-
Genpolymorphismen bei deutschen Patienten mit chronischer
Parodontitis

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Daniel Babel

aus Tiflis

Datum der Promotion: 25.11.2022

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in: Babel, N., Cherepnev, G., Babel, D., Tropmann, A., Hammer, M., Volk, H. D., and Reinke, P. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, IL-6, and interferon-gamma gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis.. J Periodontol 2006, 77(12), 1978-83.

Inhalt

Vorwort	2
Abkürzungen	5
Abstract Deutsch	6
Abstract English	7
1. Einleitung	9
1.1 Einführung	9
1.2. Klassifizierung der Parodontalerkrankungen von 1989 bis 1999	10
1.3. Aktuelle Klassifikation parodontaler Erkrankungen	11
1.4 Parodontitis mit chronischem Verlauf.....	12
1.4.1. <i>Manifestation und Diagnosestellung</i>	12
1.4.2 <i>Risikofaktoren der Parodontitis</i>	14
1.4.3 <i>Entstehung der chronischen Parodontitis</i>	17
1.4.3.1. <i>Rolle der mikrobiellen Plaquezusammensetzung</i>	17
1.4.3.2 <i>Immunologische Vorgänge - „Critical pathway“ als Modell der Entwicklung chronischer Parodontitis</i>	18
1.5. Zytokine	21
1.5.1 <i>Allgemeines</i>	21
1.5.2. <i>Interleukin-6 (IL-6)</i>	22
1.5.3 <i>Interleukin-10 (IL-10)</i>	23
1.5.4 <i>Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-alpha)</i>	23
1.5.5 <i>Transforming growth factor beta (TGF-beta)</i>	24
1.5.6 <i>Interferon-gamma (IFN-gamma)</i>	25
1.6 Genetische Prädisposition und Zytokingenpolymorphismen	26
2. Fragestellung	29
3. Material und Methoden	31
3.1 Studiendesign	31
3.2 Materialgewinnung	33
3.3 DNA-Isolation.....	33
3.4 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	35
3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
3.6 Primersequenz-spezifische (SSP) PCR	40
3.7 Gelelektrophorese	42
3.8 Statistische Analysen	43
3.9 Materialien und Reagenzien.....	45
3.10 Geräte und Hilfsmittel.....	46
4. Ergebnisse	48
4.1 Charakterisierung der Kohorten	48
4.2. Assoziation zwischen -174IL-6-CC-Poymorphismus und der chronischen Parodontitis.....	50
4.3 Negative Assoziation zwischen dem TGF-beta1-Codon 25-GG-Polymorphismus und der chronischen Parodontitis	53
4.4 -1082IL-10-Einzelnukleotidpolymoprhimus in Patienten mit chronischer Parodontitis und in der Kontrollgruppe	55
4.5 Verteilung von -308TNF-alpha-SNP in Patienten mit chronischer Parodontitis und in der Kontrollgruppe	57
4.6 Verteilung von +874IFN-gamma-Genpolymorphismus in Patienten mit chronischer Parodontitis und in der Kontrollgruppe.....	59

4.7 Verteilung von TGF-beta1 (codon 10)-Polymorphismus in Patienten mit chronischer Parodontitis und in der Kontrollgruppe.....	61
4.8 IL-6 und TGF-beta1-Genpolymorphismen als voneinander unabhängige Risikofaktoren.....	63
5. Diskussion	65
6. Schlussfolgerungen und Ausblick.....	73
7. Literatur	75
8. Eidesstattliche Versicherung/Anteilerklärung	82
9. Lebenslauf	85
10. Publikationsliste	86
11. Danksagung.....	87

Abkürzungen

AIDS – Syndrom der erworbenen Immundefizienz (Engl: Acquired Immune Deficiency Syndrome)

AP - alkalische Phosphatase

BOP - Blutung auf Sondierung (Engl: bleeding on probing)

CD – cluster of differentiation

COVID-19 - Coronavirus-Krankheit-2019(Engl: coronavirus disease 2019)

DNA – Desoxyribonukleinsäure (Engl: deoxyribonucleic acid)

EDTA – Ethylendiamintetraessigsäure (Engl: Ethylenediaminetetraacetic acid)

HIV – Humanes Immundefizienz-Virus (Engl: Human immunodeficiency virus)

IFN - Interferon

Ig – Immunglobulin

IL – Interleukin

LPS – Lipopolysacharid

MMP – Matrix-Metalloproteasen

NK - natürliche Killer

MHC – Haupthistokompatibilitätskomplex (Engl: major histocompatibility complex)

mm – Millimeter

mRNA – Boten-Ribonukleinsäure (Engl: messenger ribonucleic acid)

PCR – Polymerasenkettenreaktion (Engl: polymerase chain reaction)

PGE-2- Prostaglandin E2

SNP – Einzelnukleotidpolymorphismus (Engl: single nucleotide polymorphism)

SSP - Primersequenz-spezifische

TAE-Puffer - TRIS-Acetat-EDTA-Puffer

TBE-Puffer - TRIS-Borat-EDTA-Puffer

TGF - Transformierender Wachstumsfaktor (Engl: Transforming growth factor)

TNF – Tumornekrosefaktor

TRIS - Tris(hydroxymethyl)aminomethane

TST - Taschensondierungstiefe

UV - Ultraviolet

Abstract Deutsch

Parodontitis ist eine chronisch destruktive entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates, von der 10-15% der erwachsenen Bevölkerung betroffen sind. Parodontitis ist die Hauptursache für Zahnverlust im Erwachsenenalter. Frühere Daten belegen eine entscheidende Rolle mehrerer Zytokine für die Entwicklung und das Fortschreiten der Parodontitis bei Erwachsenen. Darüber hinaus konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass die Zytokinexpression unter genetischer Kontrolle steht und Einzelnukleotidpolymorphismen (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) von Zytokingenen die Höhe der Zytokinproduktion regulieren können. Ausgehend aus der Rolle der Zytokine in Prozessen der Inflammation und der Parodontitisentwicklung sowie ihrer genetischen Regulation analysierten wir in unserer Studie -1082IL-10, -308TNF-alpha, TGF-beta1 (Codon 10, 25), -174IL-6 und +874IFN-gamma-Gen-SNP in einer Kohorte erwachsener kaukasischer Patienten mit und ohne Parodontitis.

236 Patienten wurden in unsere Querschnittsstudie aufgenommen. Basierend auf den standardisierten klinischen und radiologischen Kriterien konnten 122 erwachsene Patienten mit chronischer Parodontitis diagnostiziert und in die Studie aufgenommen werden. 114 nicht verwandte, ethnisch und alters-gematchte kaukasische gesunde Individuen ohne Parodontitis wurden als gesunde Kontrollen in die Studie aufgenommen. Der bukkale Abstrich rekrutierter Patienten wurde unter Verwendung eines sequenzspezifischen Primers (SSP) -PCR genotypisiert. Wir fanden eine signifikant höhere Anzahl von Personen mit -174IL-6 CC-Genotyp in Parodontitisgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (OR = 1,896, 95% CI 1,106 bis 3,250, P = 0,0283). Darüber hinaus war die Häufigkeit des GG-Genotyps von TGF-beta1 (Codon 25) in der Kontrollgruppe signifikant höher als bei Parodontitis-Patienten (OR = 0,459, 95% CI 0,230 bis 0,920, P = 0,0421).

Unsere Daten belegen die Anfälligkeit für die Entwicklung von Parodontitis bei Patienten mit einem bestimmten Zytokin-SNP-Muster. -174IL-6 und TGF-beta1 (Codon 25) SNPs können für die Risikobewertung bei erwachsenen deutschen Patienten verwendet werden.

Abstract English

Periodontitis is a chronically destructive inflammatory disease of the tooth-supporting tissues affecting 10-15 % of the adult population. It represents the major cause of tooth loss in adults. Previous data demonstrated a crucial role of several cytokines for the development and progression of periodontitis in adults. Furthermore, several studies previously demonstrated cytokine expression being under genetic control. Thus, single nucleotide polymorphisms (SNP) of cytokine genes have been demonstrated to regulate the level of cytokine production. Given the potential of cytokines to determine inflammatory balance and periodontitis development and their genetic regulation, we analyzed -1082IL-10, -308TNF-alpha, TGF-beta1 (codon 10, 25), -174IL-6 and +874IFN-gamma gene SNPs in a cohort of adult Caucasian patients with and without periodontitis. 236 patients were enrolled in this cross-sectional study. Based on the standardized clinical and radiographic criteria, 122 adult patients with chronic periodontitis could be diagnosed and enrolled in the study. 114 unrelated, ethnically and age matched Caucasian controls without periodontitis were enrolled in the study as healthy controls. Buccal swabs of recruited patients were genotyped using sequence specific primer (SSP)-PCR.

We detected a significantly higher number of individuals with -174IL-6 CC genotype in periodontitis patients than in the control group (OR=1.896, 95% CI 1.106 to 3.250, P=0.0283). Furthermore, the frequency of TGF-beta1 (codon 25) GG genotype was significantly higher in the control than in periodontitis patients (OR=0.459, 95% CI 0.230 to 0.920, P=0.0421).

Our data demonstrate the susceptibility for periodontitis development in patients carrying a certain cytokine gene SNP pattern. -174IL-6 and TGF-beta1 (codon 25) SNPs can be used for the risk assessment in adult German patients.

1. Einleitung

1.1 Einführung

Die Parodontitis mit ihren verschiedenen Verlaufsformen gehört neben der Karies zu den am weitesten verbreiteten Krankheiten im Zahn- und Mundbereich (Shungin et al., 2019).

Unter Parodontitis versteht man eine bakterielle Infektionserkrankung, die eine chronische Entzündung des Zahnhalteapparates auslöst. Langfristig kann die Parodontitis zum unterschiedlich ausgeprägten Verlust von Desmodont, Alveolarknochen und umgebendem Weichgewebe. Die Parodontitis kann in schweren Fällen zum Zahnverlust führen. Somit stellt die Erkrankung die häufigste Ursache des Zahnverlustes in der erwachsenen Bevölkerung dar (Peng et al., 2019).

Ursächlich sind neben mikrobiellen Faktoren vor allem verschiedene Immunmechanismen an der parodontalen Destruktion beteiligt (Pan et al., 2019). Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte in der Erforschung der pathophysiologischen und molekularbiologischen Vorgänge bei Parodontitis gemacht wurden, sind die einzelnen Mechanismen noch nicht ausreichend untersucht.

Es existieren mehrere Hinweise, dass genetische Faktoren eine wichtige Rolle in der Ätiologie sowie Progression der Erkrankung spielen. Dabei scheinen genetische Polymorphismen unterschiedlicher Zytokine eine besondere Rolle zu spielen. Zytokine sind lösliche Glykoproteine. Sie werden durch unterschiedliche Immunzellen produziert und verfügen über eine immunregulatorische Wirkung (Abbas et al., 1996). Im Allgemeinen wurde Zytokinen in den letzten Dekaden eine große Aufmerksamkeit gewidmet, da sie eine wichtige Rolle in der Pathogenese immunologisch assoziierter Erkrankungen spielen (Pan et al., 2019). Polymorphismen in kodierenden und nicht-kodierenden Genabschnitten können die Expressionshöhe von Zytokinen stark beeinflussen. Es ist daher gut vorstellbar, dass Zytokinpolymorphismen, die zu einer veränderten Produktionskapazität des jeweiligen Zytokins führen, einen Einfluss auf den Verlauf entzündlicher Prozesse Zahnhalteapparat haben.

Die vorliegende explorative Studie soll nun Aufschluss über den Zusammenhang zwischen der chronischen Parodontitis und Polymorphismen in den IL-10, TNF-alpha, IFN-gamma, TGF-beta, IL-6- Zytokingenen bringen.

1.2. Klassifizierung der Parodontalerkrankungen von 1989 bis 1999

Eine Klassifizierung parodontaler Erkrankungen ist im Allgemeinen erforderlich um Ätiologie und Pathogenese zur jeweiligen Form differenziert zuzuordnen und somit die richtigen Diagnosen und Behandlungsstrategien ableiten zu können. Historisch gesehen wurde zunächst im internationalen Workshop von 1989 erkannt, dass Parodontitis mehrere unterschiedliche klinische Erscheinungsformen mit unterschiedliche Erkrankungsalter und Progressionsraten aufweist (Caton J. 1989). Basierend auf diesen Variablen unterteilte der Workshop Parodontitis in

- Präpubertär
- jugendlich (lokalisiert und generalisiert)
- erwachsen
- schnell fortschreitend.

Der im Jahr 1993 veranstaltete Europäische Workshop entschied, dass die Klassifizierung vom 1989 vereinfacht werden sollte und teilte die Parodontitis in zwei Hauptformen (*Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontics, 1993*):

- Parodontitis bei Erwachsenen und
- früh einsetzender Parodontitis.

Ausgehend von dem Erkenntniszuwachs zur Ätiologie und Pathogenese parodontaler Erkrankungen und der daraus resultierenden Notwendigkeit erfolgte 1999 auf dem *International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions* (Annals of Periodontology, Vol.4:1, December 1999) eine wesentliche Überarbeitung der bis dahin geltenden Klassifikation.

Entsprechend der Klassifikation wurden parodontale Krankheiten in sieben folgende Gruppen unterteilt:

- Gingivale Erkrankungen
- Chronische Parodontitis
- Aggressive Parodontitis
- Parodontitis als Manifestation einer Systemerkrankung
- Nekrotisierende Parodontalerkrankungen
- Abszesse des Parodonts
- Parodontitis im Zusammenhang mit endodontalen Läsionen
- Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformationen und Zustände

1.3. Aktuelle Klassifikation parodontaler Erkrankungen

Diese 1999 definierte Klassifikation galt unverändert für 19 Jahre. Während dieser Zeit sind wesentliche neue Resultate aus epidemiologischen Studien, grundlagewissenschaftlichen Daten und Erkenntnisse aus prospektiven Studien zur Bewertung von Umwelt- und Systemrisikofaktoren entstanden. Die Auswertung dieser Evidenzen hat 2017 den internationalen Workshop veranlasst einen neuen Klassifizierungsrahmen für Parodontitis zu entwickeln (Caton et al, 2018; Papapanou et al. 2018). Nach den neuen pathophysiologischen Erkenntnissen hat man drei Formen der Parodontitis unterschieden:

- Nekrotisierende Parodontitis
- Parodontitis als Manifestation einer systemischen Erkrankung
- „einfache“ Parodontitis

Zu der letzten Form der „einfachen“ Parodontitis gehören parodontale Krankheiten, die zuvor als „chronisch“ oder „aggressiv“ klassifiziert wurden. Die beiden Formen sind nach der neuesten

Klassifikation unter der einzigen Kategorie „Parodontitis“ zusammengefasst (Needleman et al. 2018).

In der revidierten Form einigten sich die Workshopteilnehmer auf einen Klassifizierungsrahmen für Parodontitis, der auf der Grundlage eines multidimensionalen Staging- und Gradingssystems basiert und im Laufe der Zeit entsprechend neuen Erkenntnissen angepasst werden könnte (Tonetti et al. 2018). Während das Staging weitgehend von der Schwere der Erkrankung sowie von der Therapiekomplexität abhängt, liefert das Grading zusätzliche Informationen zu den biologischen Merkmalen der Erkrankung, Risikobewertung und Prognose für weiteres Fortschreiten bzw. die therapeutische Response.

Im Workshop definierte man darüber hinaus die parodontale Gesundheit und Gingivitis in einem reduzierten Parodont nach Abschluss der erfolgreichen Parodontitisbehandlung (Chapple et al., 2018).

Die vorliegende Arbeit wurde vor der Einführung der neuen Klassifikation durchgeführt, sodass viele Daten zur Einteilung der Patienten entsprechend der neuen Staging- und Gradingkriterien für die Studienpatienten nicht vorliegen. Aus diesem Grund wird die frühere Klassifikation angewandt und es wird für die eingeschlossenen Patienten der Begriff der chronischen Parodontitis verwendet.

1.4 Parodontitis mit chronischem Verlauf

1.4.1. Manifestation und Diagnosestellung

Die Parodontitis ist weltweit am weitesten verbreitete Erkrankung des Zahnhalteapparates. Diese Erkrankung manifestiert sich meist ab dem 35. Lebensjahr, sodass sie deshalb zeitlang als „erwachsene Parodontitis“ bezeichnet wurde. Da diese Erkrankungsform jedoch auch in jüngeren Patienten zu finden ist, wurde diese Erkrankung in der Klassifikation von 1999 modifiziert, so dass derartige Parodontalerkrankungen bis 2018 als chronische Parodontitis bezeichnet wurden.

Nach ihrer Ausbreitung kann man die chronische Parodontitis kann sich lokalisiert (< 30 % der Gingiva befallen) oder generalisiert (> 30 % der Gingiva befallen) bezeichnen.

Nach dem Schweregrad unterteilt man die generalisierte Parodontitis in drei Formen:

- leichte Form mit einem 1-2 mm klinischen Attachmentverlust
- moderate Form mit einem 3-4 mm klinischen Attachmentverlust
- schwere Form mit einem über 5 mm klinischem Attachmentverlust

Als Attachmentverlust versteht man eine fortschreitende Destruktion des Zahnhalteapparats. Dabei kommt es zum Rückgang aller Strukturen des Zahnhalteapparats. Der Attachmentverlust ist definiert als Distanz zwischen dem Boden der Zahnfleischtasche und der Schmelz-Zement-Grenze.

Zu klassischen Merkmalen der chronischen Parodontitis gehören:

- Auftreten überwiegend im erwachsenen Alter
- Variable Plaquezusammensetzung
- Vorwiegend langsame Progression
- Evtl. Auftreten von Aktivitätsschüben
- Zusammenhang zwischen Destruktion und lokalen Reizfaktoren

Zur Diagnosestellung wird eine klinische Untersuchung durchgeführt, welche durch eine radiologische Dokumentation ergänzt wird. Wichtig ist festzuhalten, dass die Untersuchung der Sondierungswerte und der Attachmentniveaus empfindliche und verlässliche Parameter für die Diagnostik darstellen, während die radiologische Beurteilung des Knochenniveaus mehr einen verifizierenden Charakter hat.

1.4.2 Risikofaktoren der Parodontitis

Die Parodontitis ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung. Entsprechend der Evidenzlage kann man Risikofaktoren in folgende drei Gruppen einteilen (Genco, 1996):

- Bekannte starke Risikofaktoren
- Risikomarker oder Prädiktoren
- Hintergrundfaktoren

Bekannte starke Risikofaktoren sind Einflussgrößen, deren pathogenetische Bedeutung durch kontrollierte Studien nachgewiesen werden konnten. So konnte z.B. gezeigt werden, dass Rauchen das Risiko für eine Parodontitis um das 5- bis 7- fache erhöht (Page und Beck, 1997). Des Weiteren führt der Tabakkonsum unter anderem zur verminderten Immunglobulin (IgG)-Produktion und begünstigt somit den bakteriellen Angriff (Hart und Kornman, 1997). Neben dem Rauchen (Sutton et al., 2017) zählen noch Diabetes mellitus und andere systemische Erkrankungen (Anämien, Neuropathie, AIDS) sowie mikrobielle Plaque an Zähnen zur Gruppe bekannter starker Risikofaktoren (Murakami et al., 2018).

Als Risikomarker bezeichnet man Faktoren, welche in Fallberichten Hinweise auf einen Einfluss auf die Pathogenese liefern. Deren kausale Beteiligung muss jedoch noch durch Verlaufsstudien analysiert bzw. bestätigt werden. Solche Faktoren wie Stress, psychosoziale Belastung, Osteoporose verbunden mit einem Östrogenmangel insbesondere bei menopausalen Frauen, HIV-Infektion sowie genetische Faktoren in Form von Polymorphismen (Salvi et al., 1997) zählen zu Risikomarkern.

Unter Hintergrundfaktoren versteht man Faktoren, die eine klar bewiesene Rolle für die Pathogenese der Parodontitis haben. Deren Einfluss lässt sich jedoch durch therapeutische Mittel nicht beeinflussen. Zu den Hintergrundfaktoren zählt man z.B. das Patientenalter und –geschlecht. Dabei weisen das weibliche Geschlecht und das höhere Alter ein höheres Risiko auf.

In einer weiteren Klassifizierung der Risikofaktoren werden modifizierbare und nicht-modifizierbare Risikofaktoren unterschieden (AlEhani et al., 2014).

Zu den modifizierbaren Risikofaktoren gehören

- Mikrobielle Besiedlung der Mundhöhle, das sogenannte Mikrobiom

Starke Evidenzen belegen, dass *Porphyromonas gingivalis* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in die Pathogenese der Parodontitis involviert sind. Zusätzlich spielen *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, und *Fusobacterium nucleatum* eine bedeutende Rolle in der Fortschreitung bzw. Progression der chronischen Parodontitis (Kou et al., 2008; Dogan et al., 2008; Saito et al., 2008).

- Rauchen

Zahlreiche Hinweise gibt es auf ein stark erhöhtes Risiko von Rauchern an Parodontitis zu erkranken (Kubota et al., 2011). Das Rauchen von Tabak übt eine zerstörerische Wirkung auf das parodontale Gewebe aus und kann somit das Fortschreiten der parodontalen Erkrankung erhöhen. Außerdem verändert der Tabak die Immunreaktion des Wirts auf den bakteriellen Reiz in mikrobiellen Zahnbelägen und fördert eine inflammatorische Antwort im parodontalen Gewebe (Özçaka et al., 2011).

- Diabetes mellitus, Adipositas und kardiovaskuläre Erkrankungen

Ein gestörter Metabolismus scheint für die Entstehung von Parodontitis von Bedeutung zu sein. Mehrere Hypothesen zur kausalen Rolle des Übergewichtes für die Parodontitis sind bekannt, wobei diätetische Faktoren eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Mehrere Studien demonstrieren eine Assoziation zwischen Diabetes und parodontalen Erkrankungen (Nishimura et al., 2005). Frühere Untersuchungen zeigten außerdem, dass ein schlecht eingestellter Diabetes eine

schnellere Progression der Parodontitis auslöst, als ein gut kontrollierter Diabetes (Seppälä et al., 1993). Umgekehrt konnten gezeigt werden, dass ein gut eingestellter Diabetes einen positiven Einfluss auf die parodontale Gesundheit hat (Pucher et Stewart, 2004).

Auch für kardiovaskuläre Erkrankungen existieren Evidenzen über eine Assoziation mit Parodontitis. So wurden verschiedene biologische Mechanismen vorgeschlagen, um die Beziehung zwischen Parodontalerkrankungen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu erklären. Allen voran ist die Rolle der Inflammation für das Entstehen und Fortschreiten von beiden Erkrankungen (Kinane et Lowe, 2000). Man sollte sich jedoch bewusst sein, dass die beiden Krankheiten viele Risikofaktoren gemeinsam haben und es offensichtliche Ähnlichkeiten in zugrundeliegenden Pathomechanismen gibt (Kinane et Lowe, 2000).

Zu den nicht-modifizierbaren Risikofaktoren zählen Osteoporose, individuelle immunologische Antwort, hormonelle Veränderungen der Frauen wie z.B. in der Postmenopause oder in der Schwangerschaft. So zeigte eine Untersuchung der Beziehung zwischen Knochendichte, Kieferknochenschwund und Parodontitis, dass eine verminderte Knochendichte eine Rolle in der Ausprägung von Parodontitis spielt. Die Studienergebnisse demonstrierten einen direkten Zusammenhang zwischen Skelett- bzw. Unterkieferosteopenie und dem Zahnverlust bei Frauen nach der Menopause (Wactawski-Wende et al., 1996). Wie auch für kardiovaskuläre Erkrankungen und Parodontitis können Parodontitis und Osteopenie gemeinsame ätiologische Faktoren haben, die beide Krankheitsprozesse entweder direkt beeinflussen oder modulieren können.

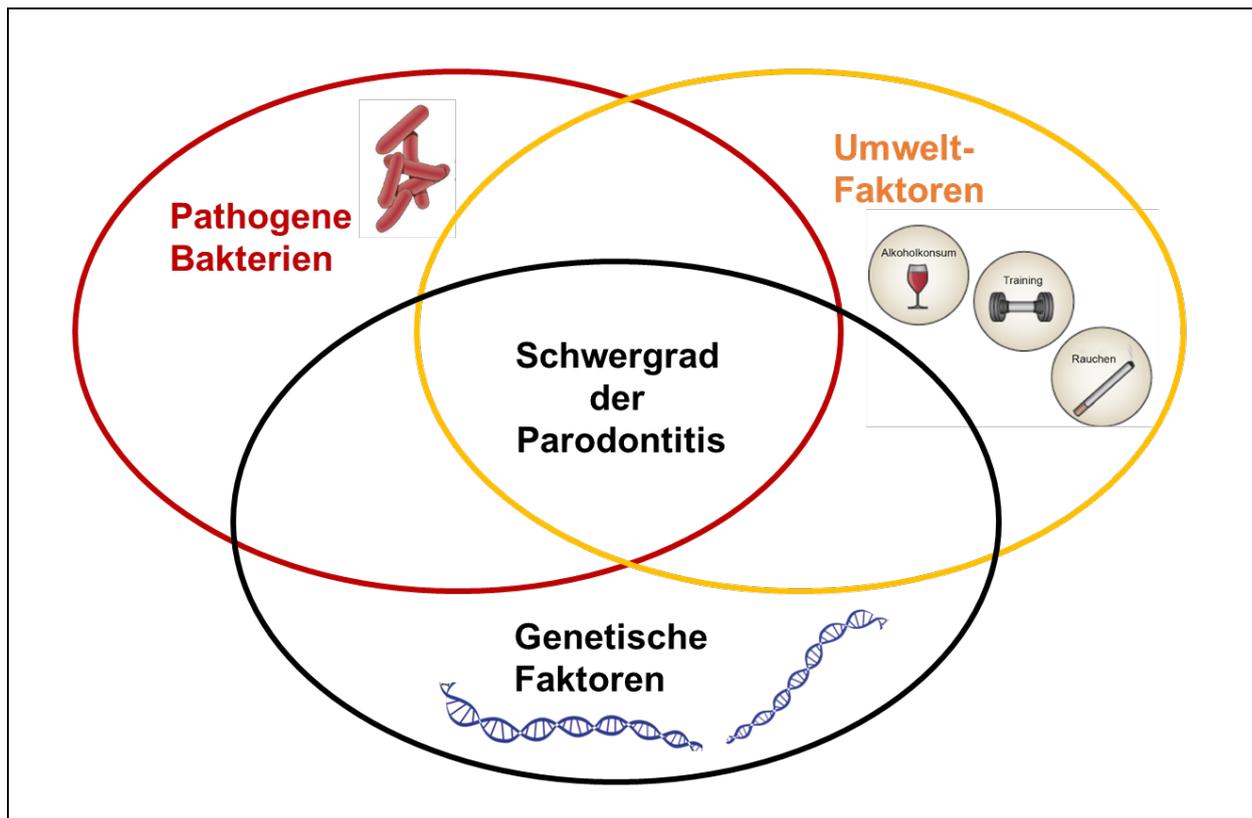


Abbildung 1: Hauptrisikofaktoren der parodontalen Erkrankungen und deren kombinierter Einfluss auf den Schwergrad der Erkrankungen

1.4.3 Entstehung der chronischen Parodontitis

1.4.3.1. Rolle der mikrobiellen Plaquezusammensetzung

Lange Zeit ging man von der sogenannten unspezifischen Plaque- bzw. Zahnbelaghypothese aus. Nach dieser Hypothese kann eine Parodontitis per se durch die allgemeine Zunahme der Plaquemenge entstehen. Daraus lässt sich ableiten, dass Bakterien, die sich im Sulkus befinden, unter dem Einfluss bestimmter Pathogenitätsfaktoren einer Parodontitis auszulösen können. Heute distanziert man sich jedoch von dieser Hypothese, da eine deutliche Korrelation zwischen der Akkumulation bestimmter bakterieller Erreger und dem Schweregrad einzelner parodontaler Erkrankungen eindeutig nachgewiesen wurde (Kou et al., 2008; Dogan et al., 2008; Saito et al.,

2008).

So ist die Beteiligung pathogener Bakterien wie *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus* und *Treponema denticola* als Ursache der Parodontitis gesichert und kann heute durch etablierte Nachweisverfahren überprüft werden. Die anaeroben Bedingungen der Parodontaltasche können das Wachstum der anaeroben oder fakultativ anaeroben parodontopathogenen Bakterien begünstigen, so dass die aeroben Spezies, zu denen vor allem die parodontalen Schutzspezies gehören, zurückgedrängt werden. Die neue Sichtweise der Parodontitis geht weiterhin davon aus, dass es sich bei dieser Erkrankung um ein multifaktorielles Geschehen handelt, bei dem die Kombination verschiedener Faktoren zur Ausbildung der Krankheit führt. Dabei bildet zwar die Plaque einen der wichtigsten Kausalfaktoren für den Attachmentverlust, aber ursächlich verantwortlich ist letztlich die körpereigene Entzündungsreaktion.

1.4.3.2 Immunologische Vorgänge - „Critical pathway“ als Modell der Entwicklung chronischer Parodontitis

Auf der Basis bislang etablierter Daten wurde ein neues pathogenetisches Modell entworfen. Unter dem Namen „critical pathway“ hat man Modell definiert, das ermöglicht pathogenetische Prozesse aus einem anderen Blickwinkel zu betrachten (Offenbacher, 1996; Salvi et al., 1997). Entsprechend dem „critical pathway“ führt die Ablagerung von parodontopathogener Plaque und Konkrementen im Bereich des Zahnhalses durch eine Vernachlässigung der Mundhygiene zur Initiierung der Erkrankung. In diesen Ablagerungen beinden sich in der Regel hoch pathogene Keime. Die sind in der Lage eine Immunreaktion im subgingivalen Gewebe des Zahnhalteapparats auszulösen. Diese Immunreaktivierung kann letztlich zur Etablierung der Parodontitis führen (Offenbacher, 1996; Salvi et al., 1997).

Bei dieser Immunreaktivierung unterscheidet man zwei verschiedene Phasen:

Initialphase und Phase der Parodontitisentstehung.

Initialphase der Immunabwehr – Entstehung einer Gingivitis

Die erste Phase, die sich schnell aktivieren lässt, reagiert weitgehend unspezifisch. An dieser Phase sind im vor allem Neutrophile durch eine spezifische und unspezifische Phagozytose beteiligt. Zusätzlich spielen sowohl das Komplementsystem – als Vertreter des angeborenen Immunsystems als auch die protektiven gegen die pathogenen Keime gerichteten Antikörper eine wichtige Rolle. Entsprechend dem „critical pathway“ Model wird über den weiteren Verlauf der parodontalen Erkrankung durch den Ausgang der ersten Phase der Immunantwort entschieden, wobei die Effektivität der antibakteriellen Immunantwort im Vordergrund steht. Wenn das Immunsystem in der Lage ist die pathogene bakterielle Besiedlung bzw. den bakteriellen Angriff erfolgreich zu kontrollieren und eine vermehrte Proliferation pathogener Bakterien abzuwehren, kann sich die Inflammation nur begrenzt auf der marginalen Gingiva manifestieren. Bei dieser Art der Manifestation kann man von einer Gingivitis sprechen, wobei hier zu keiner irreversiblen Zerstörung des parodontalen Gewebe kommt. Falls die inflammatorischen Prozesse der ersten Phase nicht rechtzeitig unterbrochen werden, kommt es in der zweiten Phase zu überschießenden Abwehrmechanismen der Immunität mit der Folge einer Zerstörung des Parodontiums, wie unten dargestellt ist.

Die zweite Phase der Immunabwehr – Entstehung einer Parodontitis

Wenn in der ersten Phase keine ausreichende Immunabwehr vorhanden ist, kann zu einer starken Vermehrung pathogener Bakterien kommen mit der Folge der Entstehung der subgingivalen Plaqueflora (Müller et al, 2001). Dabei können insbesondere hohe Konzentrationen bakterieller Bestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS) und andere Entzündungsvermittler, die vermehrt im subgingivalen Gewebe vorhanden sind zur starken Expression von Adhäsionsmolekülen führen. Als Folge kommt es zur verstärkten Auswanderung verschiedener Zellen des angeborenen Immunsystems wie von Monozyten und anderen Vertretern des retikuloendothelialen Systems

(Page et Kornman, 1997). Diese Immunzellen können im Gewebe differenzieren. Die dabei entstehenden Makrophagen können zwei unterschiedliche Funktionen ausüben. Auf einer Seite können sie pathogene Bakterien phagozytieren und bakterielle Antigene den CD4+-Helferzellen präsentieren. Dieser Prozess löst eine spezifische antibakterielle Immunantwort aus, wobei mehrere Zytokine (Interleukin (IL)-2, IL-4, IL-10, IL-12, Interferon (IFN)-gamma, IL-1beta, Tumornekrosefaktor (TNF)-alpha) an diesen zellulären und humoralen Immunantworten beteiligt werden können (Müller et al., 2001; Gemmel et al., 1997).

Auf der anderen Seite können die aus den Monozyten differenzierten Makrophagen unter dem Einfluss einiger bakterieller Bestandteile wie z.B. LPS direkt eine Produktion unterschiedlicher Zytokine auslösen. Dazu gehören unter anderem pro-inflammatorischer Zytokine und Faktoren einschließlich IL-1alpha, IL-1beta, IL-6, TNF-alpha, PGE₂ sowie Matrixmetalloproteinasen (MMP) 1 und 8 auslösen. (Reynolds et Mekle, 1997). Außerdem werden die Matrixmetalloproteinasen auch durch neutrophile Granulozyten und parodontale Fibroblasten unter dem Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine gebildet (Reynolds et Mekle, 1997). Insbesondere für diese Enzymgruppe ist eine destruierende Wirkung mit einer starken Zerstörung im kollagenen Anteils des parodontalen Gewebes wie Knochen und Bindegewebe bekannt (Reynolds et Mekle, 1997; Page et Kornman, 1997). Auf diese Weise entstandene Parodontaltaschen bieten deutlich bessere Lebensbedingungen für die pathogenen Bakterien. Dies führt einerseits zur weiteren bakteriellen Proliferation, andererseits löst es aber eine verstärkte antibakterielle Antwort aus. So kann der auf diese Weise entstandene Teufelskreis über eine längere Zeit persistieren und bis zum vollständigen Abbau Zahnhalteapparats um die Zahnwurzel führen. Als Folge können Zahnlockerung oder Zahnverlust im späteren Verlauf entstehen.

Insgesamt kann man am Modell des „critical pathway“ verdeutlichen, dass die Parodontitis ein Ausdruck einer gestörten Wechselbeziehung zwischen der Keimbesiedlung der Mundhöhle und

der Immunität des Organismus darstellt. Insbesondere spielen Entzündungsmediatoren, wie z.B. Zytokine, hier eine wichtige Rolle.

1.5. Zytokine

1.5.1 Allgemeines

Zytokine sind immunregulatorische Glykoproteine, die von verschiedenen Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems produziert werden (Abbas et al., 1996). Verschiedene Bezeichnungen wurden in den vergangenen Jahrzehnten den löslichen Molekülen verliehen, wobei man sie nach deren Wirkung und Quelle unter folgenden Begriffen zusammengefasst hat:

Interleukine – die häufigste Bezeichnung. Dazu gehören Zytokine, die überwiegend Zellinteraktionen hervorrufen

Lymphokine – die von Lymphozyten gebildeten Zytokine

Monokine – die von Monozyten/Makrophagen gebildeten Zytokine

Zytokine können an verschiedene Rezeptoren binden und unterschiedlichste Wirkungen entfalten. Dies bezeichnet man als pleiotrope Wirkung. Des Weiteren können Zytokine autokrin, parakrin oder systemisch wirken. Zytokine besitzen eine sehr kurze Halbwertszeit. Bei jedem neuen Stimulus kommt es zur Neusynthese von Zytokinen (Oppenheim, 2001).

Zytokine übernehmen zahlreiche Funktionen im Immunsystem. Zu deren Hauptaufgaben zählen die Kontrolle der Proliferations-, Wachstums- und Differenzierungsprozesse, Koordination der Apoptose (programmierter Zelltod) und der Angiogenese sowie die Regulation des erworbenen und angeborenen Immunsystems.

Die Wirkung der Zytokine ist oft redundant. Frühere Arbeiten an genetisch manipulierten, sogenannten Knock-out-Mäusen konnten die Zytokinredundanz beweisen (Abbas et al., 1996). Dies macht deutlich, dass Zytokine nicht durch Einzel- sondern durch deren Zusammenwirkung für jeweilige biologische Effekte verantwortlich sind. Somit führt die Wechselwirkung in

komplexen Prozessen unterschiedlicher Zytokinen entweder zu regulierenden oder pathologischen Prozessen.

1.5.2. Interleukin-6 (IL-6)

Das Interleukin-6 ist ein pleiotrop wirkendes Zytokin, das von einer Vielzahl verschiedener Zellen wie z.B. Monozyten/Makrophagen, Kupferzellen, Neutrophilen, Mastzellen, T- und B-Lymphozyten, Fibroblasten, Osteoblasten u.a. gebildet wird. Die IL-6-Synthese kann durch andere Zytokine (wie IL-1, TNF-alpha), bakterielle Bestandteile (LPS) oder virale Nukleinsäure stimuliert werden. Das Zytokin gehört zur Gruppe pro-inflammatorischer Zytokine und ist einer der wichtigsten Entzündungsregulatoren im Organismus. Das IL-6 fungiert einerseits als wesentlicher löslicher Faktor der angeborenen Immunität und andererseits als Vermittler zwischen der angeborenen und erworbenen Immunität. Als wichtiger Aktivator der Immunantwort ist IL-6 an der akuten Inflammation insbesondere durch das Anlocken verschiedener Immunzellen an den Ort der Entzündung sowie deren Differenzierung und Regulation beteiligt (Scheller et al., 2011). Mehrere Studien liefern Evidenzen über die führende Rolle von IL-6 bei der Transition von angeborener zur erworbenen Immunantwort (Scheller et al., 2011). IL-6 kann die T-Zell-Entwicklung beeinflussen und die Differenzierung verschiedener T-Helfer (Th) -Zellsubtypen wie Th2- und Th17-Zellen verschieben. Darüber hinaus wird in den letzten Jahren zunehmend über die Rolle von IL-6 in der Kontrolle metabolischer Prozesse, Knochenstoffwechsel und Schmerzregulation berichtet. Die wichtige Rolle von IL-6 für die Progression infektionsbedingter Erkrankungen konnte kürzlich in mehreren schweren Fällen von COVID-19 demonstriert werden. Neben dem stark erhöhten Spiegeln von IL-6 konnte der erfolgreiche therapeutische Einsatz von IL-6-blockierenden Medikamenten auf die kausale Rolle für die Progression der COVID-19 (Campochiaro et Dagna, 2020) hinweisen.

1.5.3 Interleukin-10 (IL-10)

IL-10 ist ein multifunktionales Zytokin mit diversen biologischen Wirkungen auf die meisten hämatopoetischen Zellen. Die wichtigste Wirkung von IL-10 scheint die Deaktivierung von Makrophagen und anderen Antigen-präsentierenden Zellen (dendritische Zellen, B-Lymphozyten) zu sein. Zudem reguliert IL-10 das Wachstum und/oder Differenzierung von B-Zellen, natürliche Killer (NK)-Zellen, zytotoxischen und T-Helferzellen, Mastzellen, Granulozyten, Keratinozyten, dendritischen und endothelialen Zellen. Besonders interessant ist, dass Homologe des IL-10-Gens in verschiedenen viralen Genomen (wie z.B. Epstein-Barr-Virus oder Zytomegalievirus) gefunden wurden. Diese homologen Gene, die teilweise ähnlich biologische Effekte auslösen können, liefern einen weiteren Hinweis auf die bedeutende Rolle von IL-10 innerhalb der Entzündungsreaktion und des Immunsystems (Poole et al., 2014). Im Gegensatz zu IL-6 wird IL-10 die anti-inflammatorische Rolle zugeschrieben (Penaloza et al., 2016).

1.5.4 Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-alpha)

Tumornekrose Faktoralpha (TNF-alpha) ist ein pleiotrop wirkendes pro-inflammatorisches Zytokin. Die meisten Organe des Körpers scheinen durch TNF-alpha beeinflusst zu werden und das Zytokin übt eine Vielzahl noch nicht komplett verstandener Funktionen aus. Das Zytokin besitzt sowohl wachstumsfördernde als auch wachstumshemmende Eigenschaften. Zum Beispiel verursacht TNF-a Neutrophilie während der Entzündung, kann aber nach der Bindung des TNF-R55 eine Apoptose der Neutrophilen auslösen (Murray, et al., 1997).

Eine wichtige Funktion des TNF-alpha besteht in der pro-inflammatorischen Antwort auf eine bakterielle, virale oder eine Pilzinfektion (als akutes Phase Protein), sowie in seiner Rolle in der Nekrose bestimmter Tumorarten.

Außerdem führt TNF-alpha in Endothelzellen zu Aktivierungsprozessen wie Zytokinproduktion, Expression von Adhäsionsmolekülen, Freisetzung prokoagulatorischer Substanzen und zur Synthese von Stickstoffmonoxid. B- und T-Lymphozyten werden unter TNF-Einfluss stimuliert. Im Gehirn wird durch TNF-alpha die Fieberreaktion induziert. Ähnlich wie IL-6 scheint TNF-alpha eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel zu spielen. In der letzten Zeit haben sich Hinweise gehäuft, dass TNF-alpha an Demineralisierungsprozessen und Knochenabbau beteiligt ist. Einige Studien zeigten, dass eine Überproduktion vom TNF-alpha mit dem Knochengewebeverlust bei Patienten mit Rheumatoidarthritis (Bingham CO et al., 2002), multiplem Myelom (Jurisic V, 2002), Lockerung der Hüftkopfprothesen sowie mit Parodontalerkrankungen (Graves DT, 2003) assoziiert ist.

1.5.5 Transforming growth factor beta (TGF-beta)

TGF-beta gehört zu einer Zytokinfamilie, welche Proteine mit pleiotroper Funktion aber auch mit einzigartigen und potenten immunregulatorischen Eigenschaften einschließt. Das Zytokin kann von jeder Blut-Zellreihe produziert werden, einschließlich Leukozyten, Makrophagen und dendritische Zellen und kann in auto- und parakrinem Modus wirken. Auf diese Weise kontrolliert TGF-beta die Proliferation, Differenzierung und Aktivierung der Immunzellen. TGF-beta kann die Expression von Adhäsionsmolekülen modulieren sowie Chemotaxis der Granulozyten regulieren. TGF-beta gilt als ein potenter Inhibitor der Proliferation lymphoider Zellen und ein Aktivator der Zellproliferation bei der Gewebereparatur und –differenzierung (Sporn et al., 1999).

Das Zytokin spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung und im Wachstum von embryonalem und adultem Gewebe, Entzündung, Wundheilung und Angiogenese. Seine Effekte werden auf autokrine und parakrine Weise vermittelt. Das Wachstum endotelialer und epithelialer Zellen wird durch TGF-beta gehemmt, wohingegen mesenchymale Zellen in ihrem Wachstum gefördert

werden (Clark et al., 1998). Die Wirkung vom TGF-beta ist von seiner Konzentration abhängig. In niedriger Konzentration bewirkt es eine Stimulierung in hoher Konzentration jedoch eine Hemmung der Zellproliferation (Clark et al., 1998). Unterschiedliche Mitglieder der TGF-beta-Superfamilie rufen verschiedene Antworten im Körper hervor. Die Knochenmatrix enthält die höchste Konzentration von TGF-beta im Körper. Dort stimuliert es die Kollagensynthese und beeinflusst die mRNA-Expression von alkalischer Phosphatase (AP) in Osteoblasten und Fibroblasten. Das fördert die Matrixproteinsynthese und Knochenneubildung. Direkte TGF-beta Applikation auf die Schädelkalotte von Mäusen zeigt eine lokal vermehrte Knochenreifung und – Bildung (Marcelli et al., 1990).

TGF-beta 1 wird vornehmlich von Osteoblasten gebildet und in die Knochenmatrix inkorporiert. Schwankungen in pH-Werten können TGF-beta aktivieren. TGF-beta scheint der wichtigste Mediator im Knochenmetabolismus zu sein, in dem es eine inhibierende Wirkung auf Osteoklasten einschließlich Förderung der Apoptose, Hemmung der Proliferation sowie fördernde Wirkung auf Osteoblasten wie Proliferation, Differenzierung und Chemotaxis hat.

1.5.6 Interferon-gamma (IFN-gamma)

Interferon (von engl. *to interfere* eingreifen, sich einmischen) ist ein Zytokin mit einer immunstimulierenden, vor allem antiviralen und antitumoralen Wirkung. IFN-gamma, ein Vertreter der Interferonfamilie unterscheidet sich von zwei anderen Interferongruppen und wird hauptsächlich von zytotoxischen CD4+- oder CD8+-T-Zellen, sowie in erheblichem Maße von natürlichen Killerzellen produziert. Die Synthese erfolgt sowohl nach Stimulation durch Antigen präsentierende Zellen, als auch Antigen-unabhängig durch andere Zytokine wie IL-12 und IL-18. Bislang wurde IFN-gamma vor allem ein pro-inflammatorischer Effekt zugeschrieben, wozu die

Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen und die Syntheseinduktion der MHC-Proteine der Klasse II zählen.

Die antivirale Wirkung von IFN-gamma besteht in der Hemmung der Proliferation und der Proteinbiosynthese der infizierten Körperzellen, um eine Vervielfältigung der Viren zu verhindern. Des Weiteren aktiviert IFN-gamma phagozytierende Zellen, wie Makrophagen, die nun verstärkt apoptotische Körperchen von infizierten Zellen aufnehmen und eliminieren. Zusammen mit TNF-alpha spielt IFN-gamma auch eine entscheidende Rolle für die mikrobielle und insbesondere antivirale nichtzytotoxische Aktivität der NK-Zellen (Guidotti, 2001). In den Lymphknoten können NK-Zellen durch Produktion von IFN-gamma die Differenzierung von naiven T-Lymphozyten in Th1-Zellen unterstützen (Young und Bream, 2007) und tragen somit entscheidend zur Induktion einer pro-inflammatorischen Immunantwort bei (Morandi et al., 2006; Moretta et al., 2006; Zanoni et al., 2007).

1.6 Genetische Prädisposition und Zytokingenpolymorphismen

Die große interindividuelle Variabilität von Krankheitsverläufen in der Allgemeinbevölkerung lässt sich häufig nicht allein durch bekannte Risikofaktoren erklären. Vielmehr scheint auch der genetische Hintergrund des einzelnen Patienten die Inzidenz, Verlauf und Mortalität verschiedener Krankheitsbilder zu verändern. Untersuchungen der letzten Jahre haben eine wichtige Rolle der so genannten Polymorphismen gezeigt. Als Polymorphismus bezeichnet man das Auftreten eines bestimmten Allels in einer Population. Nach der Definition muss die Häufigkeit des Auftretens der Allelfrequenz in einer Population größer als ein Prozent sein (Emory und Rimoins, 2013). Genvarianten, die mit ihren Häufigkeiten unter einem Prozent liegen, bezeichnet man als Mutationen. Somit ist ein Polymorphismus eine Normvariante.

Nach heutigen Erkenntnissen lassen sich drei Polymorphismusvarianten unterscheiden:

- Multiplikationen
- Insertions- oder Deletionspolymorphismen
- Einzelnukleotidpolymorphismen (Englisch: single nucleotide polymorphisms, SNP)

Die SNPs gehören zu den häufigsten DNA-Sequenzvariationen. Wie der Name sagt, wird ein Nukleotid in der Sequenz durch ein anderes ersetzt. Diese genetischen Variationen sind relativ häufig im gesamten Genom verteilt. Man nimmt an, dass alle 200-1000 Basenpaare ein SNP vorkommt.

Polymorphismen treten häufiger in nicht-kodierenden Bereichen auf. Dies hängt am ehesten damit zusammen, dass die Veränderung in kodierenden Bereichen meistens zu Proteinstrukturänderungen und damit zur Funktionsänderung oder zum Verlust des exprimierten Proteins führen. Mutationen in nicht-kodierenden Regionen beeinträchtigen dagegen die Aminosäuresequenz nicht. Sie können jedoch häufig die Proteinexpression auf verschiedenste Art und Weise beeinflussen. So können die Polymorphismen in nicht-kodierenden Bereichen zum

- Zum veränderten Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren durch Mutationen innerhalb des Promoters führen oder
- Ein verändertes mRNA-Splicing hervorrufen, was mRNA-Stabilität und Gentranslationsniveau beeinflussen kann
- Zur veränderten Enhancer- bzw. Silencer-Struktur führen, welche die Gentranskription beeinträchtigt

Frühere Untersuchung mehrerer Arbeitsgruppen konnten Assoziationen zwischen zahlreichen Genpolymorphismen und verschiedenen somatischen Erkrankungen nachweisen. Das Hauptziel dieser Genpolymorphismus-Analysen liegt dabei in folgenden Punkten:

- Aufklärung der Pathomechanismen humaner Erkrankungen
- Identifizierung potenzieller Biomarker für die Prädiktion humaner Erkrankungen deren klinischen Verlauf

- Screening und Identifizierung potenzieller Targets für neuartige therapeutische Interventionen
- Identifizierung neuer Biomarker für die Erkrankungsprävention.

2. Fragestellung

Die Kommunikation zwischen verschiedenen Bestandteilen des Immunsystems ist sehr komplex. Löslichen und zellgebundene Signale können infolge einer Immunantwort entstehen. In ihrer Wirkung ist die Immunität multifaktoriell. Zytokine spielen dabei eine der zentralen Rollen. Neben der Art und Dauer der Immunantwort-auslösenden Stimulation, spielen genetische Faktoren eine wichtige Rolle für die Zytokinproduktion. Früheren Untersuchungen zufolge ist die Höhe der Zytokinexpression genetisch determiniert (Vandenbroeck K et al.), wobei diese genetische Prädisposition meistens durch SNPs verursacht wird.

Durch die Einführung neuer Technologien inkl. *Next Generation Sequencing* sind heute Genpolymorphismen für alle bekannten Zytokine identifiziert worden. Zahlreiche Studien belegen eine Assoziation zwischen verschiedenen Erkrankungen und Zytokin-SNP. Es wird jedoch in diesen Studien häufig die Tatsache ignoriert, dass es eine starke Komplexität in der Zytokininteraktionen und deren gegenseitigen Regulation existiert. Während individuelle Assoziationen nicht selten wenig wegweisend sein können, lassen sich die Anfälligkeit für eine Erkrankung bzw. ihren klinischen Ausgang durch die Kombination verschiedener Zytokingenotypen oft viel besser vorhersagen. Demnach erscheint eine kombinierte Analyse relevanter Zytokingenpolymorphismen viel sinnvoller als die Betrachtung von Einzelgenen. Dies erfordert aber auch größere Fallzahlen für eine powervolle statistische Auswertung in klinischen Studien, da die Zahl der zu betrachtenden Subgruppen steigt.

Die in der vorliegenden Studie untersuchten Zytokine gehören neben dem Interleukin-1 zu den wichtigen Zytokinen, die eine Inflammation im Gewebe sowie Gewebe- und Knochenmetabolismus regulieren und somit an der Entstehung bzw. dem Fortschreiten der

Parodontitis beteiligt sind. Im Rahmen der vorliegenden Studie soll die Rolle des genetischen Backgrounds in diesem Prozess untersucht werden.

Folgende zentrale Fragestellung soll adressiert werden:

Haben Patienten mit Parodontitis (unter der Einbeziehung der Klassifikation von 1999: chronische Parodontitis) ein im Vergleich zur Normalpopulation abweichendes Zytokin-Genpolymorphismusmuster, was sie unter dem Einfluss von Entzündungstriggern (bakterielle Zusammensetzung der Mundflora) zur Entstehung einer chronischen Parodontitis prädisponiert?

Diese zentrale Fragestellung soll in folgenden 5 Fragen detailliert beantwortet werden:

1. Gibt es eine Assoziation zwischen den Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) im Promotorbereich des IFN-gamma und der Manifestation der chronischen Parodontitis?
2. Lassen sich Unterschiede in der Verteilung von IL-6-SNPs zwischen den Patienten mit chronischer Parodontitis und der gesunden Kontrollkohorte nachweisen?
3. Gibt es eine Assoziation zwischen den Einzelnukleotidpolymorphismen im Promotorbereich des TNF-alpha und dem Auftreten der chronischen Parodontitis?
4. Lässt sich eine Assoziation zwischen der Einzelnukleotidpolymorphismen im Promotorbereich des IL-10 und der chronischen Parodontitis nachweisen?
5. Lassen sich Unterschiede in der Verteilung von TGF-beta-SNPs zwischen den Patienten mit chronischer Parodontitis und der gesunden Kontrollkohorte nachweisen?

3. Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Zur Beantwortung der gestellten Fragen wurde eine prospektive Fall-Kontroll-Studie geplant und durchgeführt. Da es sich um einen explorativen Ansatz gehandelt hat und keine Annahmen zu den Häufigkeiten der untersuchten Variablen getroffen werden konnte, wurde keine Fallzahlanalyse durchgeführt. Um ein sogenanntes „*Underpower*“ zu vermeiden wurde geplant mindestens 100 Patienten pro Gruppe einzuschließen. Die Patienten wurden entsprechend den geplanten Einschluss- und Ausschlusskriterien rekrutiert. Der Einschluss in die Studie erfolgte nach der entsprechenden Aufklärung und der schriftlichen Einwilligung durch den Patienten bzw. Probanden. Die Studie wurde entsprechend der Deklaration von Helsinki durchgeführt, ein positives Ethikvotum wurde vor dem Beginn der Studie erteilt (EA2/063/05).

Für die Rekrutierung der Patienten sowie der Kontrollgruppe wurden Ein- und Ausschlusskriterien definiert.

Einschlusskriterien:

1. Alter 18 Jahre oder älter
2. Diagnose einer chronischen Parodontitis (s. Parodontitisfaktoren)
3. Einwilligung in die Studie

Ausschlusskriterien:

1. Alter jünger als 18 Jahre
2. Fehlende Diagnose einer chronischen Parodontitis (s. Parodontitisfaktoren)
3. Fehlende Einwilligung in die Studie
4. Systemische Erkrankungen
5. Schwangere Frauen

Die chronische Parodontitis wurde anhand der folgenden Faktoren festgestellt:

1. Untersuchung der Taschensondierungstiefe an sechs verschiedenen Stellen bezogen auf einen Zahn. Dies schließt mesio-bukkale, medio-bukkale, disto-bukkale, mesio-orale, medio-orale und disto-orale Messungen
2. Untersuchung und Registrierung der Blutung auf Sondierung (*bleeding on probing*, BOP)
3. Messung des Furkationsbefalls mittels einer Naber-Sonde PQ2N. Die Messung erfolgt vom Eingang der Bifurkation benachbarter Wurzeln bis zum Defektende in horizontaler Richtung. Die beobachteten Befunde des Furkationsbefalls lagen zwischen 2 mm horizontaler Attachmentverlust bis zum durchgängigen Furkationsbefall (entsprechend Grad I – III nach Klassifikation von Nyman und Lidhe (1997)).
4. Untersuchung der Zahnbeweglichkeit unter Anwendung von 2 Instrumentengriffen:
Grad I Zahnkrone ist beweglich und bis 1 mm auslenkbar
Grad II Zahnkrone ist beweglich und mehr als 1 mm auslenkbar
Grad III Zahnkrone bewegt sich bei Anwendung des Lippen- und Wangendruckes auch in axialer Richtung

Zur Beurteilung von horizontalen und vertikalen Knochenabbau wurden Röntgenbilder angefertigt.

Kontrollpopulation

Als Kontrollgruppe wurden 114 ethnisch gleich zur Patientengruppe stehende Patienten ausgewählt.

Folgende Einschlusskriterien lagen für die Kontrollgruppe vor:

1. Vorhandensein von minimal 22 Zähne in situ
2. Kein Messpunkt mit einer TST von 3 mm oder mehr
3. Kein Vorhandensein des Furkationsbefalls

4. Vorhandensein einer Einwilligungserklärung
5. Alter mehr als 40 Jahre

Der letzte Punkt der Einschlusskriterien wurde aufgrund der Erstmanifestation der chronischen Parodontitis bei einem Teil der Patienten erst im Alter bis zu 40 Jahren definiert. Somit wurde ausgeschlossen, dass potenzielle Parodontitispatienten falsch in die Kontrollgruppe eingeschlossen sind.

Zu Ausschlusskriterien gehörten:

1. Vorhandensein von weniger als 22 Zähne in situ
2. Ein oder mehr Messpunkte mit einer TST von 3 mm oder mehr
3. Vorhandensein des Furkationsbefalls
4. Alter jünger als 40 Jahre
5. Patienten mit systemischen Erkrankungen
6. Schwangere Patientinnen
7. Fehlende Einwilligungserklärung

3.2 Materialgewinnung

Epithelzellen der Wangenschleimhaut wurden mittels eines Abstrichs der Wangenschleimhaut gewonnen. Kurz zusammengefasst wurden 2 Abstriche mit sterilen Wattestäbchen nach einer Mundspülung mit Wasser durchgeführt, steril verpackt und bis zur weiteren Verarbeitung bei +4°C gelagert.

3.3 DNA-Isolation

Prinzip der Methode

Nach dem Verdau der DNA-umgebenden Proteine (z.B. Hüllenproteine der Viren) mittels Proteinase K, wird die freie DNA im Prozess der Festphasenextraktion während eines Zentrifugationsschrittes an eine Silikagelmembran gebunden. Es folgen Waschschriffe zur Entfernung kontaminierender Proteine und sonstiger Substanzen. Die gebundene DNA wird danach in einem kleinen Volumen eluiert und kann bis zur Bestimmung innerhalb von 24 Stunden bei 4-8 °C oder bei späterer Bestimmung bei – 20°C gelagert werden.

Durchführung der Methode

Die DNA-Isolation wurde nach Anleitung des Herstellers (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Das Abstrichzellen-tragende Ende des Abstrichröhrchens wurde mit sterilen Scheren abgetrennt und in ein Falconröhrchen mit 200 µl destilliertem Wasser getaucht. Nach kurzem Schwenken des Falconröhrchen zum Trennen der Abstrichzellen von der Watte wurde die Watte aus dem Falcontube entfernt. In das Falconröhrchen wurde 20 µl Proteinase K sowie 200 µl des Puffers AL (QIAamp^R DNA Mini Kit) hinzupipettiert. Das Gemisch wurde 15 sek mit dem Vortex-Gerät gemischt und anschließend 10 min im Heizblock inkubiert. Danach wurden die Proben 10 sek bei 6000 G (8000 rpm) zentrifugiert (verhindert Tropfenrückstände an den Innenseiten der Gefäßdeckel). 200 µl Ethanol (100 %) wurde zu jeder Probe hinzugegeben und 15 sek mit dem Vortex-Gerät gemischt. Der gesamte Inhalt des Röhrchens wurde auf eine vorher beschriftete Spinsäule in einem 2 ml Auffangröhrchen pipettiert (QIAamp^R DNA Mini Kit). Die Spinsäule zusammen mit dem Auffangröhrchen wurden für 1 min bei 6000 G (8000 rpm) zentrifugiert. Die Spinsäule wurde aus dem Auffangröhrchen entnommen und das Auffangröhrchen verworfen. Danach wurde die Spinsäule in ein neues Auffangröhrchen eingesetzt und 500 µl des Puffers AW1 (QIAamp^R DNA Mini Kit) hinzupipettiert. Das Auffangröhrchen wurde für 1 min bei 6000 G (8000 rpm) zentrifugiert, die Spinsäule erneut aus dem Auffangröhrchen entnommen und in ein neues Auffangröhrchen eingesetzt. 500 µl des Puffers

AW2 (QIAamp^R DNA Mini Kit) wurde hinzupipettiert. Danach wurde das Auffangröhrchen für 5 min bei 20000 G (13500 rpm) zentrifugiert. Anschließend wurde die Spinnsäule in ein vorher beschriftetes 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gestellt und 75 µl des Aqua dest. hinzugegeben. Die Probe blieb 5 min stehen. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß 1 Minute bei 6000 G (8000 rpm) zentrifugiert, die Spinnsäule aus dem Reaktionsgefäß entfernt und verworfen. Das Reaktionsgefäß mit DNA-Eluat wurde bei 4-8 °C (PCR-Messung innerhalb von 24 Stunden) oder bei -20 °C (PCR-Messung nach 24 Stunden) aufbewahrt.

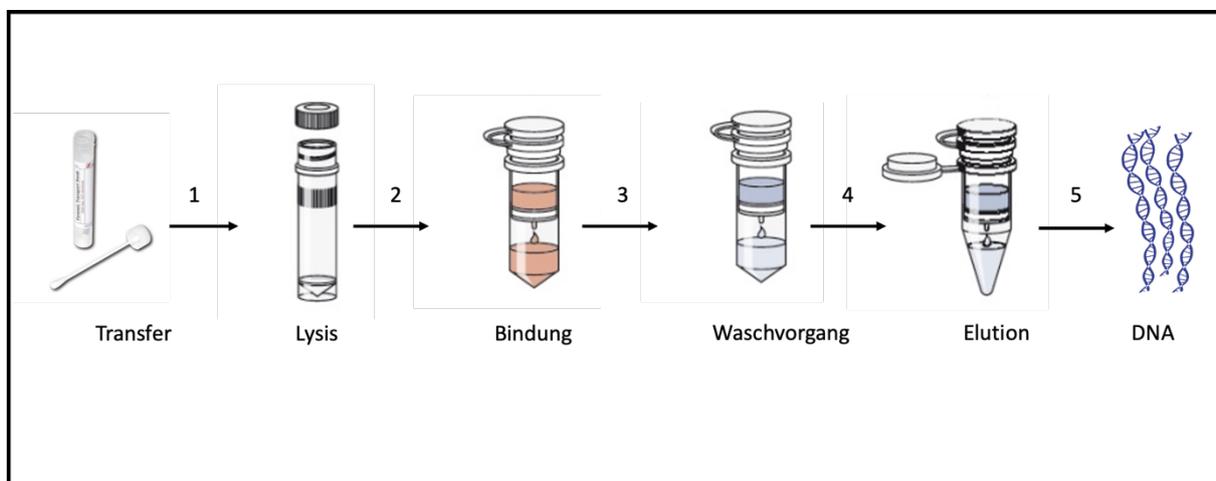


Abbildung 2: DNA-Isolation (Prinzip der Methode)

Adaptiert aus dem Handbuch für die Isolation der DNA (QIAamp Fast DANN Handbook, Qiagen, Hilden, Deutschland).

3.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Prinzip der Methode

Die Bestimmung der Konzentration erfolgte mittels photometrischer Analyse bei einer Wellenlänge von 260 nm. Bei dieser Wellenlänge weist die DNA die maximale Absorptionskapazität auf. Die Berechnung erfolgte nach dem Lambert-Berr'schen Gesetz:

$$C = E_{260 \text{ nm}} \times f / (e \times d)$$

C – Konzentration der DNA in ng/μl

E_{260 nm} – gemessener Extinktionswert bei 260 nm Wellenlänge

F – Verdünnungsfaktor

e - Extinktionskoeffizient (für Doppelstrang-DNA – 50⁻¹ μl/ng)

d – Schichtdicke (1 cm)

Für die Messungen wurde 1:10 Verdünnungen hergestellt, bei dieser Konzentration lagen die Extinktionswerte zwischen 0,1 und 1, was einer linearen Beziehung zwischen der C und E entspricht. Die Messung erfolgte in einem Photometer der Fa. Biochrom. Eine Verunreinigung der DNA mit Proteinen, die im Rahmen des Isolierungsprozesses auftreten kann, kann durch die Bestimmung der Ratio der Absorption bei 260/280 nm abgeschätzt werden.

Zielgrößen:

Konzentration > 20 ng/μl

260/280 nm Ratio 1,6 – 2,0

Bei den von den Zielgrößen abweichenden Werten wurde der Isolationsschritt wiederholt.

Durchführung der Methode

Leerwertbestimmung und Reinigung der Küvette

Die Küvette wurde durch 5-maliges Spülen mit je 150 μl Aqua dest. gereinigt. Nach der Eingabe der Küvettschichtdicke, der Konzentrationseinheiten, den Verdünnungsfaktor sowie Wellenlänge des Probenspektrums wurde 100 μl Aqua dest in die gereinigte, trockene Küvette hineinpipettiert. Danach folgte die Messung des Leer/Bezugswertes.

Messung der DNA-Konzentration der einzelnen Proben

Nach dem Auftauen der DNA-Eluate wurden die Proben sorgfältig gevortext (15 sec, höchste Stufe). Anschließend wurde 90 μl Aqua dest. in ein 1,5 ml Plastikröhrchen hineinpipettiert, dazu

wurde 10 µl der DNA-Probe addiert und 15 sec bei höchster Stufe vermischt. Die Lösung wurde danach in die gereinigte, trockene Küvette überführt und anschließend im Spektrophotometer gemessen. Nach jeder einzelnen Messung wurde die Küvette durch 5-maliges Spülen mit je 150 µl Aqua dest gereinigt.

3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Prinzip der Methode

PCR kommt zum Einsatz meistens in medizinischen und biologischen Laboratorien. Dabei kann die Methode in einer Reihe von verschiedenen Szenarien eingesetzt werden. So kann man mittels PCR Vaterschaft- bzw. Verwandtschaftsanalysen betreiben, Erbkrankheiten identifizieren, forensische Gutachten erstellen und vieles mehr.

Der große Vorteil der Methodik besteht darin, dass für die PCR sehr wenig Ausgangsmaterial benötigt wird. Die Methode ist hoch sensitiv, in manchen Fällen genügt ein einziges DNA-Molekül. Während der Kettenreaktion wird ein kleiner Teil eines langen DNA-Strangs durch das Enzym DNA-Polymerase verdoppelt. Dieser DNA-Abschnitt wird durch die Primer - kurze, künstliche DNA-Stücke, die exakt mit dem Beginn bzw. dem Ende des zu kopierenden Strangs übereinstimmen und als Matrize dienen- festgelegt.

Der PCR-Prozess besteht aus mehreren Wiederholungen. In der Regel sind bis zu 40 Wiederholungen ausreichend. Diese Wiederholungen werden als Zyklen genannt und bestehen aus drei folgenden Schritten (siehe Abbildung 3):

1. *Melting* (Denaturierung/Schmelzen). Während dieser ersten Phase wird die doppelsträngige DNA in ihre zwei Stränge aufgeteilt. Dies erfolgt bei 96°C und dauert in der Regele 30 bis 60 Sekunden.

2. *Annealing* (Anlagerung). In diesem Schritt lagern sich die Primer an die in der ersten Phase frei gewordenen einzelnen DNA-Stränge an. Die Anlagerung erfolgt üblicherweise bei Temperaturen von 37 bis 65°C und dauert zwischen 30-120 Sekunden. Später lagert sich die DNA-Polymerase an die angelagerten Primer an. Derzeit wird üblicherweise eine thermostabile DNA-Polymerase verwendet. Diese aus Bakterien heißer Quellen stammende DNA-Polymerase, wird im Gegensatz zu den meisten anderen Enzymen durch den Melting-Schritt nicht deaktiviert. Der Name Taq erhielt die Polymerase nach ihrem Ursprungsorganismus *Thermophilus aquaticus*.
3. *Elongation* (Verlängerung). Im Elongation-Schritt wird der fehlende zweite Strang erstellt. Dies erfolgt mithilfe von DNA-Polymerase, die an der einzelsträngigen DNA entlangläuft. Die Elongation erfolgt üblicherweise bei 65-80°C und dauert 30-120 Sekunden an.

Bei jedem Zyklus wird die DNA verdoppelt. Somit steigt die DNA-Menge exponentiell mit Basis 2 an. So werden theoretisch in 40 Zyklen von einem DNA-Strang $2^{40} = 1.099.511.627.776$ exakte Kopien von dem durch die Primer definierten DNA-Segment angefertigt. Aufgrund der möglichen Fehler während des Amplifikationsprozesses ist es ratsam, die Anzahl der Zyklen zu begrenzen. In der Regel wird die PCR mit maximal 40 Zyklen durchgeführt.

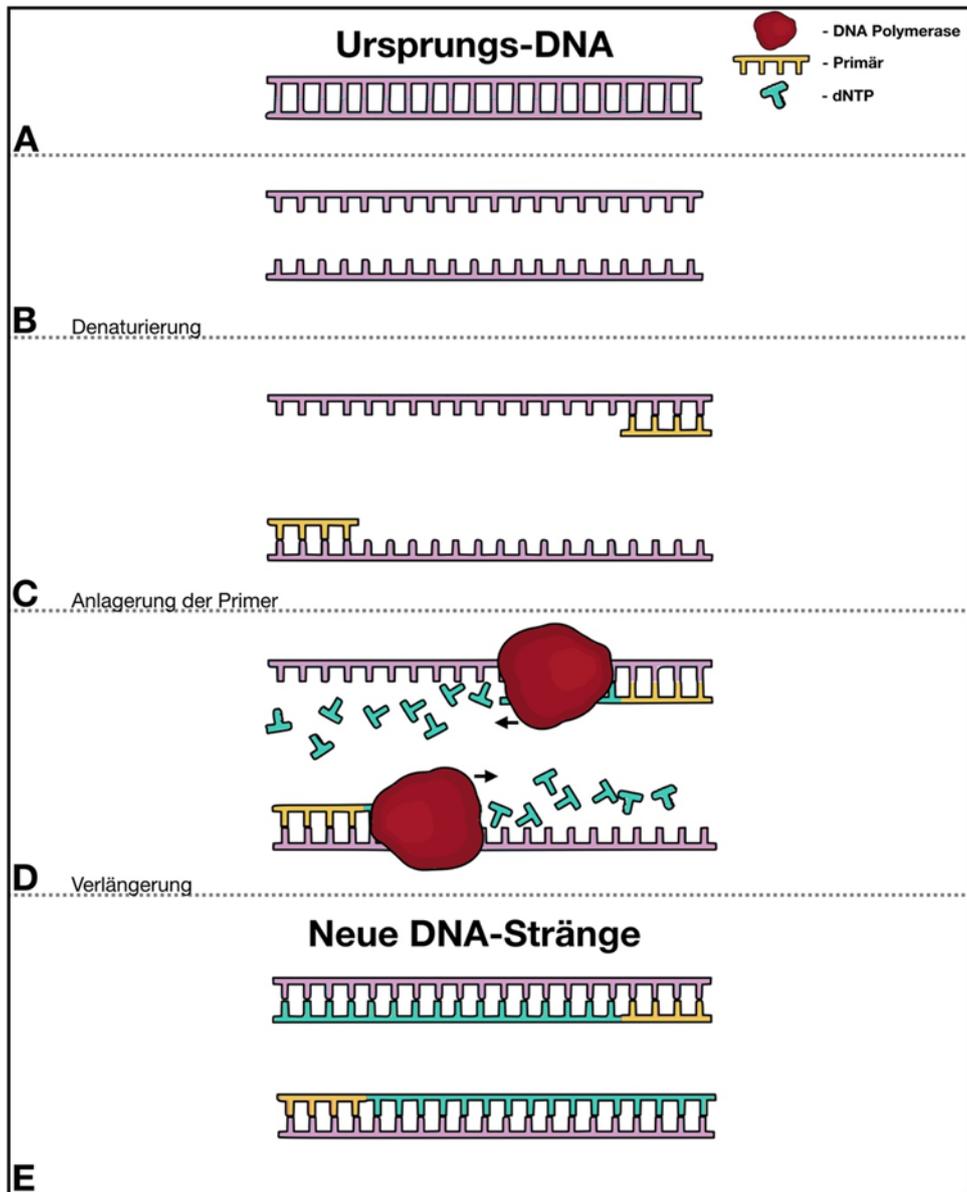


Abbildung 3: PCR (Prinzip der Methode)

3.6 Primersequenz-spezifische (SSP) PCR

Prinzip der Methode

Die Methode basiert auf dem Prinzip, dass die Primer mit einer kompletten Übereinstimmung eine deutlich höhere Amplifikationseffizienz der Zielsequenz haben als mismatchte Primer. Das Primerpanel ist so ausgesucht, dass nur ein Allel des entsprechenden Gens eine perfekte Übereinstimmung hat. Unter den streng kontrollierten PCR-Bedingungen kommt es zur Amplifikation der Targetsequenz nur bei dem Einsatz perfekt gemachter Primer. Dagegen zeigen die mismatchte Primerpaare keine Amplifikation der Zielsequenz (Targetsequenz).

Nach dem PCR-Prozess werden amplifizierte DNA-Fragmente durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Ethidiumbromidfärbung und UV-Licht sichtbar gemacht. Die Interpretation der PCR-Ergebnisse basiert auf dem Nachweis eines spezifischen DNA-Fragments. Als interne Qualitätskontrolle (Ausschluss eines Pipettierfehlers, Präsenz der PCR-Inhibitoren usw.) wurden in jeder PCR-Reaktion Kontrollprimer verwendet. Diese Primer amplifizieren eine konservierte Region des humanen Beta-Globin-Gens, das in jeder DNA-Probe vorhanden ist, und beweisen somit die Integrität der PCR-Reaktion.

Interpretation der Ergebnisse

Nach der erfolgreich durchgeführten PCR erwartet man 2 Banden. Bei dem Vorhandensein der spezifischen Bande (Zytokin-Allel) kann es dazu kommen, dass das Produkt interner Kontrollprimer sehr schwach oder ganz abwesend ist. Dies kann aufgrund der Unterschiede in der Konzentration und der Schmelztemperatur zwischen den spezifischen und Kontrollprimern auftreten. Das amplifizierte DNA-Fragment der spezifischen Zytokinprimer ist kleiner als die

interne Kontrolle und grösser als Primerdimere. Daher wird das spezifische DNA-Fragment auf dem Gel zwischen dem internen Kontrollprodukt und den Primerdimeren visualisiert.

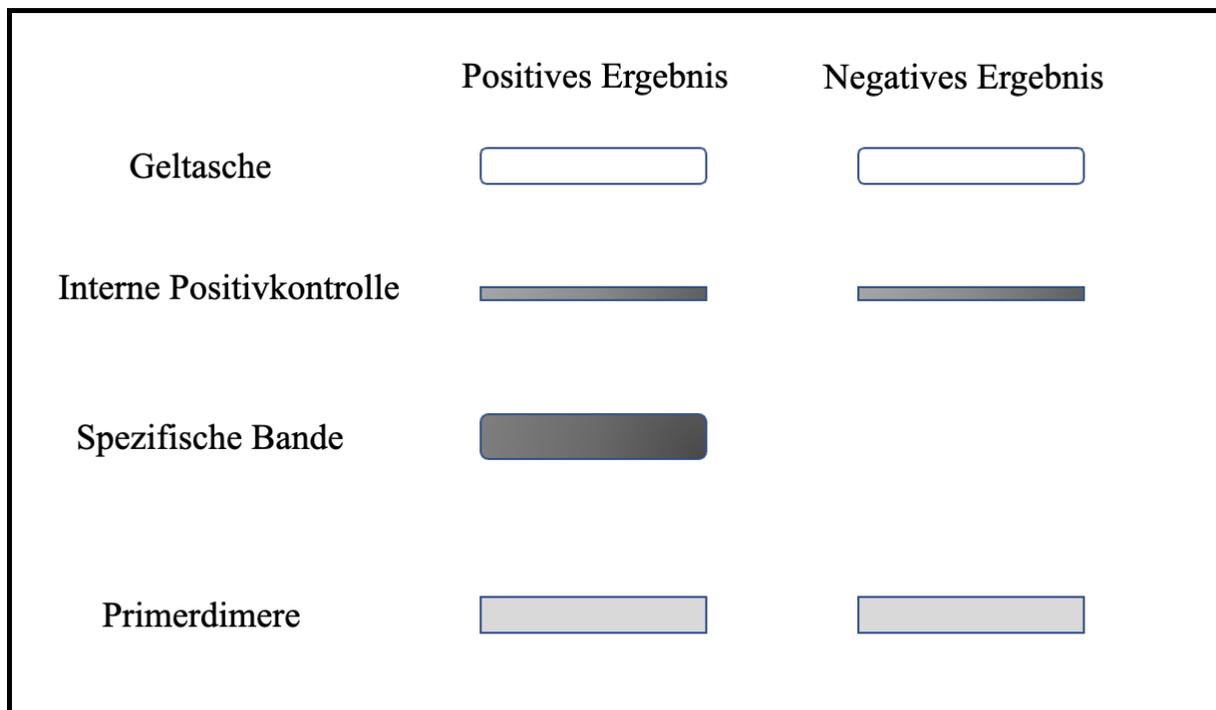


Abbildung 4: Auswertung der Ergebnisse nach einer SSP-Gelelektrophorese. Abgebildet ist eine schematische Darstellung der Datenauswertung. Die obere Bande stellt eine interne Positivkontrolle. Um falsch negative Ergebnisse auszuschließen ist die Integration einer Positivkontrolle in den Test essentiell. Die Positivkontrolle beinhaltet das sogenannte *House keeping gene*, das in jeder Zelle vorkommt. Aus diesem Grund soll jede Probe, die kein spezifisches Produkt aufweist, eine leuchtende Bande der internen Positivkontrolle im Gel aufweisen. Die Bande der Positivkontrolle hat eine größere Molekularmasse im Vergleich zur spezifischen Bande. Aus diesem Grund erscheint die spezifische Bande immer unterhalb der Bande der Positivkontrolle. Die untere Bande korrespondiert mit den Primerdimeren mit der niedrigsten Molekularmasse im Vergleich zu der Positivkontrolle und dem spezifischen Produkt. Die beiden Banden dienen zur Orientierung für die Lage der Typisierungsbande, die entsprechend ihrer Größe zwischen der Kontrollbande und Primerdimere-Bande liegt.

Durchführung der Methode

Die Analyse der TNF-alpha, TGF-beta, IFN-gamma, IL-10, and IL-6-Genpolymorphismen wurde mittels Primersequenz spezifische PCR (SSP-PCR) nach Anleitung des Herstellers (One Lambda, USA) durchgeführt. Zusammengefasst, 50-100 ng isolierter DNA in 1 µl Volumen wurde zu einem Master-Mix (Zusammensetzung des Master-Mixes: 7 µl D-Mix, 0.05 µl Taq Polymerase (5 units/µl) und 2 µl vom entsprechenden Primer) zugefügt. Die PCR wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt:

9 Zyklen:

96°C für 30 s

63°C für 60 s

20 Zyklen:

96°C für 10 s

59°C für 50 s

72°C für 30 s

Um eine Kontamination auszuschließen wurde bei jedem PCR-Lauf eine Negativkontrolle (Aqua dest) mitgeführt.

3.7 Gelelektrophorese

Prinzip der Methode

Die durch die PCR amplifizierten DNA-Abschnitte werden mit Ladepuffer versetzt um die Sedimentation der PCR-Produkte in den Geltaschen zu gewährleisten. Die selbst negativ geladene DNA wird im Bereich der Kathode aufgetragen und wandert aufgrund ihrer Ladung im elektrischen Feld zu positivem Pool. Da das Agarose-Gel aus vernetzten Molekülen besteht, wandern kleine Nukleinsäuremoleküle im Gel weiter als größere. Die Position auf dem Gel kann

also Aussage über das Molekulargewicht des spezifischen Amplifikationsproduktes (sog. Amplikons) geben. Das Ethidiumbromid, das im Agarose-Gel vorhanden ist, interkaliert in die DNA und gibt unter der UV-Licht-Anregung ein Fluoreszenzsignal, das man als so genannte Banden visualisieren kann.

Durchführung der Methode

Das Amplifikat wurde mittels Elektrophorese analysiert. Dazu wurde ein 2%-iges Agarosegel hergestellt. Die Agarose wurde in 150 ml TAE-Puffer aufgeköcht, mit 6 µl Ethidiumbromid versetzt und zu horizontalen, etwa 5-8 mm starken Gelen mit ca. 48 Probenfächerchen pro Gel gegossen. Zur Auftrennung wurde das PCR-Produkt in die Fächerchen des Gels aufgetragen. Als Größenstandard wurde 1 kbp-Marker pipettiert. Die Elektrophorese fand bei 140 V über 30 min in TAE als Laufpuffer statt. Die PCR-Produkte im Gel wurden mittels des Videodokumentationssystems Bioprint DS und dessen Software BioCapt 97 visualisiert und dokumentiert. Die durch den Assay gewonnenen Genotypergebnisse wurden jeweils dem dazu publizierten Phänotyp zugeordnet.

3.8 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden durchgeführt unter Verwendung von SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Version 9.0). Aus den gewonnenen Ergebnissen wurden Genotypfrequenzen sowie Hardy-Weinberg-Equilibrium ermittelt. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurde mittels der Gleichung ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$) für den Genotyp errechnet, wobei p die Häufigkeit des Auftretens des Allels A und q die Allelhäufigkeit des Allels B für einen Genotyp darstellt, der durch ein Allelepaar (A und B) kontrolliert wird. Nach der Erstellung der 2 x 2 Kontingenztafel wurde Chi-Quadrat-Test mit Korrektur nach Yates sowie Fisher's exact test zur Ermittlung der signifikanten Unterschiede zwischen Parodontitis- und Kontrollgruppe durchgeführt. P-Werte <

0,05 wurden als signifikant betrachtet. Für Variablen mit signifikanten Unterschieden ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen wurden Odds Ratio und relatives Risiko mit 95% Konfidenzintervallen errechnet.

3.9 Materialien und Reagenzien

Liste der Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München
dNTPs Dulbecco's	Sigma-Aldrich, Steinheim
AmpliTaq DNA-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Qiagen DNA Isolation Kit „Mini“	Qiagen, Hilden
Proteinase K	Qiagen, Hilden
Dest wasser	Braun, Bad Melsungen
Cytokine genotyping kit	One Lambda, Canoga Park, USA

Elektrophorese

Laufpuffer TBE (10 X):

890 mM Tris

890 mM Borsäure

0 mM EDTA pH 8

Ladepuffer (6 X):

2 mM EDTA

20 % Ficoll 400

0,25 % Orange G

3.10 Geräte und Hilfsmittel

Gerät	Hersteller
Mikrozentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Mischgerät	Eppendorf, Hamburg
diverse Kolbenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg
Thermoheizblock	Eppendorf, Hamburg
Kühlgefrierkombination	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Autoklav	Gössner, Hamburg Centrifuge
Elektrophoresekammer und Zubehör	Eppendorf, Hamburg
Gefrierschränke	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Gel Imager & E.A.S.Y.Enhanced Analyses System	Herolab, Wiesloh
Mikrowellengerät	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
pH-Meter	Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubator Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Schüttler, Vortex MS2 Minishaker	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler 9600	Perkin Elmer, Waltham, USA
Thermocycler 9700	Perkin Elmer, Waltham, USA
Vakuum-Zentrifuge	Renner GmbH, Dannstadt
Concentrator 5301	Renner GmbH, Dannstadt
Waage	Herolab, Wiesloch
Wasserbad	Heraeus, Osterode
Ultraspec 2100 pro	Biochrom Ltd.
Mikro-Quarzküvette (80-2103-69)	Biochrom Ltd
Eppendorfgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf, Hamburg

Falcon Tubes 15 mL	Falcon, Oxnard, USA
Falcon Conical Tubes 50	Falcon, Oxnard, USA
Sterile Filtertips mit “sealing filter”	Roth, Karlsruhe
Pipetten 10, 100, 1000 μ l	Eppendorf, Hamburg
Pasteurpipetten	Sartorius, Göttingen

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Kohorten

Als Probanden standen 122 Patienten mit chronischer Parodontitis (sog. Fall-Gruppe), die aufgrund ihrer Erkrankung in der zahnärztlichen Praxis behandelt wurden, zur Verfügung. Schwangere Frauen und Patienten mit medikamentenpflichtigen Erkrankungen (wie Diabetes mellitus, Autoimmun- oder andere systemische Erkrankungen) wurden aus der Studie ausgeschlossen. Die Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin bewilligt, ein positives Votum wurde erteilt (EA2/063/05). Alle Studienteilnehmer wurden über die Studie ausführlich aufgeklärt und erteilten ihre Einverständniserklärung vor dem Einschluss in die Studie.

Innerhalb dieser Gruppe lag das Alter zwischen 24 und 69 Jahren und das mediane Alter betrug 43,3 Jahre. 41% waren Raucher. Das Verhältnis von Männern zu Frauen betrug 57% / 43%. Alle Patienten waren Kaukasier und hatten die Diagnose einer generalisierten chronischen Parodontitis. Die Kontrollgruppe bestand aus 114 nicht verwandten, ethnisch übereinstimmenden kaukasischen Personen. Die Probanden zeigten keine Anzeichen einer Parodontitis, wie durch das Fehlen eines klinischen Attachmentverlusts, keine Stellen mit einer Sondierungstiefe über 3 mm und keine Beobachtung von Blutungen beim Sondieren definiert wurde. Da die erste Manifestation einer chronischen Parodontitis bis zum Alter von 40 Jahren auftreten kann, wurde die Kontrollgruppe aus Patienten ohne Anzeichen einer Parodontitis und einem Alter über 40 Jahren ausgewählt. Die Kontrollgruppe wurde auf das Verhältnis von Männern zu Frauen und den Raucherstatus auf die Fall-Gruppe abgestimmt. So lag das Alter in der Kontrollgruppe zwischen 41 und 56 Jahre und das mediane Alter betrug 47,2 Jahre. Das Verhältnis von Männern zu Frauen betrug 54% / 46%. Der Anteil der aktiven Raucher in der Kontrollgruppe lag zum Zeitpunkt der Untersuchung bei 38 %. Der statistische Vergleich der demografischen Patientendaten ergab, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bestand (Tabelle 1).

	Patienten mit Parodontitis (n=122)	Kontrollgruppe (n=114)	Unterschiede
Alter: Range in Jahren (Median)	24 – 69 (43,3)	41 – 56 (47,2)	n.s.
Anteil Männer/Frauen in %	57/43	54/46	n.s.
Anteil der Raucher in %	41	38	n.s.

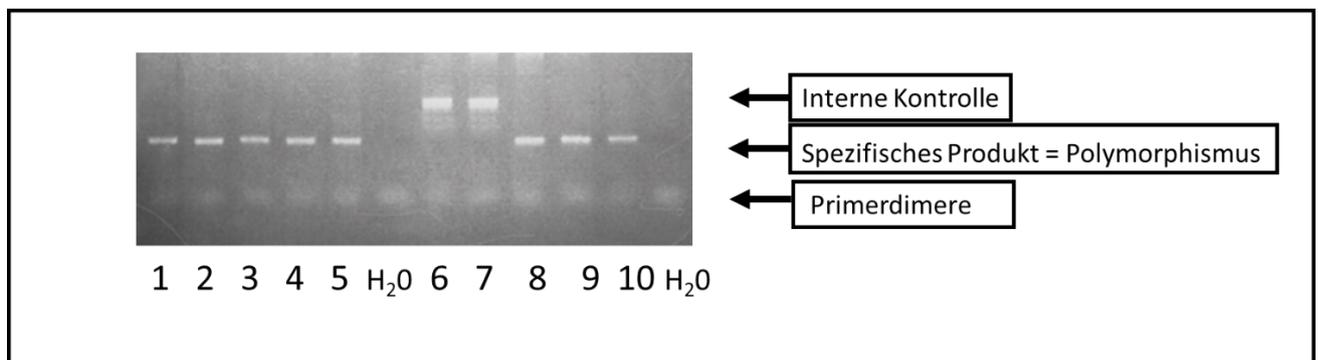
Tabelle 1: Demografische Charakterisierung der Studienpatienten

n.s. – nicht signifikant

4.2. Assoziation zwischen -174IL-6-CC-Poymorphismus und der chronischen Parodontitis

Die Identifizierung genetischer Risikofaktoren erfolgt in einer Fall-Kontroll-Studie unter der Annahme, dass genetische Veränderungen von einer Generation zu der Nächsten unverändert bleiben. Diese in einer Population konstant bleibenden genetischen Variationen sind unter dem Begriff Hardy-Weinberg-Gleichgewicht oder Hardy-Weinberg-Gleichung (englisch: Hardy-Weinberg-Equilibrium) bekannt. Eine Abweichung von Hardy-Weinberg-Equilibrium kann auf systematische Fehler bei Genotypisierung, unerwartete Populationsstruktur oder Vorhandensein homologer Regionen im Genom hinweisen. Aus diesem Grund wurde in unseren Untersuchungen zunächst immer geprüft, ob die Allel- bzw. Genotypverteilungen den Kriterien des Hardy-Weinberg-Equilibriums erfüllen.

Die Genotypverteilungen für -174IL-6-CC-Polymorphismus entsprachen dem Hardy-Weinberg-Equilibrium. Der Gruppenvergleich in Bezug auf -174IL-6-Einzelnukleotidpolymorphismen zeigte einen signifikanten Unterschied in der Verteilung vom -174IL-6-Polymorphismus zwischen den Patienten mit chronischer Parodontitis und der gesunden Kontrollgruppe. Der Genotyp -174IL-6CC, was phenotypisch einer niedrigeren Produktion des IL-6 entspricht, wurde bei 41,9 % der Patienten mit Parodontitis gefunden. Dagegen konnte dieser Genotyp nur bei 27,6 % der Kontrollgruppe detektiert werden ($P=0.0283$) (Tabelle 1). Das Odds Ratio betrug 1.896 bei einem 95%-igen Konfidenzintervall von 1.106-3.250. Das relative Risiko war 1.520 bei einem 95%-igen Konfidenzintervall von 1.068-2.183.



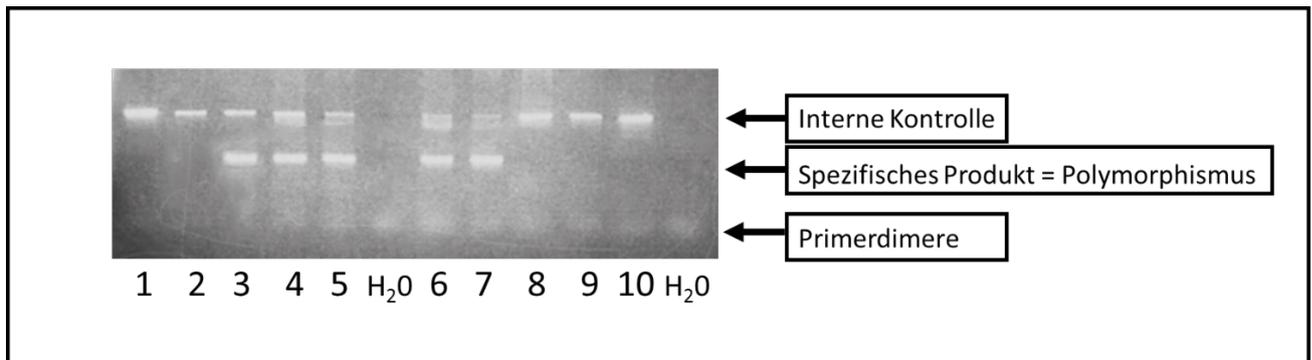


Abbildung 6: Analyse von SNP im -174IL-6-Gen (Exemplarisches Bild)

Die Abbildung zeigt exemplarisch Ergebnisse eines SSP-PCR-Laufs auf einem Agarosegel unter UV-Beleuchtung. Das obere Bild demonstriert Ergebnisse einer PCR unter Anwendung der -174IL-6-Polymorphismus C-Primer. Das untere Bild zeigt PCR-Ergebnisse bei der Anwendung -174IL-6-Polymorphismus G-spezifischen Primer. Von jeder Probe wurde das entsprechende Amplifikat (PCR-Produkt) in die Geltasche aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde Wasser (H₂O) verwendet. 10 verschiedene Patientenproben sind jeweils aufgetragen. Der Nachweis eines spezifischen -174IL-6 Genproduktes erfolgt durch die mittlere Bande. Der fehlende Nachweis der mittleren Bande bei einer sichtbaren oberen Bande (interne Kontrolle) zeigt, dass der entsprechende Polymorphismus nicht vorhanden ist. Der Nachweis der spezifischen Bande im oberen Bild entspricht dem Vorhandensein eines C-Allels und im unteren Bild – dem Vorhandensein eines G-Allels. Beim gleichzeitigen Nachweis beider Banden ist der Patient heterozygot (GC), bei jeweils nur einem Nachweis (G oder C) – homozygot.

Genotyp	Phänotyp	Parodontitis	Kontrolle	P-Wert	Odds-Ratio	RR
-174IL-6		N=124	N=116	0,0283	1,896	1,52
CC	Niedrig	46	40			
GG+GC	Hoch	72	74			

Tabelle 2: Verteilung der -174IL-6-Einzelnukleotidpolymorphismen in der Parodontitisgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe

4.3 Negative Assoziation zwischen dem TGF-beta1-Codon 25-GG-Polymorphismus und der chronischen Parodontitis

Die Verteilung der Genotypen in der Population erfüllten Hardy-Weinberg-Kriterien. Der TGF-beta1 (codon 25) GG Genotyp, das mit einer erhöhten Zytokinproduktion assoziiert ist, wurde signifiant häufiger in der Kontrollpopulation als bei den Patienten mit Parodontitis festgestellt (P=0.0421). Von 118 eindeutig identifizierten TGF-beta1 Codon 25-Genpolymorphismen bei Patienten mit Parodontitis konnte man bei 90 Patienten das Genotyp GG und bei 28 Patienten Genotypen CG und CC feststellen. Dagegen wurde von 112 identifizierten TGF-beta1 Codon 25-Genpolymorphismen der Kontrollgruppe 98 mit dem Genotyp GG und nur 14 mit dem Genotyp CG/CC festgestellt. Dies entsprach einem Odds Ratio (OR) von 0.459 bei einem 95%-igen Konfidenzintervall von 0.230-0.920. Das relative Risiko für die gleiche Fragestellung betrug 0.872 bei einem 95%-igen Konfidenzintervall von 0.785-0.985.

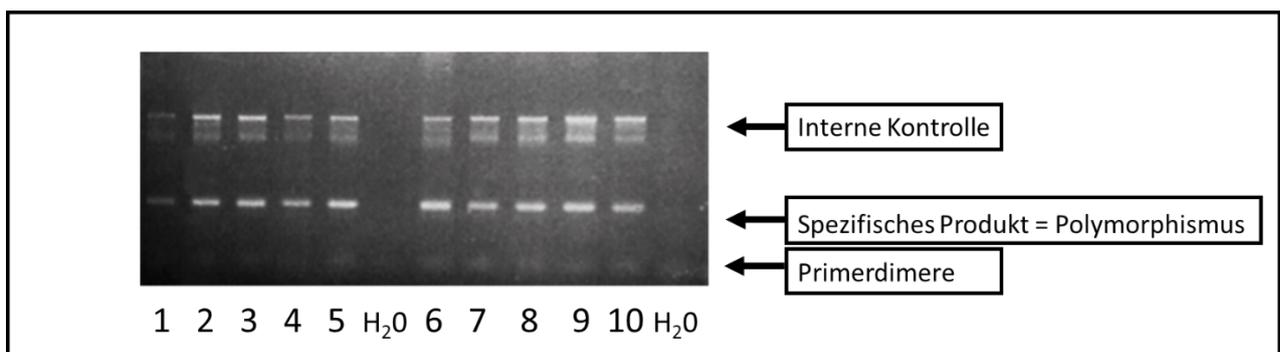
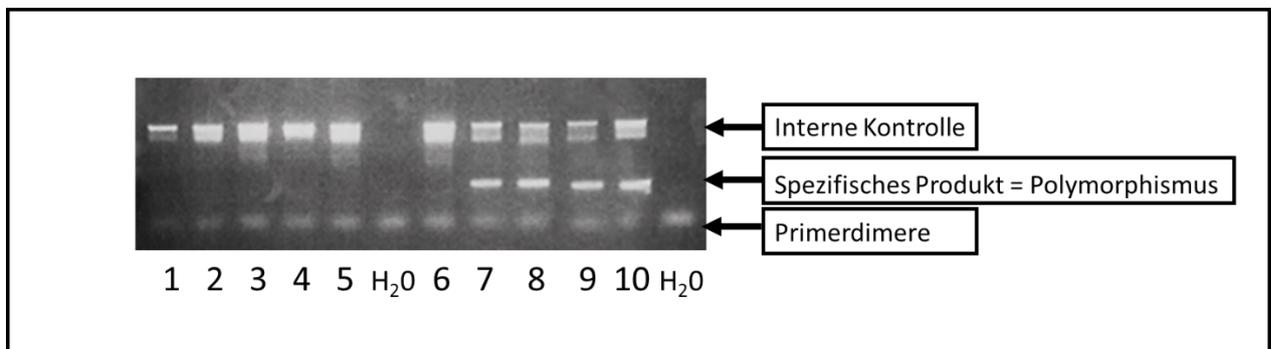


Abbildung 6: Analyse von SNP im TGF-beta1 Codon 25 (Exemplarisches Bild)

Die Abbildung zeigt exemplarisch Ergebnisse eines SSP-PCR-Laufs auf einem Agarosegel unter UV-Belichtung. Von jeder Probe wurde das entsprechende Amplifikat (PCR-Produkt) in die Geltasche aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde Wasser (H₂O) verwendet. 10 verschiedene Patientenproben sind aufgetragen. Der Nachweis eines spezifischen TGF-beta Genproduktes (C-Allel) erfolgt durch die mittlere Bande. Der fehlende Nachweis der mittleren Bande bei einer sichtbaren oberen Bande (interne Kontrolle) zeigt, dass der entsprechende Polymorphismus (C-Allel) nicht vorhanden ist. Ein ähnliches Prinzip gilt auch für das untere Bild. Der Nachweis der spezifischen Bande entspricht dem Vorhandensein eines G-Allels. Bei einem Nachweis im oberen und unteren Bild ist der Patient heterozygot GC, bei jeweils nur einem Nachweis – homozygot (C oder G).

Genotyp	Phänotyp	Parodontitis	Kontrolle	P-Wert	Odds-Ratio	RR
TGF-b1 C25		N=118	N=112	0,0421	0,459	0,872
GG	Hoch	90	98			
GC+CC	Niedrig	28	14			

Tabelle 3: Verteilung der TGF-beta1 Codon 25-Einzelnukleotidpolymorphismen in der Parodontitisgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe

4.4 -1082IL-10-Einzelnukleotidpolymorphismus in Patienten mit chronischer Parodontitis und in der Kontrollgruppe

Ähnlich wie bei den TGF-beta1-Codon 25 und IL-6-Genpolymorphismen wurden für -1082IL-10, -308TNF-alpha-, TGF-beta1 (codon 10)- und +874IFN-gamma-Polymorphismen Chi-Quadrat-Test mit der Korrektur nach Yates sowie Odds Ratio und relatives Risiko mit dem 95%-igen Konfidenzintervall berechnet.

Von 118 eindeutig identifizierten -1082IL-10-Genpolymorphismen bei Patienten mit Parodontitis konnte man bei 36 Patienten den Genotyp AA und bei 82 Patienten Genotypen AG und GG feststellen. Ähnlich wurde in der Kontrollgruppe 30 von 112 Patienten mit dem Genotyp AA und 84 von 112 Patienten mit dem Genotyp AG/GG identifiziert. Die statistische Auswertung erbrachte keine signifikanten Unterschiede in der -1082IL-10-Genotypverteilung zwischen den Gruppen. (Tabelle 4).

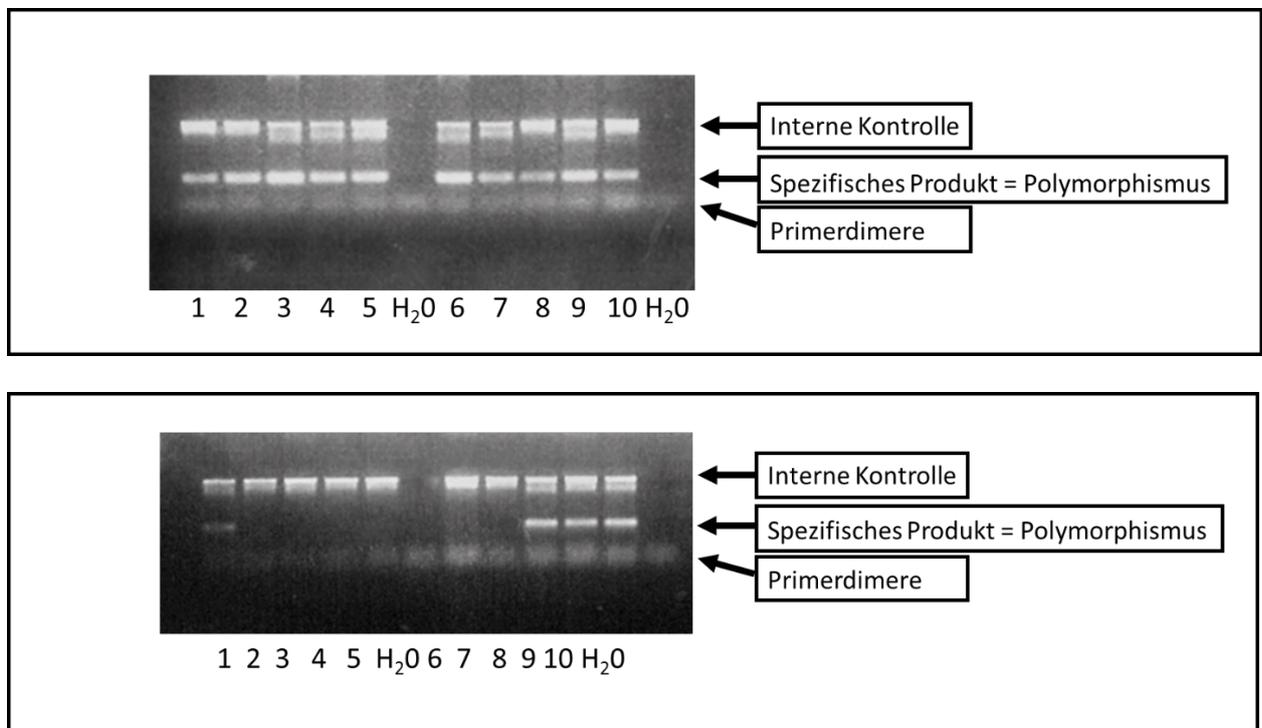


Abbildung 7: Analyse von SNP im -1082 Interleukin-10 (exemplarisches Bild)

Die Abbildung zeigt exemplarisch Ergebnisse eines SSP-PCR-Laufs auf einem Agarosegel unter UV-Beleuchtung. Das obere Bild demonstriert Ergebnisse einer PCR unter Anwendung -1082IL-10-Polymorphismus A-Primer. Das untere Bild zeigt PCR-Ergebnisse bei der Anwendung -1082-IL-10-Polymorphismus G-spezifischer Primer. Von jeder Probe wurde das entsprechende Amplifikat (PCR-Produkt) in die Geltasche aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde Wasser (H₂O) verwendet. 10 verschiedene Patientenproben sind jeweils aufgetragen. Der Nachweis eines spezifischen -1082IL-10-Genproduktes erfolgt durch die mittlere Bande. Der fehlende Nachweis der mittleren Bande bei einer sichtbaren oberen Bande (interne Kontrolle) zeigt, dass der entsprechende Polymorphismus nicht vorhanden ist. Der Nachweis der spezifischen Bande im oberen Bild entspricht dem Vorhandensein eines A-Allels und im unteren Bild – dem Vorhandensein eines G-Allels. Beim gleichzeitigen Nachweis beider Banden ist der Patient heterozygot (AG), bei jeweils nur einem Nachweis (A oder G) – homozygot.

Genotyp	Phänotyp	Parodontitis	Kontrolle	P-Wert
-1082IL-10		N=118	N=114	NS
AA	Niedrig	36	30	
GG+AG	Hoch	82	84	

Tabelle 4: Vergleich der -1082IL-10-Einzelnukeotidpolymorphismen in der Parodontitisgruppe mit der Kontrollgruppe

4.5 Verteilung von -308TNF-alpha-SNP in Patienten mit chronischer Parodontitis und in der Kontrollgruppe

Die Analyse des -308TNF-alpha-Genpolymorphismus zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. 6 von 122 analysierten Genotypen der Parodontitis-Gruppe waren homozygot für das Allel A, und 116 von 122 Parodontitis-Patienten waren homo-oder heterozygot für das Allel G. Die Kontrollgruppe zeigte ähnliche Verteilung mit 8 von 110 Patienten mit dem Genotyp AA und 102 von 110 Patienten mit den Genotypen AG/GG.

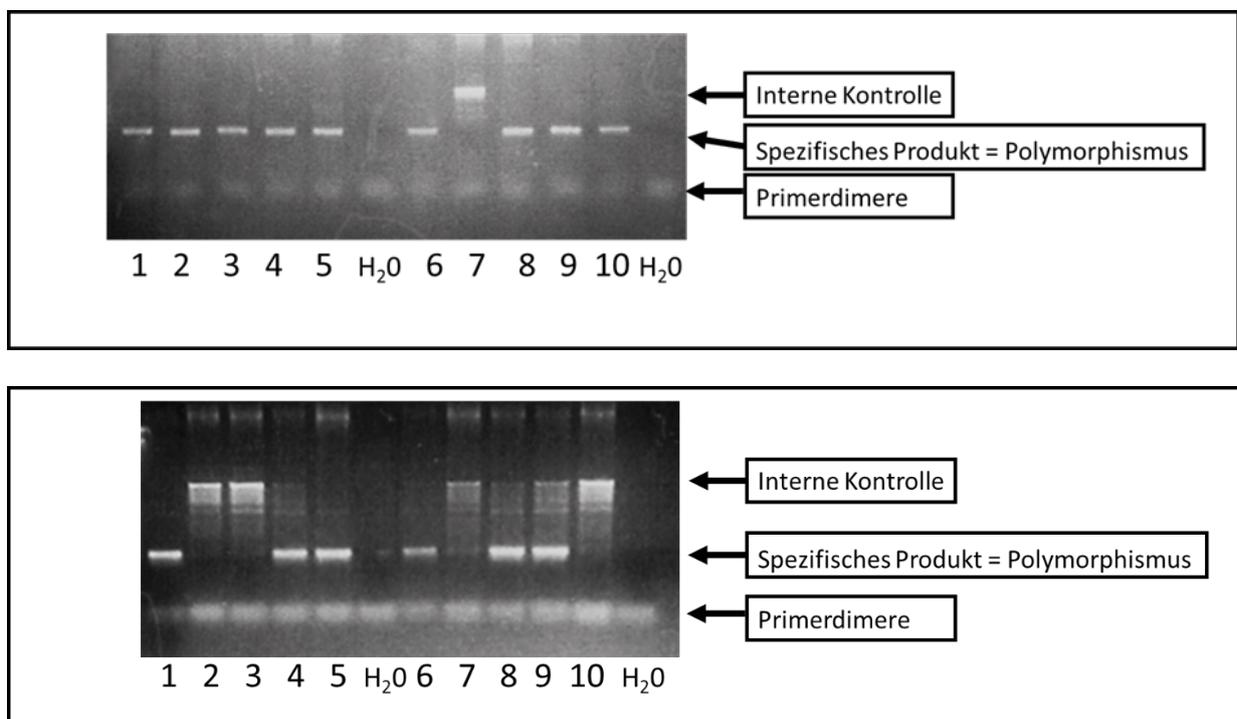


Abbildung 8: Analyse von SNP im -308 TNF-alpha (Exemplarisches Bild)

Die Abbildung zeigt exemplarisch Ergebnisse eines SSP-PCR-Laufs auf einem Agarosegel unter UV-Beleuchtung. Das obere Bild demonstriert Ergebnisse einer PCR unter Anwendung der -308TNF-alpha-Polymorphismus A-Primer. Das untere Bild zeigt PCR-Ergebnisse bei der Anwendung -308TNF-alpha-Polymorphismus G-spezifischen Primer. Von jeder Probe wurde das entsprechende Amplifikat (PCR-Produkt) in die Geltasche aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde Wasser (H₂O) verwendet. 10 verschiedene Patientenproben sind jeweils aufgetragen. Der

Nachweis eines spezifischen -1082TNF-alpha-Genproduktes erfolgt durch die mittlere Bande. Der fehlende Nachweis der mittleren Bande bei einer sichtbaren oberen Bande (interne Kontrolle) zeigt, dass der entsprechende Polymorphismus nicht vorhanden ist. Der Nachweis der spezifischen Bande im oberen Bild entspricht dem Vorhandensein eines A-Allels und im unteren Bild – dem Vorhandensein eines G-Allels. Beim gleichzeitigen Nachweis beider Banden ist der Patient heterozygot (AG), bei jeweils nur einem Nachweis (A oder G) – homozygot.

Genotyp	Phänotyp	Parodontitis	Kontrolle	P-Wert
-308TNF-a		N=122	N=110	NS
AA	Hoch	6	8	
GG+AG	Niedrig	116	102	

Tabelle 5: Vergleich der -308TNF-alpha-Einzelnukeotidpolymorphismen in der Parodontitisgruppe mit der Kontrollgruppe

4.6 Verteilung von +874IFN-gamma-Genpolymorphismus in Patienten mit chronischer Parodontitis und in der Kontrollgruppe

Keine Unterschiede gab es auch für den +874IFN-gamma-Genpolymorphismus. In der Parodontitis-Gruppe zeigten 46 von 118 Patienten den Genotyp AA und 72 Patienten wurden mit dem Genotyp TT/AT identifiziert. Die Kontrollgruppe zeigte ebenfalls 40 von 114 Probanden mit dem Genotyp AA und 74 Patienten mit dem Genotyp TT/AT.

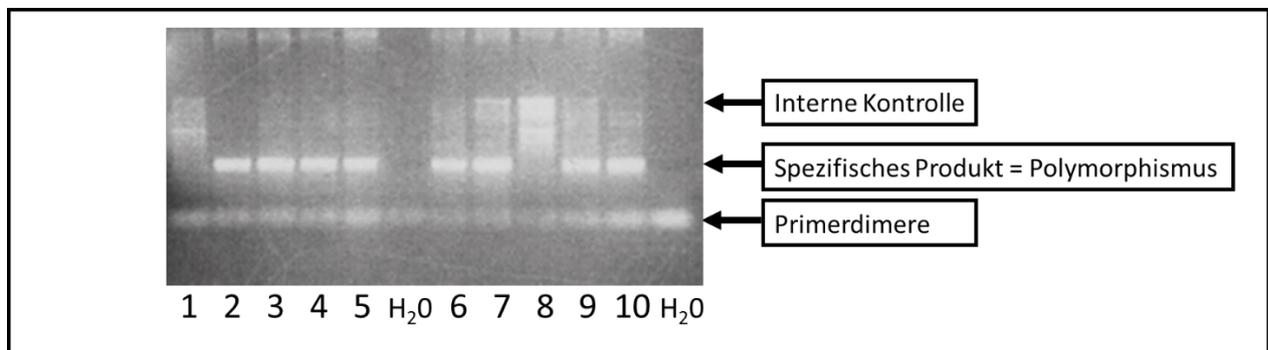
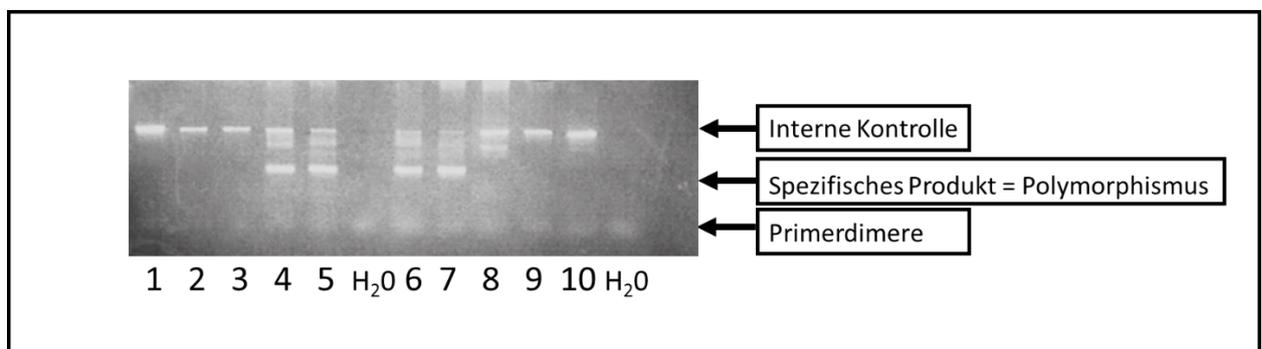


Abbildung 9: Analyse von SNP im +874 Interferon-gamma (Exemplarisches Bild)

Die Abbildung zeigt exemplarisch Ergebnisse eines SSP-PCR-Laufs auf einem Agarosegel unter UV-Beleuchtung. Das obere Bild demonstriert Ergebnisse einer PCR unter Anwendung der +874 Interferon-gamma-Polymorphismus A-Primer. Das untere Bild zeigt PCR-Ergebnisse bei der Anwendung T-spezifischen Primer. Von jeder Probe wurde das entsprechende Amplifikat (PCR-Produkt) in die Geltasche aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde Wasser (H₂O) verwendet. 10

verschiedene Patientenproben sind jeweils aufgetragen. Der Nachweis eines spezifischen Genproduktes erfolgt durch die mittlere Bande. Der fehlende Nachweis der mittleren Bande bei einer sichtbaren oberen Bande (interne Kontrolle) zeigt, dass der entsprechende Polymorphismus nicht vorhanden ist. Der Nachweis der spezifischen Bande im oberen Bild entspricht dem Vorhandensein eines A-Allels und im unteren Bild – dem Vorhandensein eines T-Allels. Beim gleichzeitigen Nachweis beider Banden ist der Patient heterozygot (AT), bei jeweils nur einem Nachweis (A oder T) – homozygot. Die Qualität der Probe 8 im unteren Bild ist schlecht (weder die interne Kontrolle noch die spezifische Bande konnte dargestellt werden). Diese Proben zeigen exemplarisch, welche Ergebnisse aufgrund der unzureichenden Qualität abgelehnt und wiederholt wurde.

Genotyp	Phänotyp	Parodontitis	Kontrolle	P-Wert
+874IFN-g		N=118	N=114	NS
AA	Niedrig	46	40	
TT+AT	Hoch	72	74	

Tabelle 6: Vergleich der +874IFN-gamma-Einzelnukleotidpolymorphismen in der Parodontitisgruppe mit der Kontrollgruppe

4.7 Verteilung von TGF-beta1 (codon 10)-Polymorphismus in Patienten mit chronischer Parodontitis und in der Kontrollgruppe

Für den TGF-beta1 (codon 10)-Polymorphismus gab es genauso wie auch für die 3 vorherbeschriebenen Zytokinpolymorphismen keine Assoziationen. 20 von 116 identifizierten Genotypen in der Parodontitis-Gruppe entsprachen dem CC-Genotyp und 96 Patienten zeigten den Genotyp TT/TC. In der Kontrollgruppe lag die Frequenz des CC-Genotyps bei 15 % (18 von 116 Probanden) und der Genotyp TT/TC wurde bei 98 von 116 Probanden festgestellt.

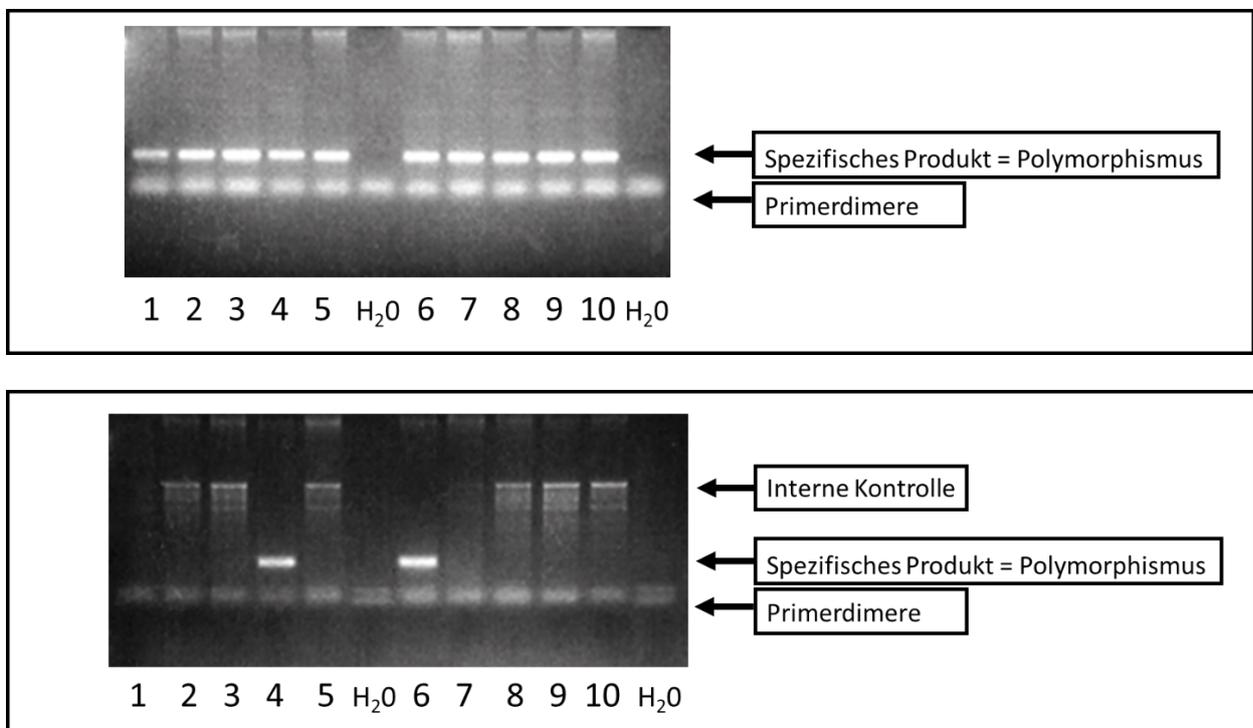


Abbildung 10: Analyse von SNP im TGF-beta1 Codon 10 (Exemplarisches Bild)

Die Abbildung zeigt exemplarisch Ergebnisse eines SSP-PCR-Laufs auf einem Agarosegel unter UV-Beleuchtung. Das obere Bild demonstriert Ergebnisse einer PCR unter Anwendung der TGF-beta1 Codon 10 C-Primer. Das untere Bild zeigt PCR-Ergebnisse bei der Anwendung der T-spezifischen Primer. Von jeder Probe wurde das entsprechende Amplifikat (PCR-Produkt) in die Geltasche aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde Wasser (H₂O) verwendet. 10 verschiedene

Patientenproben sind jeweils aufgetragen. Der Nachweis eines spezifischen Genproduktes erfolgt durch die mittlere Bande. Der fehlende Nachweis der mittleren Bande bei einer sichtbaren oberen Bande (interne Kontrolle) zeigt, dass der entsprechende Polymorphismus nicht vorhanden ist. Der Nachweis der spezifischen Bande im oberen Bild entspricht dem Vorhandensein eines C-Allels und im unteren Bild – dem Vorhandensein eines T-Allels. Beim gleichzeitigen Nachweis beider Banden ist der Patient heterozygot (CT), bei jeweils nur einem Nachweis (C oder T) – homozygot.

Genotyp	Phänotyp	Parodontitis	Kontrolle	P-Wert
TGF- β 1 C10		N=116	N=116	NS
CC	Niedrig	20	18	
TT+TC	Hoch	96	98	

Tabelle 7: Vergleich der TGF-beta Codon 10-Einzelnukleotidpolymorphismen in der Parodontitisgruppe mit der Kontrollgruppe

4.8 IL-6 und TGF-beta1-Genpolymorphismen als voneinander unabhängige Risikofaktoren

Um zu prüfen, ob IL-6 und TGF-beta1 (codon 25) SNPs 2 voneinander unabhängige Risikofaktoren für die Entstehung der chronischen Parodontitis darstellen, wurde multivariate Analyse (MANOVA) durchgeführt. -174IL-6 sowie TGF-beta1 (codon 25) SNPs zusammen mit dem Patientenalter, Geschlecht und Raucherstatus wurden der o.g. Analyse unterzogen. Die Multivarianzanalyse bestätigte die Rolle der -174IL-6 und TGF-beta1 (codon 25)-Genpolymorphismen als unabhängige Risikofaktoren für die Entwicklung der chronischen Parodontitis. Keine weiteren Risikofaktoren konnten identifiziert werden.

Genotyp	Phenotyp	Parodontitis N /Frequenz	Kontrolle N /Frequenz	P-Wert
-1082IL-10		N=118	N=114	NS
AA	Niedrig	36 / 0.305	30 / 0.263	
GG+AG	Hoch	82 / 0.695	84 / 0.737	
-308TNF- α		N=122	N=110	NS
AA	Hoch	6 / 0.049	8 / 0.073	
GG+AG	Niedrig	116 / 0.951	102 / 0.927	
+874IFN- γ		N=118	N=114	NS
AA	Niedrig	46 / 0.390	40 / 0.351	
TT+AT	Hoch	72 / 0.610	74 / 0.649	
-174IL-6		N=124	N=116	0.0283*
CC	Niedrig	52 / 0.419	32 / 0.276	
GG+GC	Hoch	72 / 0.581	84 / 0.724	
TGF- β 1 C10		N=116	N=116	NS
CC	Niedrig	20 / 0.172	18 / 0.155	
TT+TC	Hoch	96 / 0.828	98 / 0.845	
TGF- β 1 C25		N=118	N=112	0.0421**
GG	Hoch	90 / 0.763	98 / 0.875	
GC+CC	Niedrig	28 / 0.237	14 / 0.125	

Tabelle 8: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse zum Vergleich der Genotypverteilungen von -1082IL-10, -308TNF-alpha, TGF-beta1 (codon 10, 25), -174IL-6 und +874IFN-gamma Einzelnukleotidpolymorphismen zwischen den Patienten mit chronischer Parodontitis und der Kontrollgruppe

NS – nicht signifikant; * Odds Ratio und Konfidenzintervall lagen bei 1,896 bzw. 1,106-3,2; Relatives Risiko betrug 1,520 bei einem Konfidenzintervall von 1,068-2,183.

** Odds Ratio lag bei 0,459 mit einem Konfidenzintervall von 0,230-0,920; Relatives Risiko betrug 0,872 mit einem Konfidenzintervall von 0,785-0,985.

5. Diskussion

Unsere Studie basiert auf dem Erkenntnis, dass bestimmte entzündungsfördernde und entzündungshemmende Zytokine bei chronischen parodontalen Erkrankungen eine wichtige pathogenetische Rolle spielen und einzelne genetische Veränderungen im Genom bestimmter Zytokine zur Veränderung der Zytokinexpression führen können. Ausgehend aus diesen Daten haben wir Untersuchungen von 6 Einzelnukleotidpolymorphismen im Genom von 5 Zytokinen in einer Kohorte deutscher Patienten mit chronischer Parodontitis im Vergleich zu Alters- und Geschlecht- und Lebensstil-gematchten gesunden Probanden analysiert. Die Analysen von IL-10 SNP an der Position -1082, TNF-alpha an der Position -308, TGF-beta1 im Codon 10 und 25, IL-6 an der Position -174 und IFN-gamma an der Position +874 haben ein bestimmtes Muster demonstriert. Dabei zeigten IL-6 und TGF-beta1 Codon 25 Genotypverteilungen, die mit erhöhter Anfälligkeit für die Entstehung der chronischen Parodontitis assoziiert waren.

Assoziation von TGF-beta1 mit der chronischen Parodontitis

Zwei SNPs in der DNA-Sequenz, die die Leadersequenz des TGF beta1 kodiert, befinden sich an Position +869 (Codon 10, T C, Leucinprolin) und Position +915 (Codon 25, G C, Argininprolin). In der vorliegenden Studie wurde erstmalig eine negative Assoziation des Genotyps TGF-beta1 (Codon 25) GG (Arg25 / Arg25) mit chronischer Parodontitis festgestellt. TGF-beta1 ist ein pleiotropes Zytokin, das seit einiger Zeit bei Parodontalerkrankungen aufgrund seiner Auswirkungen auf den Knochen- und Bindegewebsstoffwechsel große Aufmerksamkeit auf sich zieht (Soory et al., 1999). Für TGF beta1 wurde gezeigt, dass das Produktionsniveau unter genetischer Kontrolle von SNPs in beiden Promotoren und im ersten Exon des TGF-beta1-Gens steht (Cambien et al., 1996). Das TGF-beta1-Allel (Codon 25) G (Arg25) wurde mit einer hohen TGF-beta1-Produktion korreliert (Awad et al., 1998). Unsere Ergebnisse zeigen, dass das Fehlen einer genetischen Prädisposition für eine hohe TGF-beta1-Produktion bei Patienten mit

chronischer Parodontitis vorkommt. Somit legen unsere Daten nahe, dass die gefundene negative Polymorphismusassoziation einen negativen Effekt für Parodontisentstehung darstellt. Angesichts des Potenzials von TGF-beta1, die Wundheilungsrate zu erhöhen (Lee et al., 2004), den Umbau des Bindegewebes und die Angiogenese zu beschleunigen (Merwin et al., 1990), ist es möglich zu spekulieren, dass das Fehlen notwendiger biologischer Aktivitäten bei den Patienten mit Parodontitis zu einem unzureichenden Umbau und einer unzureichenden Perfusion zahntragender Gewebe führt, die zur parodontalen Zerstörung beitragen. Dies wird zusätzlich durch die Tatsache gestützt, dass die TGF-beta1-Spiegel, die bei fortgeschrittener experimenteller Parodontitis aus den Parodontaltaschen bestimmt wurden, vermindert waren (Skaleric et al., 1997). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie beobachteten Holla et al. keine Korrelationen zwischen den SNPs des TGF-beta1-Gens (Codon 10, 25) und der Anfälligkeit für Parodontitis bei kaukasischen Probanden tschechischer Nationalität (Holla et al., 2002). Auch in der Studie von Erciyas et al konnte keine Assoziation zwischen dem Polymorphismus im Codon 10 und der Parodontitis festgestellt werden (Erciyas et al., 2010). Allerdings betrachtete die letzte Studie Patienten mit einer aggressiven Form der Parodontitis in Patienten aus Mittelmeerraum. Diese widersprüchlichen Ergebnisse weisen auf die Bedeutung des ethnischen Hintergrunds in Zytokin-SNP-Studien und / oder auf die unterschiedliche Anzahl von Patienten hin, die in die verglichenen Studien aufgenommen wurden.

In mehreren weiteren Studien wurde die Rolle von weiteren Polymorphismen von TGF-beta1 einschließlich -29C/T, -509C/T, und -788C/T analysiert (Holla et al., 2002; Kobayashi et al., 2009; Atilla et al., 2006;). Auch hier ist die Datenlage nicht eindeutig und zum Teil widersprüchlich, was neben der Schwere der Erkrankung auch durch die ethnischen Aspekte zu erklären ist (Cui et al., 2015; Atanasovska-Stojanovska et al., 2009).

Assoziation vom IL-6-Promoter-Polymorphismus und der chronischen Parodontitis

In unserer Studie wurde der -174IL-6 CC-Genotyp, der für eine niedrige phänotypische IL-6-Produktion kodiert, bei Parodontitis-Patienten häufiger beobachtet als bei Kontrollpersonen ($P = 0,0283$). In Hinblick auf das Verständnis der chronischen Parodontitis als eine Inflammation-bedingte Erkrankung, und die bekannte Rolle von IL-6 für die Vermittlung der Inflammation, ist unser Ergebnis zunächst kontraintuitiv. Auf der anderen Seite lassen sich unsere Ergebnisse im Kontext der protektiven Rolle von IL-6 in der Ausbildung der Immunität gegen verschiedene Pathogene einordnen. Für mehrere pathogene Keime wurde die wichtige Rolle von IL-6 bereits gezeigt. So konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass das Fehlen von IL-6 Produktion innerhalb von 6 Wochen zur unkontrollierten bakteriellen Infektion und erhöhten Mortalität führt (Dann SM et al., 2008). Auch in mehreren anderen Studien an genetisch veränderten Mäusen legen die Daten nahe, dass IL-6 sowohl bei angeborenen als auch bei erworbenen Immunantworten eine Rolle spielt, die den Wirt von einer Vielzahl von Infektionen schützt (Rose-John S et al., 2017). Konsistent mit den Daten aus Tiermodellstudien sind die klinischen Patientendaten. So wurde berichtet, dass der -174IL-6 G / C-Polymorphismus die Entwicklung einer Septikämie bei Frühgeborenen beeinflusst (Harding et al, 2003). Es lässt sich daher annehmen, dass eine genetisch bedingte niedrige IL-6-Produktion die erforderliche Abwehr gegen bakterielle Pathogene einschließlich der oralen anaeroben grampositiven (Booth et al., 2004) und gramnegativen anaeroben Bakterien (Lovegrove 2004) bei Parodontitis verhindert. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen berichteten Trevilatto und Kollegen eine positive Assoziation zwischen dem Genotyp -174IL-6 GG ("High Producers") und der chronischen Parodontitis in einer Kohorte kaukasischer Brasilianer (Trevilatto et al., 2003). Im Widerspruch dazu fanden Holla und Kollegen keinen Zusammenhang zwischen dem -174IL-6 G / C-Polymorphismus und chronischer Parodontitis bei kaukasischen Tschechen (Holla et al., 2004).

In weiteren Studien wurden Polymorphismen an anderen Positionen in IL-6 oder IL-6-Rezeptorgenen analysiert. So wurde in einer weiteren chinesischen Studie die Rolle von IL-6-

1363 G/T und IL-6R + 48,892 A/C Polymorphismen für die erhöhte Anfälligkeit für chronische Parodontitis angenommen (Zhang et al, 2014). Dagegen wurde in der Metaanalyse von Nikolopoulos und Kollegen keine Assoziation zwischen IL-6-Polymorphismus und der chronischen Parodontitis gezeigt (Nikopoulos et al., 2008).

Man kann daher zusammenfassen, dass trotz zunehmender Berichte verschiedener Studien über die mit Parodontitis verbundenen genetischen Polymorphismen eine große Inkonsistenz bei bestimmten Polymorphismen besteht. Abgesehen von ethnischen Unterschieden könnte dies auf viele Einfluss bzw. Biasfaktoren zurückzuführen sein, darunter klinische Diagnosen, Umgebungsvariablen, biologische Plausibilität, Penetranz und Design von Assoziationsstudien (Kinane and Hart, 2003)

Assoziation zwischen dem -308TNF-alpha-Polymorphismus und der chronischen Parodontitis

TNF-alpha ist ein Schlüsselzytokin, das stark in die Entwicklung der Entzündung involviert ist. In mehreren früheren Studien wurde die Rolle von TNF-alpha Polymorphismen an den Positionen: - 1031, - 863, - 857, - 376, - 308, und - 238 (*Promotor*) sowie + 489 (erstes Intron) für die Entwicklung von Parodontitis in verschiedenen ethnischen Gruppen gezeigt.

So demonstrierten Yang et al. die Rolle von TNF-alpha-1031 SNP für das Risiko einer chronischen Parodontitis in der chinesischen Bevölkerung (Yang et al., 2013). Dagegen fehlte diese Assoziation für TNF-alpha-857C/T sowie -238G/A Polymorphismen. Daten der Meta-Analyse von Ding et al. zeigten, dass TNF-alpha-308G/A und -863C/A zur erhöhten Parodontitis-Anfälligkeit führen können (Ding et al., 2014). In Bezug auf andere Polymorphismen im TNF-alpha Gen wurden verschiedene Ergebnisse in Abhängigkeit vom ethnischen Hintergrund erhoben (Galbraith et al.; Soga et al., 2003). Eine frühere Studie in iranischen Patienten konnte keine

Assoziation zwischen Parodontitis und einem bestimmten TNF-alpha-308 Genotyp feststellen (Solhjoo et al., 2014).

Interessanterweise konnten wir und einige andere Autoren (Fassmann et al., 2003; Craandijk et al., 2002; Folwaczny et al., 2004), die ihre Studien mit kaukasischem Patienten durchführten, keine Korrelationen zwischen dem Polymorphismus -308TNF-apha (G / A) und der chronischen Parodontitis feststellen. Auch die auf einer 17 Studien-basierte Metaanalyse (Nikolopoulos et al., 2008) konnte keine Assoziation zwischen -308 TNF-alpha und der chronischen Parodontitis in der kaukasischen Bevölkerung feststellen. Die widersprüchliche Datenlage lässt am ehesten auf die Unterschiede in der Kohortenzusammensetzung zurückführen. In der Tat lässt sich die Assoziation zwischen -308 TNF-alpha-Poylmorphimsus und der Parodontitis in erster Linie in der asiatischen Population feststellen. So haben Ding und Kollegen in ihrer Metaanalyse gezeigt, dass die beobachteten Effekte der Genpolymorphimsen in der asiatischen Kohorte deutlich stärker waren als in der kaukasischen Kohorte (Ding et al., 2014). Die Autoren schlussfolgerten daher, dass der gefundene Polymorphismus eine wichtige Rolle in der Pathogenese der chronischen Parodontitis in der asiatischen Population spielt und weniger wichtig für die kaukasische Population ist.

Polymorphismus in IFN-gamma und chronische Parodontitis

IFN-gamma ist einer der wichtigsten Immunmediatoren, der von Effektor-Zellen des Immunsystems einschließlich CD4 +, CD8 + T- Zellen und natürlichen Killerzellen sekretiert wird (Schroder et al., 2004). Daten einiger Studien liefern Hinweise darauf, dass eine veränderte IFN-gamma-Konzentration in der Gingiva-Crevicular-Flüssigkeit, Parodontalgewebe oder im Serum die Entstehung von Gingivitis, die Sondierungstiefe und den Alveolarknochenverlust beeinflussen kann (Dutzan et al., 2009; Gorska et al., 2003). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Serumspiegel von IFN-gamma mit steigender Zahnbelagbelastung durch parodontale Krankheitserreger assoziiert war (Andrukhov et al., 2011).

Ausgehend aus seiner bekannten pro-inflammatorischen Wirkung und den bereits beschriebenen Assoziationen mit gingivalen Erkrankungen, scheint die Aufklärung der Rolle von IFN-gamma für die Entstehung parodontaler Erkrankungen besonders relevant zu sein. In diesem Kontext ist die Untersuchung der genetischen Grundlage für die Zytokinproduktion von Bedeutung. Frühere Untersuchungen konnten zeigen, dass der Einzelnukleotidpolymorphismus A→T an der Position +874 im ersten Intron vom IFN-gamma-Gen mit einer gestörten IFN-gamma-Produktion assoziiert ist (Pravica et al., 2000).

Das + 874 T-Allel ist mit den 12 CA-Repeats verbunden, die eine spezifische Sequenz für die NFkB-Bindungsstelle bereitstellt und die IFN-gamma-Genexpression induziert (Bream et al., 2002). In unserer Studie haben wir Allel- und Genotypfrequenzen von IFN-gamma-Polymorphismus in Patienten mit chronischer Parodontitis untersucht. Eine Assoziation zwischen dem Nachweis der chronischen Parodontitis und einem +874 IFN-gamma-Genpolymorphismus konnte nicht nachgewiesen werden. Auch weitere Studien haben die Rolle vom IFN-gamma-Polymorphismus für die Parodontitisentstehung analysiert (Reichert et al., 2008, Hooshmand et al., 2008, Holla et al., 2011, Loo et al., 2012). Ähnlich wie in unserer Studie konnte in diesen Studien keine Assoziation zwischen IFN-gamma-Polymorphismus und der chronischen Parodontitis festgestellt werden. Während die Studie von Reichert und Ko-Autoren, Holla und Ko-Autoren sowie Loo und Ko-Autoren den Polymorphismus in der gleichen Region (+874) analysiert haben, wurde in der Studie von Hooshmand und Kollegen der Polymorphismus (G5644A) analysiert, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert. Auch eine Assoziation zwischen IFN-gamma-Polymorphismen und Parodontitis-assoziierten Erregern wurde analysiert (Reichert et al., 2008; Holla et al., 2011). So zeigten Reichert und Ko-Autoren eine signifikante Assoziation zwischen der IFN-gamma + 874-Variante und einigen parodontalen Pathogenen wie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Prevotella intermedia*. Dagegen fanden Holla und

Kollegen (Holla et al., 2011) keinen Einfluss einer genetischen Varianten auf die mikrobielle Komposition.

Neben dem IFN-gamma-Polymorphismus sind auch genetische Variante in Sequenzen des IFN gamma-Rezeptors untersucht worden. Heidari et al. haben neben IFN-gamma- auch IFN-gamma-Rezeptor1-Polymorphismen angeschaut (Heidari et al., 2015). Die Autoren fanden eine Assoziation zwischen dem IFN-gamma-Polymorphismus und der Entstehung der chronischen Parodontitis. Dagegen konnte in der neueren Studie von Heidari und Ko-Autoren keine signifikanten Unterschiede in der Frequenz von Allelen in IFN-gamma R1 (-611A/G), IFN-gammaR1 (+189 T/G), IFN-gamma R1 (+95C/T) zwischen Patienten mit Parodontitis und gesunden Kontrollen festgestellt werden (Heidari et al., 2019).

Polymorphismus in IL-10 und chronische Parodontitis

Das IL-10-Zytokin besitzt ein starkes anti-inflammatorisches Potenzial, das eine Entzündung auf mehreren Ebenen herunterregulieren kann. Es lässt sich daher annehmen, dass bei Patienten mit Parodontitis ein Genotyp vorliegen muss, der mit verminderter Produktion von IL-10 assoziiert ist. So wird das IL-10 häufig bei akuten bakteriellen Infektionen ausgeschüttet mit dem Ziel Schlüsselrolle bei dem Abklingen der Infektion zu spielen. Seine Auswirkung auf die Infektion kann jedoch je nach auslösendem Bakterium variieren. Während die IL-10 Produktion den Verlauf und das Überleben bei einigen Fällen positiv beeinflussen kann, ist die Sekretion von IL-10 durch die Inhibierung bakterieller Clearance in anderen Fällen schädlich. In ihrem Review beschreiben Penalzoa und Koautoren (Penalzoa et al., 2016), dass IL-10 eine übermäßige Unterdrückung der Immunantwort bei Infektion mit intrazellulären Bakterien bewirkt, was letztendlich die Persistenz und die Verbreitung der Bakterien im Wirt begünstigt.

Drei funktionelle Einzelnukleotidpolymorphismen sind bis jetzt im Promotor von IL-10-Gen identifiziert: -1082 A/G, -819 C/T and -592 C/A. Alle drei Polymorphismen sind mit

Veränderungen in der Höhe der Zytokinproduktion assoziiert. Entsprechend dem potentiellen Risiko für die Entstehung chronischer Parodontitis wurden diese IL-10-Gen-Polymorphismen in einigen Studien in Bezug auf das Auftreten chronischer Parodontitis untersucht. Die Daten dieser Studien zeigen jedoch wie auch für die anderen bis jetzt diskutierten Zytokine inkonsistente Ergebnisse. In einer skandinavischen Studie wurden IL-10-Hochproduktion-assozierte Polymorphismen (dazu gehörten IL-10 -819C/C und -592C/C) so genannte IL-10-Hoch-Produzenten mit der chronischen Parodontitis assoziiert. Dagegen war der Niedriglevel-Haplotyp ATA mit der Protektion gegenüber chronischer Parodontitis assoziiert (Armigohar et al, 2015). Widersprüchliche Ergebnisse zeigte auch eine brasilianische Studie, die die chronische Parodontitis am häufigsten bei Patienten mit Niedrigproduktion-assoziertem Genotyp (-592AA) feststellte (Claudino et al., 2008).

In unserer Arbeit waren wir auf der Untersuchung des -1082 IL-10 Polymorphismus fokussiert. Unsere Analysen konnten keine Unterschiede zwischen den Patienten mit chronischer Parodontitis und der gesunden Kontrolle in Bezug auf IL-10-Polymorphismusverteilung feststellen. Dagegen wurde in einer schwedischen Studie mit dem Fokus auf -1082 IL-10-Polymorphismus eine Assoziation zwischen dem -1082 GG-Genotyp und der chronischen Parodontitis festgestellt. Eine umgekehrte Assoziation zwischen der chronischen Parodontitis und dem -1082 AA-Genotyp wurde in der jordanischen Population festgestellt (Jaradat et al., 2012). Diese inkonsistenten bzw. nicht reproduzierbaren Daten einzelner Studien sind - ähnlich wie auch bei Ergebnissen anderer Zytokinpolymorphismen - am besten durch ethnische Unterschiede, Unterschiede in der Diagnostik, Kohortengrößen und Kohortenzusammensetzung zu erklären.

6. Schlussfolgerungen und Ausblick

Unsere Ergebnisse stützen die Hypothese, dass Polymorphismus-bedingte Variationen in der Sekretionskapazität von Zytokinen (sogenannte „Hoch-Produzierer“ und „Niedrig-Produzierer“ der Zytokine) eine bedeutende Rolle für die Anfälligkeit bzw. für die Entwicklung chronischer Parodontitis spielen könnten. Somit stehen unsere Daten im Einklang mit dem Multigen-Interaktionsmodell der Parodontisanfälligkeit. Die genaue Bewertung der Einzelnukleotidpolymorphismen jeweiliger Zytokine könnte somit eine bessere Risikoprädiktion für die Parodontisentstehung ermöglichen und eine frühe Durchführung der präventiven Behandlungen bei anfälligen Personen erlauben. Darüber hinaus könnte das genaue Wissen über das genetisch bestimmte Zytokinproduktionsmuster die Entwicklung von Pathogenesegetriebenen Parodontitistherapien ermöglichen. Eine lokale Behandlung mit individuell vorbereiteten Polymorphismus-angepassten Zytokincocktails könnten eine mögliche innovative therapeutische Alternative in der Zukunft darstellen. Es ist jedoch wichtig zu betonen, dass die gefundenen Assoziationen für eine bestimmte ethnische Population gelten und somit nicht auf andere ethnische Gruppen ohne weiteres übertragbar sind. Darüber hinaus können die gefundenen genetischen Prädispositionen nicht als separate einzelne Risikofaktoren gelten. Vielmehr ist die Interaktion zwischen den genetischen, mikrobiellen, Umwelt- und Lebensstilfaktoren für die Entstehung von Parodontitis von Bedeutung. Aus diesem Grund sollten diese Faktoren in Kombination betrachtet werden, um das individuelle Patientenrisiko abzuschätzen und individualisierte Prävention sowie Therapiemaßnahmen zu empfehlen. In diesem Zusammenhang scheint die Anwendung system-medizinischer Ansätze von Bedeutung zu sein. Dabei soll der komplexe pathologische Prozess der Parodontitis auf der Grundlage vom vielfältigen Fragestellung-gerechten generierten Datenmaterial auf genetischer, zellbiologischer und organphysiologischer Ebene unter Einbeziehung individueller klinischer und Umweltfaktoren. Um robuste reproduzierbare Ergebnisse zu erlangen, soll das optimale Design solcher neuen

Studien die Untersuchung großer gutcharakterisierten und gematchten Kohorten mittels moderner Hochdurchsatz-Technologien beinhalten.

7. Literatur

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787-793
- Al Jehani YA. Risk Factors of Periodontal Disease: Review of the Literature. *Int J Dent.* 2014; 2014:182513
- Annals of Periodontology*, 1999; 4:1
- Andrukhov O, Ulm C, Reischl H, Nguyen PQ, Matejka M, Rausch-Fan X I. Serum cytokine levels in periodontitis patients in relation to the bacterial load. *J Periodontol* 2011;82:885–92
- Armingohar Z, Jørgensen JJ, Kristoffersen AK, Schenck K, Dembic Z. Polymorphisms in the interleukin-10 gene and chronic periodontitis in patients with atherosclerotic and aortic aneurysmal vascular diseases. *J Oral Microbiol.* 2015;7:26051
- Atanasovska-Stojanovska A, Trajkov D, Popovska M, Spiroski M. Analysis of Transforming growth factor-Beta1 Gene Polymorphisms in Macedonian patients with Chronic Periodontitis. *Macedonian Journal of Medical Sciences.* 2009;2:30–35
- Atilla G, Emingil G, Kose T, Berdeli A. TGF-beta1 gene polymorphisms in periodontal diseases. *Clin Biochem.* 2006;39:929–934
- Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 1998;66:1014-1020
- Booth V, Downes J, Van den Berg J, Wade WG. Gram-positive anaerobic bacilli in human periodontal disease. *Journal of Periodontal Research* 2004;39:213-220
- Bream JH, Ping A, Zhang X, Winkler C, Young HA. A single nucleotide polymorphism in the proximal IFN-gamma promoter alters control of gene transcription. *Genes Immun.* 2002;3:165–169
- Cambien F, Ricard S, Troesch A, Mallet C, Générénaz L, Evans A, Arveiler D, Luc G, Ruidavets JB, Poirier O. Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Hypertension* 1996;28:881 887
- Campochiaro C, Dagna L. The conundrum of interleukin-6 blockade in COVID-19. *Lancet Rheumatol* 2020;2:e579-e580
- Caton J. Periodontal diagnosis and diagnostic aids. In: *World Workshop in Clinical Periodontics.* Chicago: American Academy of Periodontology 1989:11–122
- Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papananou PN, Sanz M, Tonetti MS. A new classification scheme for periodontal and peri-

implant diseases and conditions – introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Periodontology* 2018;89:S1-S8

Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, Geisinger ML, Genco RJ, Glogauer M, Goldstein M, Griffin TJ, Holmstrup P, Johnson GK, Kapila Y, Lang NP, Meyle J, Murakami S, Plemons J, Romito GA, Shapira L, Tatakis DN, Teughels W, Trombelli L, Walter C, Wimmer G, Xenoudi P, Yoshie H. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol.* 2018;45:S68–S77

Claudino M, Trombone AP, Cardoso CR, Ferreira SB Jr, Martins W Jr, Assis GF, Santos CF, Trevilatto PC, Campanelli AP, Silva JS, Garlet GP. The broad effects of the functional IL-10 promoter-592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG expression and their association with periodontal disease outcome. *J Leukoc Biol.* 2008;84:1565–73

Craandijk J, van Krugten MV, Verweij CL, van der Velden U, Loos BG. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in relation to periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 2002;29:28-34

Cui L, Sun YP, Li DG, Wang SH, Shao D. Transforming growth factor-beta1 rs1800469 polymorphism and periodontitis risk: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8:15569–15574

Dann SM, Spehlmann ME, Hammond DC, Iimura M, Hase K, Choi LJ, Hanson E, Eckmann L. IL-6-Dependent Mucosal Protection Prevents Establishment of a Microbial Niche for Attaching/Effacing Lesion-Forming Enteric Bacterial Pathogens. *J Immunol.* 2008;180:6816-6826

Ding C, Ji X, Chen X, Xu Y, Zhong L. TNF-a gene promoter polymorphisms contribute to periodontitis susceptibility: evidence from 46 studies. *J Clin Periodontol.* 2014;41:748–759

Doğan B, Kipalev AS, Okte E, Sultan N, Asikainen SE. Consistent intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* despite clonal diversity. *J Periodontol.* 2008;79:307–315

Dutzan N, Vernal R, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Silva N, Aguillon JC, Puente J, Pozo P, Gamonal J. Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2009;80:290–296.

Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics, 2013

Erciyas K, Pehlivan S, Sever T, Igci M, Arslan A, Orbak R. Association between TNF-a, TGF-β1, IL-10, IL-6 and IFN-g gene polymorphisms and generalized aggressive periodontitis. *Clin Invest Med.* 2010;33:85–91.

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. *Journal of Periodontal Research* 2003;38:394-399

- 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. *Journal of Clinical Periodontology* 2004;31:449-453
- Galbraith GMP, Steed RB, Sanders JJ, Pandey JP. Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: influence of tumor necrosis factor genotype. *J Periodontol.* 1998;69:428–433;
- Gemmel E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology* 2000 1997;14:112-143
- Genco R. Current View of Risk Factors for Periodontal Diseases. *J Periodont* 1996;67:1041-1049
- Górska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madaliński K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2003;30:1046–52
- Harding D, Dhamrait S, Millar A, Humphries S, Marlow N, Whitelaw A, Montgomery H. Is interleukin-6 -174 genotype associated with the development of septicemia in preterm infants? *Pediatrics* 2003;112:800-803
- Hart T, Kornman KS. Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology* 2000 1997;14:202-215
- Heidari Z, Mahmoudzadeh-Sagheb H, Hashemi M, Ansarimoghaddam S, Moudi B, Sheibak N. Association between IFN- γ +874 A/T and IFN- γ R1 (-611A/G, +189T/G and +95C/T) gene polymorphisms and chronic periodontitis in a sample of Iranian population. *Int J Dent.* 2015;2015:375359
- Heidari Z, Moudi B, Mahmoudzadeh-Sagheb H. Immunomodulatory factors gene polymorphisms in chronic periodontitis: an overview. *BMC Oral Health* 2019;19:29
- Holla LI, Fassmann A, Benes P, Halabala T, Znojil V. 5 polymorphisms in the transforming growth factor-beta 1 gene (TGF-beta 1) in adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 2002;29:336-341
- Holla LI, Fassmann A, Stejskalova A, Znojil V, Vanek J, Vacha J. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* 2004;75:30-36
- Holla LI, Hrdlickova B, Linhartova P, Fassmann A. Interferon-gamma +874A/T polymorphism in relation to generalized chronic periodontitis and the presence of periodontopathic bacteria. *Arch Oral Biol.* 2011;56:153–158
- Hooshmand B, Hajilooi M, Rafiei A, Mani-Kashani KH, Ghasemi R. Interleukin-4 (C-590T) and interferon-gamma (G5644A) gene polymorphisms in patients with periodontitis. *J Periodontal Res.* 2008;43:111–115

- Jaradat SM, Ababneh KT, Jaradat SA, Abbadi MS, Taha AH, Karasneh JA, Haddad HI. Association of interleukin-10 gene promoter polymorphisms with chronic and aggressive periodontitis. *Oral Dis.* 2012;18:271–279
- Kinane DF, Lowe GDO. How periodontal disease may contribute to cardiovascular disease. *Periodontology 2000.* 2000;23:121–126
- Kinane DF, Hart TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Critical Reviews in Oral biology and Medicine* 2003;14:430-449
- Kobayashi T, Murasawa A, Ito S, Yamamoto K, Komatsu Y, Abe A. Cytokine gene polymorphisms associated with rheumatoid arthritis and periodontitis in Japanese adults. *J Periodontol.* 2009;80:792–799
- Kou Y, Inaba H, Kato T, Tagashira M, Honma D, Kanda T, Ohtake Y, Amano A. Inflammatory responses of gingival epithelial cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* vesicles are inhibited by hop-associated polyphenols. *J Periodontol* 2008;79:174–180
- Kubota M, Tanno-Nakanishi M, Yamada S, Okuda K, Ishihara K. Effect of smoking on subgingival microflora of patients with periodontitis in Japan. *BMC Oral Health.* 2011;11:1
- Lee PY, Chesnoy S, Huang L. Electroporatic delivery of TGF-beta1 gene works synergistically with electric therapy to enhance diabetic wound healing in db/db mice. *The Journal of Investigative Dermatology* 2004;123:791-798
- Loo WTY, Fan CB, Bai LJ, Yue Y, Dou YD, Wang M. Gene polymorphism and protein of human pro-and anti-inflammatory cytokines in Chinese healthy subjects and chronic periodontitis patients. *J Transl Med.* 2012;10:S8
- Lovegrove JM. Dental plaque revisited: bacteria associated with periodontal disease. *Journal of the New Zealand Society of Periodontology* 2004;87:7-21
- Merwin JR, Anderson JM, Kocher O, Van Itallie CM, Madri JA. Transforming growth factor beta 1 modulates extracellular matrix organization and cell-cell junctional complex formation during in vitro angiogenesis. *Journal of Cellular Physiology* 1990;142:117-128
- Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC. Dental plaque-induced gingival conditions. *J Periodontol.* 2018; 89 Suppl 1:S17-S27.
- Müller HP, Heinecke A, Fuhrmann A, Eger T, Zöller L. Intraoral distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in young adults with minimal periodontal disease. *J Perodont Research* 2001;36:114-123
- Needleman I, Garcia R, Gkranias N, Kirkwood KL, Kocher T, Iorio AD, Moreno F, Petrie A. Mean annual attachment, bone level and tooth loss: A systematic review. *J Clin Periodontol.* 2018;45:S112–S129
- Nikolopoulos GK, Dimou NL, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. *J Clin Periodontol.* 2008;35:754–767

Nishimura F, Soga Y, Iwamoto Y, Kudo C, Murayama Y. Periodontal disease as part of the insulin resistance syndrome in diabetic patients. *Journal of the International Academy of Periodontology*. 2005;7:16–20

Offenbacher S. Periodontal Diseases: Pathogenesis. *Annals Periodontol* 1996; 1: 821-878

Oppenheim JJ. Cytokines: Past, Present, and Future. *Int J Hematol* 2001;74:3-8

Ozçaka O, Biçakci N, Pussinen P, Sorsa T, Köse T, Buduneli N. Smoking and matrix metalloproteinases, neutrophil elastase and myeloperoxidase in chronic periodontitis. *Oral Diseases*. 2011;17:68–76

Page RC, Beck JD. Risk assessment for periodontal diseases. *Int. Dent Journal* 1997;47:61-87

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

Pan W, Wang Q, Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int J Oral Sci*. 2019;11:30

Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, Flemmig TF, Garcia R, Giannobile WV, Graziani F, Greenwell H, Herrera D, Kao RT, Kebschull M, Kinane DF, Kirkwood KL, Kocher T, Kornman KS, Kumar PS, Loos BG, Machtei E, Meng H, Mombelli A, Needleman I, Offenbacher S, Seymour GJ, Teles R, Tonetti MS. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 2018;45:S162–S170

Peñaloza HF, Schultz BM, Nieto PA, Salazar GA, Suazo I, Gonzalez PA, Riedel CA, Alvarez-Lobos MM, Kalergis AM, Bueno SM. Opposing roles of IL-10 in acute bacterial infection. *Cytokine Growth Factor Rev* 2016;32:17-30

Peng J, Song J, Han J. The relationship between tooth loss and mortality from all causes, cardiovascular diseases, and coronary heart disease in the general population: systematic review and dose–response meta-analysis of prospective cohort studies *Biosci Rep*. 2019 Jan 31; 39: BSR20181773

Poole E, Avdic S, Hodgkinson J, Jackson S, Wills M, Slobedman B, Sinclair J. Latency-Associated Viral Interleukin-10 (IL-10) Encoded by Human Cytomegalovirus Modulates Cellular IL-10 and CCL8 Secretion during Latent Infection through Changes in the Cellular MicroRNA hsa-miR-92a. *J Virol*. 2014;88:13947–13955

Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* 2000;61:863–866

Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontics, 1993. London: Quintessence; 1994

Pucher J, Stewart J. Periodontal disease and diabetes mellitus. *Current Diabetes Reports*. 2004;4:46–50

Reichert S, Machulla HK, Klapproth J, Zimmermann U, Reichert Y, Glaser C, Schaller HG, Schulz S. Interferon-gamma and Interleukin-12 gene polymorphisms and their relation to aggressive and chronic periodontitis and key periodontal pathogens. *J Periodontol*. 2008;79:1434–1443

Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontology* 2000;1997:14:144-157

Rose-John S, Winthrop K, Clabrese K. The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications. *Nature Reviews Rheum* 2017;13:399-409

Saito Y, Fujii R, Nakagawa KI, Kuramitsu HK, Okuda K, Ishihara K. Stimulation of *Fusobacterium nucleatum* biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiology and Immunology*. 2008;23:1–6

Salvi GE, Yalda B, Collins JG, Jones BH, Smith FW, Arnold RR, Offenbacher S. Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Periodontol* 1997;68:127-35

Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Molecular Cell Research* 2011;1813:878-888

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004;75:163–89

Seppälä B, Seppälä M, Ainamo J. A longitudinal study on insulin-dependent diabetes mellitus and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*. 1993;20:161–165

Shungin D, Haworth S, Divaris K, Agler CS, Kamatani Y, Keun Lee M, Grinde K, Hindy G, Alaraudanjoki V, Pesonen P, Teumer A, Holtfreter B, Sakaue S, Hirata J, Yu YH, Ridker PM, Giulianini F, Chasman DI, Magnusson PKE, Sudo T, Okada Y, Völker U, Kocher T, Anttonen V, Laitala ML, Orho-Melander M, Sofer T, Shaffer JR, Vieira A, Marazita ML, Kubo M, Furuichi Y, North KE, Offenbacher S, Ingelsson E, Franks PW, Timpson NJ, Johansson I. Genome-wide analysis of dental caries and periodontitis combining clinical and self-reported data. *Nat Commun*. 2019; 10:2773

Skaleric U, Kramar B, Petelin M, Pavlica Z, Wahl SM. Changes in TGF-beta 1 levels in gingiva, crevicular fluid and serum associated with periodontal inflammation in humans and dogs. *European Journal of Oral Sciences* 1997;105:136-142

Soga Y, Nishimura F, Ohyama H, Maeda H, Takashiba S, Murayama Y. Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF α)–1031/–863,–857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. *J Clin Periodontol*. 2003;30:524–531

Solhjoo S, Mahmoudzadeh-Sagheb H, Heidari Z, Hashemi M, Rigi Ladez MA. Association between TNF- α (– 308 G \rightarrow a) gene polymorphism and chronic periodontitis. *Zahedan J Res Med Sci*. 2014;16:10–14

Soory M, Viridi H. Implications of minocycline, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor-beta on inflammatory repair potential in the periodontium. *Journal of Periodontology* 1999;70:1136-1143

Sutton JD, Salas Martinez ML, Gerkovich MM. Environmental Tobacco Smoke and Periodontitis in United States Non-Smokers, 2009 to 2012. *J Periodontol* 2017;88:565-574

Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol*. 2018;45:S149–S161

Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB Jr, de Souza AP, Line SR. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *Journal of Clinical Periodontology* 2003;30:438-442

Wactawski-Wende J, Grossi SG, Trevisan M, Genco RJ, Tezal M, Dunford RG, Ho AW, Hausmann E, Hreshchyshyn MM. The role of osteopenia in oral bone loss and periodontal disease. *Journal of Periodontology*. 1996;67:1076–1084

Yang W, Jia Y, Wu H. Four tumor necrosis factor alpha genes polymorphisms and periodontitis risk in a Chinese population. *Hum Immunol*. 2013;74:1684–1687

Zhang HY, Feng L, Wu H, Xie XD. The association of IL-6 and IL-6R gene polymorphisms with chronic periodontitis in a Chinese population. *Oral Dis*. 2014;20:69–75

8. Eidesstattliche Versicherung/Anteilerklärung

„Ich, Daniel Babel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Analyse von TNF-alpha-, TGF-beta-, IL-10-, IL-6- und IFN-gamma-Genpolymorphismen bei deutschen Patienten mit chronischer Parodontitis“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung zur Publikation:

Babel N, Cherepnev G, Babel D, Tropmann A, Hammer M, Volk H. D, and Reinke P. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, IL-6, and interferon-gamma gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. J Periodontol 2006, 77(12), 1978-83.

DB leistete einen wesentlichen Beitrag zu allen Aspekten der Arbeit. Eine detaillierte Beschreibung finden Sie unten.

Studiendesign: DB hatte zusammen mit zwei weiteren Ko-Autoren einen großen Einfluss auf die Konzeptualisierung und das Design der Studie. Zusammen mit einem weiteren Ko-Autor formulierte und verfasste er den Ethikantrag und die Patientenaufklärung.

Patientenuntersuchung und Rekrutierung für die Studie: DB war alleine zuständig für die Durchführung dieses Teils der Studie. Er untersuchte Patienten und dokumentierte die Befunde.

Assay-Etablierung: DB adaptierte den Assay für die Studie. Zusammen mit einem anderen Ko-Autor etablierte er die präanalytischen Schritte sowie die Probenvorbereitung. Die Durchführung und die Auswertung der Experimente erfolgte durch DB und einen weiteren Ko-Autor.

Literaturrecherche: Die Literaturrecherche für die Publikation wurde überwiegend durch andere Ko-Autoren durchgeführt, wobei einige Vorschlägen und Zuarbeit seitens von DB erfolgte.

Tabelle 1: Die Tabelle entstand auf der Grundlage der von DB gewonnenen Resultaten.

Manuskripts: die komplette Veröffentlichung (Zusammenfassung, Einführung, Material und Methoden, Ergebnisse und Diskussion) wurde überwiegend durch andere Ko-Autoren erstellt, wobei sich DB an ausführlichen Diskussionen, einigen Korrekturen und Vorschlägen beteiligt hat.

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10. Publikationsliste

Thieme CJ, Zgoura P, Todorova I, Babel D, Witzke O, Viebahn R, Halleck F, Bachmann F, Westhoff TH, Choi M, Babel N. Coronavirus Disease 2019 Associated Risk Score, Behavior, and Symptom Prevalence in German Transplant Recipients. *Transplant Proc.* 2020 Dec 16:S0041-1345(20)32897-9. doi: 10.1016/j.transproceed.2020.12.001.

Babel, N, Cherepnev, G, Babel, D, Tropmann, A, Hammer, M, Volk, H. D, and Reinke, P. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, IL-6, and interferon-gamma gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2006, 77(12), 1978-83.

11.Danksagung

Die experimentellen Arbeiten dieser Dissertation wurden im Institut für Medizinische Immunologie der Universitätsmedizin Charité Berlin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-D. Volk durchgeführt.

Ihm möchte ich für die interessante und praxisbezogene Themenstellung, spannenden und abwechslungsreiche Diskussionen, seine Ratschläge und Unterstützung danken.

Ein weiterer Dank gilt Mitarbeitern meiner Praxis, Frau Sabine Guillon und Fr. Julia Schaper, die an der Rekrutierung der Patienten sowie Probenbereitstellung beteiligt waren.

Weiterhin danke ich der Elsa-Kröner-Fresenius-Stiftung, deren finanzielle Unterstützung die Durchführung der Studie ermöglichte.

Für die gute Zusammenarbeit sowie die herzliche Atmosphäre möchte ich Kollegen des interdisziplinären Transplantationsforschungslabors danken, im Besonderen Frau Prof. Reinke, Alla Tropmann, Dr. Georg Cherepnev und Dr. Markus Hammer. Frau Prof. Reinke danke ich auch für ihre kompetente Ratschläge, Unterstützung und ihre Freundschaft.

Allen Freunden gebührt ein großes Dankeschön für ihre Ermutigung, Verlässlichkeit und Ablenkung.

Der tiefste Dank gilt meiner Familie - Kindern, Eltern sowie Schwiegereltern – für ihre immerwährende Unterstützung sowie Nina – für ihre kompetente Betreuung des experimentellen und statistischen Teils der Dissertation und für noch viel mehr.