

**Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**Parodontitis als ein Risikofaktor für die Bildung von Antikörpern gegen citrullinierte  
Peptide**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.) für das Fachgebiet  
Zahnmedizin

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Elisa Jurianz

geboren am 10.04.1990 in Greifswald

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

Gutachter:

1. apl. Prof. S. Reichert

2. Prof. M. Girndt

3. Prof. D. Ziebolz      Leipzig

02.04.2019

23.09.2019

## Referat

Parodontitis (PA) und Rheumatoide Arthritis (RA) sind chronische Erkrankungen mit Gemeinsamkeiten hinsichtlich ihrer Pathogenese, der betroffenen Gewebe und der Risikofaktoren. In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass das Rauchen für beide Erkrankungen einen markanten Risikofaktor darstellt [40, 40, 45]. Des Weiteren wurden Assoziationen zu den Zytokinen IL-6 [41, 48], IL-1 [63] und auch TNF- $\alpha$  [50] und vor allem zu HLA-DRB1-Allelen identifiziert [45, 69, 116]. Außerdem konnte die DNA oraler Bakterien in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA nachgewiesen werden [92].

Das Ziel dieser Studie war es, die Antikörpertiter gegen citrullinierte Proteine wie Filagrin (Anti-CCP) bzw.  $\alpha$ -Enolase (Anti-CEP-1) zwischen Patienten mit RA und entsprechender Parodontaldiagnose und Kontrollprobanden ohne RA zu vergleichen.

Es wurden 107 Probanden mit RA und 89 Kontrollprobanden ohne RA parodontal untersucht. Die Schwere der Parodontitis wurde gemäß den Richtlinien der CDC (Center of Disease control and Prevention) festgelegt. Die mikrobielle Analyse der subgingivalen Plaque auf fünf parodontopathogene Bakterien wurde im Eigenlabor der Poliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie mittels SSO-PCR (micro-IDent®-Test, Hain-Diagnostik, Nehren, Deutschland) durchgeführt. Die Antikörpertestungen auf Anti-CCP (Cut-off 5RE/ml) und Anti-CEP-1 (Cut-off 20RE/ml) wurden ELISA-basierend aus Patientenplasma bestimmt (EUROIMMUN AG, Lübeck). Mittels kommerzieller SSP-PCR Kits erfolgte die HLA-Typisierung aus Vollblut im interdisziplinären HLA-Labor [GHATT] der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Im Ergebnis konnte nachgewiesen werden, dass signifikant mehr RA-Patienten ACPA-positiv waren im Vergleich zu den Kontrollprobanden ohne RA (42% vs. 0%,  $p < 0,0001$ ). Innerhalb der RA-Gruppe war der Nachweis von Anti-CCP- (23,9% vs. 43,3% vs. 32,8%,  $p = 0,257$ ) und anti-CEP-1-Antikörpern (24,0% vs. 34,0% vs. 42,0%,  $p = 0,421$ ) nicht von der Schwere der parodontalen Diagnose (schwer, moderat, mild/keine Parodontitis) abhängig. RA-Probanden mit positivem Nachweis für *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a.*) waren häufiger positiv für Anti-CCP-Antikörper ( $p = 0,034$ ) im Vergleich zu *A.a.*-negativen Patienten. Die Einnahme von DMARD's (Disease Modifying Anti Rheumatic Drugs) war innerhalb der RA-Gruppe positiv mit einem Nachweis von Anti-CCP-Antikörpern assoziiert ( $p = 0,019$ ). Auf genetischer Ebene war das HLA-DRB1\*04-Allel bei RA-Probanden häufiger mit dem Nachweis von Anti-CCP- (59,0% vs. 31,6%,  $p = 0,014$ ) und Anti-CEP-1 (65,9% vs. 34,5%,  $p = 0,004$ ) -Antikörpern assoziiert. Dagegen waren HLA-DRB1\*07 und HLA-DRB1\*13 negativ zu Anti-CCP ( $p = 0,029$ ;  $p = 0,009$ )- und Anti-CEP-1-Antikörpern (nur HLA-DRB1\*13,  $p = 0,011$ ) assoziiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass HLA-DRB1\*04 sowie eine Kolonisation mit *A.a.* die Bildung von Antikörpern gegen citrullinierte Peptide fördern könnten.

Jurianz, Elisa: Ist Parodontitis ein Risikofaktor für die Bildung von Antikörpern gegen citrullinierte Peptide?, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 77 Seiten, 2019

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Parodontitis.....	3
1.1.1 Epidemiologie.....	3
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese .....	3
1.2 Rheumatoide Arthritis .....	10
1.3 Zusammenhang RA und PA .....	14
<b>2. Zielstellung und Hypothesen</b> .....	16
<b>3. Material und Methodik</b> .....	17
3.1 Patienten mit RA .....	17
3.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien.....	18
3.1.2 Klinisch parodontologische Untersuchung der RA-Probanden.....	19
3.2 Mikrobiologischer Test auf parodontale Markerkeime .....	22
3.2.1 Isolation der bakteriellen DNA mittels QIAamp® DNA Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden) ....	22
3.2.2 Multiplex-Amplifizierung durch Biotin-markierte Primer unter Verwendung des micro- Ident®-Kits von HAIN Lifescience .....	23
3.2.3 Hybridisierung.....	24
3.2.4 Auswertung:.....	25
3.3 Molekulargenetischer Nachweis von HLA-DRB1-Allelen.....	26
3.3.1 Isolierung der DNA aus Vollblut.....	26
3.3.2 Genotypisierung der HLA-Klasse-II-Allele mittels PCR unter Verwendung sequenz- spezifischer Primer (SSP-PCR).....	27
3.3.3 Agarosegelelektrophorese zum Nachweis amplifizierter HLA-Allelfragmente.....	28
3.4 Testverfahren Anti-CEP-1- und Anti-CCP-ELISA .....	29
3.5 Statistische Berechnungen.....	30
<b>4. Ergebnisse</b> .....	31
4.1 Demografische und klinische Parameter .....	31

4.2 Nachweis bakterieller DNA.....	35
4.3 Nachweis der Serumspiegel für Anti-CCP und Anti-CEP-1 bei RA-Probanden und Kontrollprobanden ohne RA.....	36
4.3.1 Nachweis von Anti-CEP-1, Anti-CCP und ACPAs (Anti-CEP-1 + Anti-CCP) innerhalb der RA-Gruppe in Abhängigkeit vom parodontalen Befund.....	37
4.4 Parodontale Leitkeime in Assoziation zum ACPA-Nachweis innerhalb der RA-Gruppe.....	40
4.5 Individuelle Expression von HLA-Klasse-II-Merkmalen in Assoziation zum Serumspiegel für Anti-CCP und Anti-CEP-1 innerhalb der RA-Gruppe.....	42
4.6 Zusammenhang zwischen der Gabe von antirheumatischen Medikamenten und dem Serumspiegel für Anti-CEP-1 und Anti-CCP.....	43
4.7 Multivariate Analysen zur Generation adjustierter Odds Ratios für einen positiven Anti-CEP-1- und Anti-CCP-Serumspiegel unter Patienten mit Rheumatoider Arthritis.....	45
4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	50
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>54</b>
5.1 Methodendiskussion.....	55
5.2 Diskussion der Ergebnisse.....	58
5.2.1 Anti-CCP- und Anti-CEP-1-Daten bei RA-Patienten im Vergleich zu Kontrollprobanden ohne RA.....	58
5.2.2 Klinischer Vergleich RA versus Kontrollgruppe.....	59
5.2.3 Anti-CCP- und Anti-CEP-1-Serumspiegel innerhalb der RA-Gruppe in Abhängigkeit von der parodontalen Diagnose.....	59
5.2.4 PA-Keime in Assoziation zu beiden ACPAs innerhalb der RA-Gruppe.....	61
5.2.5 Assoziationen von HLA-Merkmalen zu ACPA innerhalb der RA-Gruppe.....	62
5.2.6 Einnahme antirheumatischer Medikamente in Relation zum Nachweis von ACPA.....	64
<b>6. Zusammenfassung und Schlussfolgerung.....</b>	<b>64</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>67</b>
<b>8. Thesen.....</b>	<b>76</b>

## Anhang

## Eidesstattliche Erklärungen

## Danksagung

## Abkürzungsverzeichnis

A.a.	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
ACPA	Anti citrullinated peptide antibodies
ACR	American College of Rheumatology
AG	Aktiengesellschaft
ALSA	Attachment loss surface area
API	Approximaler Plaque Index
APC	Antigen präsentierende Zelle
AW1 / AW2	Kurzformen von Pufferlösungen
BOP	Bleeding on Probing
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
BZAEK	Bundeszahnärztekammer
CAL	Clinical attachment loss
CCP	Cyklisch citrulliniertes Peptid
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CEP-1	Citrulliniertes $\alpha$ -enolase-1 peptid
CRP	C-reaktives Protein
DAS (28)	Disease activity score (28)
DC	Dendritische Zelle
DGRH	Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie
DMARD	Disease modifying antirheumatological drugs
DMS	Deutsche Mundgesundheitsstudie
ESR	Erythrozyten-Sedimentationsrate
ELAM	Endothel-Leukozyten-Adhäsionsmolekül
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EULAR	European League against Rheumatism
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
H <sub>2</sub> S	Schwefelwasserstoff
HYB	Hybridisierungspuffer
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IDZ	Institut deutscher Zahnärzte
IgM / IgG	Immunglobulin M und G
IL	Interleukin
IFN	Interferon
KZBV	Kassenzahnärztliche Bundesvereinigung

LTH	Leukotoxische Hypercitruinierung
LtxA	Leukotoxin A
MMP	Matrix Metalloproteinase
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MTX	Methotrexat
NET	Neutrophil extracellular trap
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
n.s.	nicht signifikant
OR	Odds Ratio
p	Signifikanz
PA	Parodontitis
PAD	Peptidylarginindeiminase
PD	Pocket depth
PESA	Periodontal epithelial surface area
P.g.	Porphyromonas gingivalis
PGE	Prostaglandin E
P.i.	Prevotella intermedia
PISA	Periodontal inflammation surface area
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PPAD	Bakterielle Peptidylarginindeiminase
PTPN22	Tyrosin-protein-phosphatase non-receptor type 22
RA	Rheumatoide Arthritis
RANK	Receptor activator of NF κB
RANKL	Receptor activator of NF κB Ligand
RANTES	Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and secreted
RCLB	Red cell Lysis Buffer
RF	Rheumafaktor
RSA	Rezession surface area
SD	Standardabweichung
SDS-Lsg	Sodium Dodecyl Sulfat Lösung 10%
SE	Shared Epitope
STR	Abkürzung für Waschlösung
SSO-PCR	Sequence specific oligonucleotide polymerase chain reaction
SSP-PCR	Sequence specific primer polymerase chain reaction
T.d.	Treponema denticola
T.f.	Tanerella forsythia
TH <sub>2</sub> -Zellen	T-Helfer-Zellen

TNF            Tumor Nekrose Faktor  
UV/Vis        Spektrometer

# 1. Einleitung

Bisher ist belegt, dass Assoziationen sowohl zwischen Parodontitis (PA) und Diabetes mellitus [76, 120] als auch zu koronaren Herzerkrankungen [31, 37, 61, 76] bestehen. Außerdem gibt es Hinweise, dass ein erhöhtes Schlaganfallrisiko [57], Osteoporose bei Frauen [10, 108], Frühgeburten [76] und das metabolische Syndrom [85, 112] mit einer PA assoziiert sind. Seit etwa 40 Jahren [32] wird eine Verbindung zwischen der Rheumatoiden Arthritis (RA) und PA beschrieben und erforscht [11, 18, 22, 36, 40, 80, 101].

In der vorliegenden Studie soll der Zusammenhang zwischen der PA und der RA auf klinischer sowie genetischer und mikrobieller Ebene hin untersucht werden. Mittels parodontaler Untersuchungen und speziellen Laborverfahren zur Bestimmung der bakteriellen DNA, der Humanen Leukozyten Antigene (HLA-Merkmale) und der citrullinierten Antikörper wurde beleuchtet, ob ein möglicher kausaler Zusammenhang zwischen PA bzw. parodontalen Leitkeimen und der Bildung von Autoantikörpern gegen citrullinierte Peptide besteht und welche weiteren Faktoren (Rauchen, Geschlecht, HLA-DRB1\* Allele) hier eine Rolle spielen könnten. In vielen epidemiologischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass unter Patienten mit PA die Prävalenz der RA über der der Normalbevölkerung lag [84, 110]. Klinische Parameter der PA innerhalb der RA-Gruppe sind signifikant mit Anti Citrullinated Peptide Antibodies (ACPAs) assoziiert im Vergleich zu Probanden ohne RA. ACPAs können bereits Jahre vor der eigentlichen Diagnose der RA bestimmt werden [51, 95].

Ebenso konnten Nachweise erbracht werden, dass Patienten mit einer bestehenden RA signifikant häufiger eine PA entwickeln bzw. aufweisen [22, 40, 73, 99]. Dies stellt sich in erhöhten Sondiertiefen, mehr Attachmentverlust und höheren Bakterienzahlen im Vergleich zu Kontrollprobanden ohne RA dar [99, 101]. Des Weiteren ist ein erhöhter Attachmentverlust bei RA-Probanden mit erhöhten ACPA-Werten assoziiert [26].

RA und PA sind chronischer und multifaktorieller Natur. Mehrere gemeinsame Risikofaktoren wie das Rauchen oder die Ernährung spielen eine Rolle. Besonders die genetische Prädisposition hat bei beiden Erkrankungen einen wichtigen Einfluss. Zunehmend stehen auch HLA-Merkmale im Mittelpunkt der Untersuchungen [45, 116].

Patienten, die ein oder zwei HLA-DRB1\*04-Allele aufweisen, neigen häufiger dazu eine RA oder eine PA zu bekommen [24, 33].

Ursächlich für die PA sind Bakterien [54, 66, 71]. Diese könnten auch bei der RA von Bedeutung sein. Die Vermutung ist, dass die parodontalen Bakterien einen Einfluss auf die ACPA-Bildung haben, indem sie in der Lage sind, humane Peptide zu citrullinieren und dadurch Autoimmunprozesse getriggert werden können. Diese Hypothese könnte mit für den

epidemiologisch gezeigten Zusammenhang zwischen PA und RA sein. Das Ziel der vorliegenden Studie bestand nun darin zu untersuchen, ob die Bildung von Antikörpern gegen citrullinierte Peptide zum Schweregrad der Parodontitis oder der Kolonisation von bestimmten parodontalen Leitkeimen in der subgingivalen Plaque assoziiert ist. Dabei sollten anhand von multivariaten Vergleichen u.a. auch die Expression bestimmter HLA-DRB1\*-Merkmale sowie die antirheumatische Medikation mit berücksichtigt werden.

# 1.1 Parodontitis

## 1.1.1 Epidemiologie

Vergleicht man die Deutsche Mundgesundheitsstudie IV (DMS) von 2006 mit der Deutschen Mundgesundheitsstudie V von 2016 am Beispiel der parodontalen Erkrankungen, zeichnet sich ein rückläufiger Trend in der Prävalenz der Parodontitis ab (Abb. 1). Sowohl die jüngeren Erwachsenen (35-44 Jährige) als auch die jüngeren Senioren (65-74 Jährige) weisen weniger häufig schwere und moderate Parodontalerkrankungen auf. Waren es 2006 bei den jüngeren Erwachsenen noch 17,4% mit einer schweren PA, so sind es 2016 nur noch 8,3%. Ähnliches ist bei den jüngeren Senioren zu erkennen. 2006 wiesen 44,1% eine schwere PA auf und 2016 waren es noch 19,8%.

Auch die moderaten Parodontitiden reduzierten sich bei den 35-44-Jährigen von 53,6% auf 43,4% und bei den 65-74 Jährigen von 47,9% auf 44,8% [42].

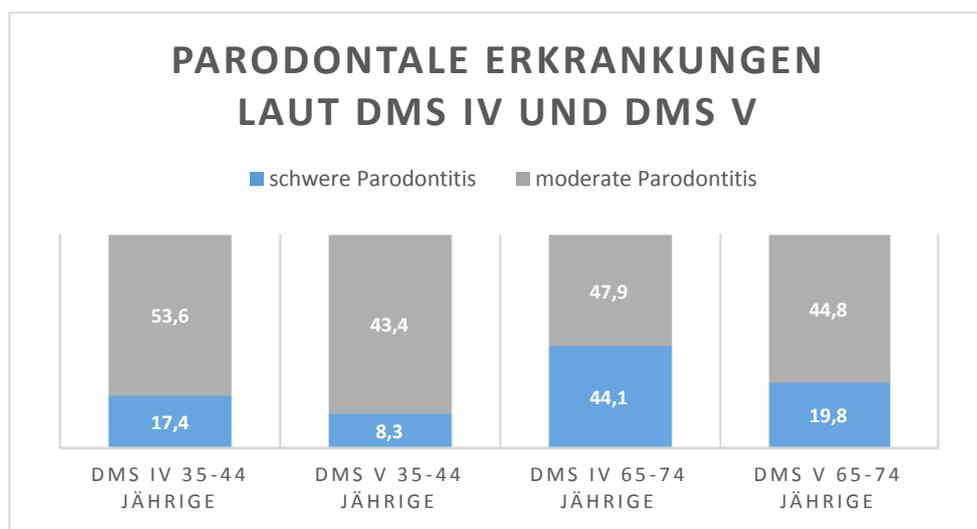


Abbildung 1: Prävalenz der Parodontitis 2006 (DMS IV) und 2016 (DMS V)

## 1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Das Parodontium oder der Zahnhalteapparat ist das Grundgerüst für die Verankerung der Zähne. Abgeleitet wird der Begriff von „par“ = um, herum und „odontos“ = der Zahn.

Die Hauptbestandteile sind die Gingiva, das Wurzelzement, der Alveolarfortsatz und das Desmodont.

Die Gingiva kann unterteilt werden in die freie marginale, die befestigte (attached) und die interdentale Gingiva. Dabei befindet sich der Übergang zwischen der freien und der befestigten

Gingiva auf der Höhe der Schmelz-Zement-Grenze. Die gestipelte freie Gingiva besitzt eine feste Konsistenz, ist circa 0,8-2,5 mm breit und läuft koronal Richtung Zahnkrone flach aus. Ebenso weist die gestipelte, befestigte Gingiva eine feste Konsistenz und eine Breite zwischen 1-9 mm auf. Mittels eines Netzes aus unterschiedlich strukturierten Bindegewebsfasern ist sie mit dem Alveolarknochen fest verwachsen und nicht beweglich im Gegensatz zu der ins Vestibulum reichenden Mukosa bzw. Schleimhaut.

Die dritte Form der Gingiva, die interdentale Gingiva, liegt zwischen den Zähnen und bildet die Papille aus. Die Form der Zähne bestimmt die Breite der interdentalen Gingiva.

Das Wurzelzement bedeckt die Oberfläche der Zahnwurzeln und entspricht in seiner Härte der des menschlichen Knochens. Der anorganische Anteil macht etwa 65 Gew.%, der organische Teil 23 Gew.% und der Wasseranteil 12 Gew.% aus [87]. Etwa 90 % der organischen Substanz sind Kollagenfasern, die der beweglichen Aufhängung der Zähne in ihren Alveolen dienen.

Der Alveolarfortsatz kleidet die Zahnfächer aus und wird permanent durch Osteoblasten, -klasten und -zyten remodelliert. Die Alveolen sind durch eine dünne Innenkortikalis bedeckt. Diese weist zahlreiche kleine Perforationen auf, damit Blutgefäße (Volkman´sche Kanäle) und Nerven das Desmodont ernähren und versorgen können.

Das Desmodont kleidet den Spalt zwischen Zahn und Alveolarknochen aus. Es ist reich vaskularisiert und besteht aus zell- und faserreichem Bindegewebe. Etwa 1-2 mm unterhalb der Schmelz-Zement-Grenze endet es und geht in die befestigte Gingiva über. Durchschnittlich ist der Parodontalspalt circa 0,25 mm breit, wobei dieser in der Breite apikal und koronal variieren kann und gewöhnlich eine Sanduhrform darstellt. Bei hoher funktioneller Belastung kann sich die Breite des Spalts erhöhen. Dagegen nimmt die Breite des Spalts gewöhnlich im voranschreitenden Alter ab. Dann spricht man von einer Verwachsung des Zahnhartgewebes mit dem Alveolarknochen, einer sogenannten Ankylose.

Die Entwicklung einer Parodontitis ist multifaktorieller Natur. Unter anderem kommt es anfangs zum Entstehen eines physiologischen Biofilms [27]. Dieser wird definiert als Plaqueakkumulation von Bakterien, extrazellulären bakteriellen Makromolekülen und Bestandteilen des umgebenden Mediums auf Oberflächen, die in einem wässrigen Medium verweilen. Letztendlich bildet der Biofilm eine Barriere gegen Abwehrmechanismen und antimikrobielle Medikamente (Antibiotika, Mundspülungen).

Der Biofilm ist mit verschiedenen Bakterienspezies besiedelt. So gibt es die primären Kolonisierer, die überwiegend fakultativ anaerob grampositive Bakterien sind, wie *Eubacterium nodatum* und *Campylobacter rectus* [14, 28, 109] und sich in den ersten 24 Stunden nach der Plaquebildung anheften. Des Weiteren nimmt die Anzahl gramnegativer Kokken sowie Stäbchen zu. Durch Vermehrung und Anheftung neuer Bakterien werden zusätzlich

extrazelluläre Polysaccharide produziert und das Volumen des Biofilms nimmt zu. Die sekundären Kolonisierer kommen nach durchschnittlich drei Tagen hinzu. Es sind gramnegative Bakterien wie *Veillonella* und *Fusobacterien*. Man spricht hier von einer sogenannten bakteriellen Aggregation. Nach weiterem Verweilen der Mikroorganismen und deren beständiger Fortpflanzung verändert sich der Sauerstoffgradient in der Tiefe des Biofilms. *Spirillen* und *Spirochäten* lassen sich nach etwa ein bis zwei Wochen nachweisen. Socransky modifizierte 1979 die Henle-Koch'schen Postulate, die die Eigenschaften von Mikroorganismen beschreiben, die vorhanden sein müssen, um sie als Krankheitserreger zu bezeichnen [105]. In Bezug auf die Ätiologie der Parodontitis lauten diese folgendermaßen:

- „1) Assoziation: Der Erreger muss in aktiven „Sites“ in höherer Zahl als in nichtaktiven gefunden werden.
- 2) Elimination: Die Elimination des Erregers sollte die Progression der Erkrankung aufhalten
- 3) Wirtsantwort: Die zelluläre oder humorale Immunantwort sollte auf die spezifische Rolle des Erregers bei der Erkrankung hinweisen.
- 4) Virulenzfaktoren: Der Erreger sollte Virulenzfaktoren besitzen, die für die Initiation und Progression relevant sind.
- 5) Tierversuch: Die Pathogenität des Erregers im Tierversuch muss darauf schließen lassen, dass sie am Menschen eine Parodontitis auslösen können.“ [106]

Durch Socransky et al. wurden 13261 Plaqueproben von 185 Probanden mikrobiologisch

untersucht und die Beziehungen innerhalb der subgingivalen Bakterienspezies in Form von Komplexen schematisch in Abb.2 dargestellt [29, 107].

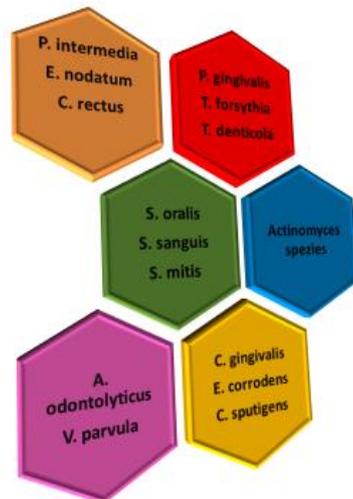


Abbildung 2: Einteilung der Bakterienkomplexe nach Socransky et al. 1998

Bakterien des roten Komplexes sind aggressiv und nehmen einen hohen Stellenwert in der Ätiologie, der Diagnostik und dem Therapieverlauf der Parodontitis ein [28]. Dagegen sind die Bakterien der anderen Komplexe weniger pathogen. So ist der orange Komplex ein Brückenkomplex, der die Voraussetzungen schafft, dass sich Bakterien des roten Komplexes etablieren können.

Wichtige parodontale Leitkeime sind *P.g.* und *Tannerella forsythia* (*T.f.*). Sie kommen seltener bei parodontal Gesunden vor und treten vermehrt bei parodontalen Läsionen auf [28]. Ihre Eradikation führte in den meisten Fällen zu günstigen Therapieergebnissen, jedoch wurden sie oft in rezidivierenden Läsionen gefunden. Mithilfe verschiedener Studien konnte eine Reihe von Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren entschlüsselt werden. So synthetisiert *P.g.* die in Abb. 3 dargestellten Kollagenasen, Proteasen, Phospholipasen und induziert ebenfalls die Zytokinproduktion in verschiedenen Wirtszellen.

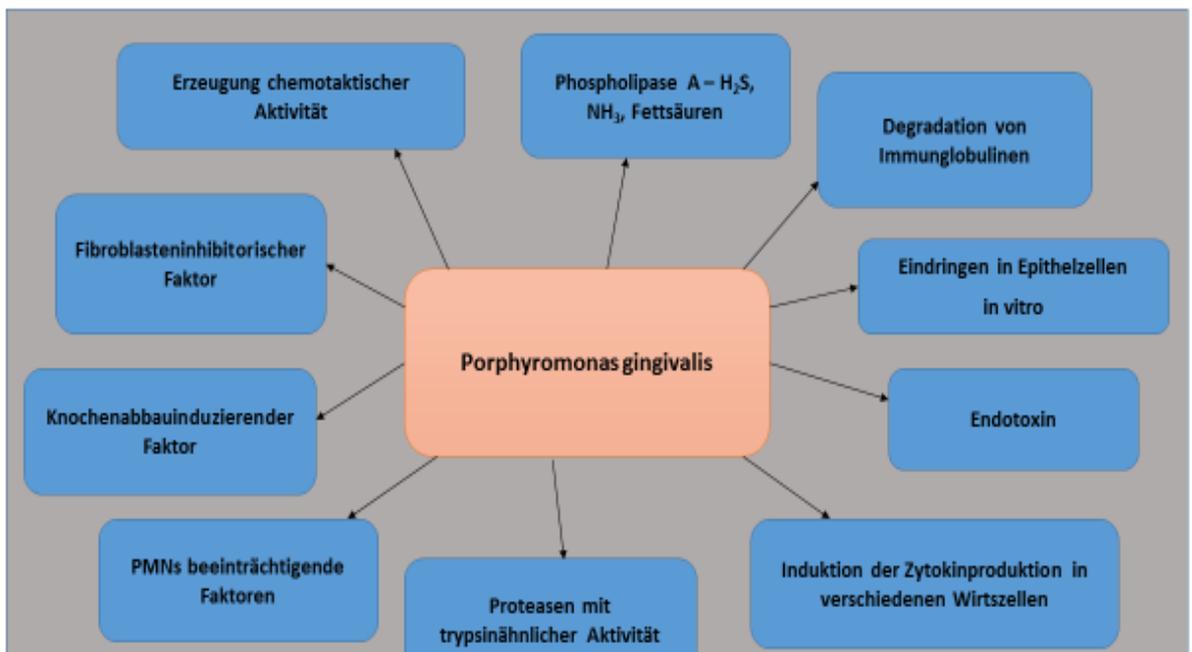


Abbildung 3: Virulenzfaktoren von *Porphyromonas gingivalis*

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*) wird häufig bei aggressiven Parodontitiden nachgewiesen, kann aber auch bei Individuen mit chronischer PA oder auch ohne PA [14] nachgewiesen werden. Deshalb ist ein mikrobiologischer Test nicht ausreichend, um chronische und aggressive Formen zu unterscheiden und aktuell bestehen keine eindeutigen Verteilungsmuster des parodontalen Leitkeims bezogen auf aggressive oder chronische Parodontitiden [Radek et al. 2004]. *A.a.* produziert selbstständig Kollagenasen, Leukotoxine

(LtxA)[52], Epitheliotoxine [49], Knochenabbau induzierende Faktoren und induziert unter anderem die Zytokinproduktion von Makrophagen (Abb.4).

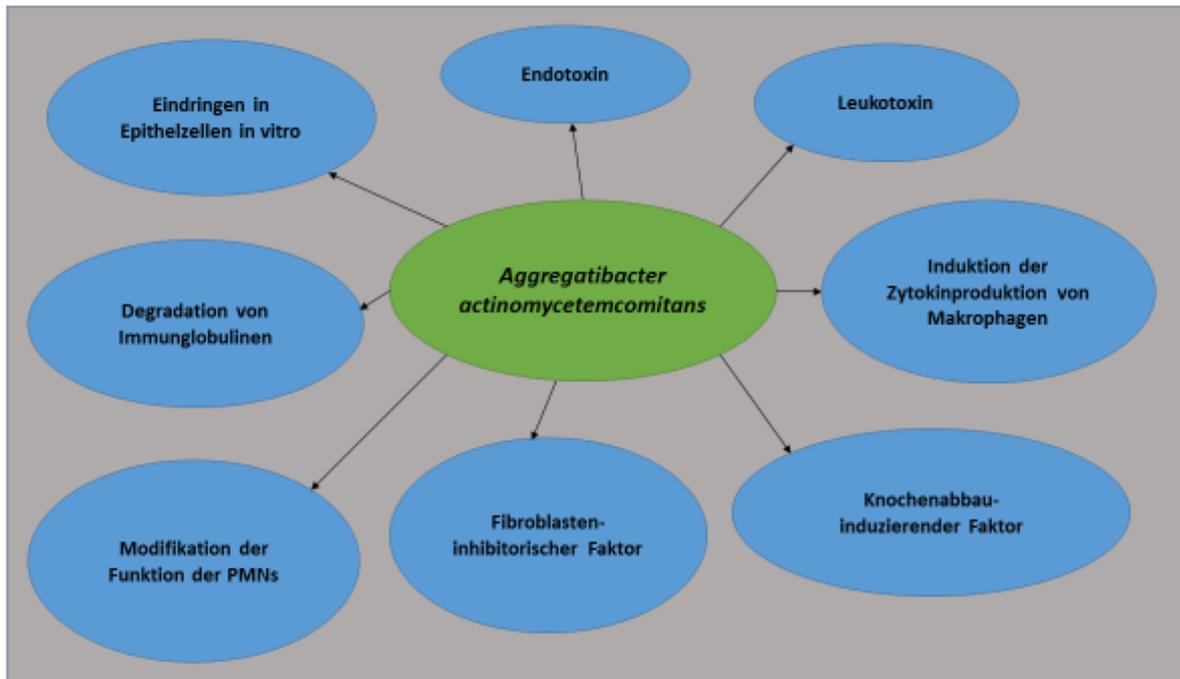


Abbildung 4: Virulenzfaktoren von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Um die Entwicklung einer PA nachvollziehen zu können, teilt man die Pathogenese in vier Phasen ein: **Initiale**, **frühe**, **etablierte** und **fortgeschrittene** Phase. Die ersten drei genannten verweisen auf eine Gingivitis. Die letztgenannte leitet den Übergang zur PA ein. Nach etwa 24 Stunden der beginnenden Plaqueakkumulation beginnt die **initiale Phase** mit einer Vasodilatation der Arteriolen, Venolen und Kapillaren des dentogingivalen Plexus. Folgend tritt eine Exsudation von Flüssigkeit und Proteinen (erhöhte Sulkusflüssigkeit) in das Gewebe ein. Somit können Bakterien und deren Produkte hinausgeschwemmt werden. Innerhalb der nächsten zwei bis vier Tage migrieren neutrophile Granulozyten und Monozyten/Makrophagen in das subepitheliale Bindegewebe. Dort wird mitunter von Makrophagen eine hohe Anzahl an Entzündungsmediatoren freigesetzt. Darunter sind vor allem folgende zu nennen: Interleukin (IL) 1 $\beta$ , -6, -10, -12, TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>, MMPs, IFN- $\gamma$  [17].

Mittels verschiedener Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, ELAM-1) können Leukozyten durch die Gefäßwände hindurchtreten (Diapedese) [8, 93]. Aufgrund des Konzentrationsgradienten, der durch chemotaktische Reize ausgelöst wird, wandern die Leukozyten zum gingivalen Sulkus. Dort phagozytieren und zerstören sie die Bakterien.

Die Lymphozyten wiederum verbleiben im Gewebe und sorgen für die humorale Immunreaktion, indem sie über Zwischenstufen Antikörper zur Abwehr pathogener Prozesse

produzieren.

Zum Übergang von der initialen zur **frühen Läsion** kommt es nach etwa sieben Tagen. Zu erkennen ist das an den hohen Zahlen der neutrophilen Granulozyten, der subepithelialen Leukozyten und den Makrophagen. Allesamt exprimieren Gefäßzelladhäsionsmoleküle sowie verschiedene Zytokine und Chemokine (**Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted** [RANTES], MMPs, PGE<sub>2</sub>). Zu nennen sind MMP-8 [65, 79], IL-8 [21], IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  [56], IL-33 [94]. Es kommt zu einer Veränderung des lokalen Milieus. Weitere Entzündungszellen werden angezogen und Entzündungsmediatoren produziert. Diese unterstützen den Abbau von Kollagenen durch erhöhte Raten an Kollagenasen und führen zur Auflockerung der Struktur in lateraler und apikaler Richtung. Im weiteren Verlauf aktivieren die Makrophagen die T-Lymphozyten [58], welche zu T-Effektorzellen differenzieren. Diese produzieren Zytokine, die zur B-Zell-Differenzierung beitragen und somit über die Plasmazellbildung die Antikörperproduktion fördern. Antikörper schützen den Organismus vor körperfremden Zellen und Stoffwechselprodukten. Sie führen durch Bindung der Mikroorganismen zur Verklumpung und im weiteren Schritt werden diese durch das Komplementsystem mittels Markierung und Lyse zur Phagozytose durch neutrophile Granulozyten freigegeben.

Wird die **etablierte Phase** nach circa vier Wochen erreicht, befindet sich das Individuum in dem Bereich der chronischen Gingivitis. Dabei nimmt die Anzahl der Plasmazellen zu, das Saumepithel proliferiert, Kollagen geht verloren, das Epithel wird dünner und fragiler, sodass kein epitheliales Attachment zum Zahn mehr gegeben ist und sich sogenannte „Taschen“ ausbilden können. Jene lassen ungehindert Leukozyten einwandern und neigen zur Ulzeration. Bis zu diesem Zeitpunkt ist eine restitutio ad integrum möglich, da sich die Erkrankung bisher auf die Gingiva bezieht und noch nicht den eigentlichen Zahnhalteapparat betrifft. Die Zeitdauer dieser Phase ist bei jedem Individuum unterschiedlich lang. Verläuft sie mit weitergehender Progression, tritt das Stadium der **fortgeschrittenen Läsion**, der Parodontitis ein.

Unterschiedliche Einflüsse spielen dabei eine Rolle. Genannt seien die supragingivale Plaque, der subgingivale Biofilm sowie die wirtseigene Immunantwort und deren Beeinflussung durch weitere Faktoren wie Rauchen [15], Allgemeinerkrankungen, genetische Faktoren und die häusliche Mundhygiene.

Ist eine PA diagnostiziert, so sind Gingiva, Desmodont, Alveolarknochen und das Wurzelzement betroffen. Die Folge ist ein voranschreitender Stützgewebeverlust. Dabei unterscheidet man verschiedene Formen der Parodontitis nach Lokalität, Schwere und Verlauf. Zellulär sind vor allem Plasmazellen vorzufinden. Des Weiteren breitet sich die subgingivale Plaque apikal aus und triggert den Attachmentverlust sowie den Knochenabbau. Letztgenannter Vorgang wird durch aktivierte Osteoklasten hervorgerufen und durch die Schlüsselregulatoren RANK und RANKL (**R**eceptor **a**ctivator of **NF- $\kappa$ B**; **R**eceptor **a**ctivator of **NF- $\kappa$ B**

Ligand).kontrolliert [58, 119].

Einen hohen Stellenwert übernehmen dabei die Humanen-Leukozyten-Antigene (HLA-Merkmale). Diese befinden sich auf fast allen kernhaltigen Zellen, präsentieren den Lymphozyten diverse Antigene und tragen somit zur adaptiven Immunabwehr bei. Folgend werden pathogene Peptide in Makrophagen oder Langerhans-Zellen prozessiert und die Peptidstückchen an die HLA-Moleküle gebunden. An der Zelloberfläche werden diese den T-Zellen präsentiert, damit jene sich mit ihrem T-Zell-Rezeptor daran binden können. Aus den naiven T-Zellen werden Effektorzellen: Th1-, Th2- oder zytotoxische Zellen. HLA-Merkmale und ihre Assoziationen zur PA wurden vor einigen Jahren untersucht. Dabei wurden Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis untereinander und mit parodontal gesunden Kontrollprobanden verglichen. Es resultierte, dass weibliche Probanden mit aggressiver Parodontitis signifikant häufiger HLA-A\*68/\*69-positiv und dass weibliche Probanden mit chronischer Parodontitis signifikant häufiger HLA-DQB1\*06-positiv sind. Somit stellt das Geschlecht einen Co-Faktor dar [88]. In einer weiteren Studie, in der Patienten mit juveniler Arthritis mit parodontal erkrankten Patienten verglichen worden sind, kam man zu dem Ergebnis, dass HLA-DRB3 häufiger bei Frauen mit juveniler Arthritis und bei Frauen mit chronischer Parodontitis aufgetreten ist. Eine Geschlechtsabhängigkeit ist möglich [89]. Ebenso konnte bei einem Tierversuch mit Mäusen gezeigt werden, dass weibliche Mäuse häufiger eine PA entwickelten als männliche Mäuse [118].

Schlussfolgernd ist die PA eine opportunistische Infektionserkrankung, hervorgerufen durch eine Dysbiose bestimmter parodontalpathogener Leitkeime. In der Pathogenese der Parodontitis spielt die Wirtsreaktion eine entscheidende Rolle. Warum eine Parodontitis individuell sehr unterschiedlich verläuft, kann bis heute nicht eindeutig geklärt werden. Jedoch haben andere Umstände, wie Allgemeinerkrankungen [112], die Pathogenität des bakteriellen Biofilms, diverse Risikofaktoren wie das Rauchen und die Mundhygiene sowie der genetische/epigenetische Hintergrund einen wesentlichen Einfluss.

Das klinische Bild der Parodontitis kann individuell differieren. Typisch sind erhöhte Sondiertiefen, Attachmentverlust und Abbau des Alveolarknochens. Daneben können Blutung auf Sondierung (BOP), Stippelingverlust, Farbveränderungen der Gingiva, Foetor ex ore, Furkationsbeteiligung und Zahnlockerung imponieren [101].

## 1.2 Rheumatoide Arthritis

Die RA ist eine chronische Erkrankung, die dem rheumatischen Formenkreis zugeordnet ist. Speziell sind die Finger- und Zehengrundgelenke von der Entzündung betroffen. Einher geht die progrediente Inflammation mit systematischem Knorpel- und Knochenabbau und teilweise schweren Knochendestruktionen. Etwa 1% der Gesamtbevölkerung leidet unter dieser Krankheit und circa 50-60 Frauen bzw. 25-30 Männer pro 100.000 Einwohner erkranken jedes Jahr neu [7]. Der Beginn manifestiert sich zumeist im Alter von 55-65 Jahren, obwohl auch bereits Kinder erkranken können.

Im frühen Stadium der RA kommt es zur vermehrten Einwanderung von Immunzellen. Dabei handelt es sich überwiegend um Neutrophile, Monozyten, T- und B- Zellen. Zusätzlich erfolgt eine Hyperplasie durch fibroblastenähnliche Synoviozyten. Des Weiteren werden vermehrt neue Blutgefäße gebildet, eine sogenannte Angiogenese, wodurch zusätzlich Immunzellen und Entzündungsstoffe angeschwemmt werden können. Durch erhöhte Produktionen proinflammatorischer Mediatoren, wie IL-1 und TNF- $\alpha$  wird die Pannusbildung gefördert [23]. Der Pannus bezeichnet das hyperplastische entzündete Gewebe, welches aus der Synovialmembran hervorgegangen ist. Bereits hier spricht man von einer etablierten RA. Aufgrund des uneingeschränkten Wachstums des Pannus kommt es zur Ausschüttung eigens gebildeter Proteinasen, wie z.B. Matrixmetalloproteinasen, die zur Degeneration des Knorpelgewebes führen und über mehrere Zwischenstufen die Osteoklasten aktivieren können [46, 63]. Diese führen im weiteren Verlauf zur Resorption des Knochens und letztendlich zur Zerstörung des Gelenks [104].

Im Anfangsstadium fällt ein symmetrischer Befall der Fingergrundgelenke beider Hände auf. Teilweise können auch die Zehengrundgelenke der Füße betroffen sein. Zusätzlich kommt es zu Gelenkschwellungen als äußeres Zeichen. Betroffene Personen klagen über eine mindestens 30 Minuten andauernde morgendliche Immobilität bzw. Steifigkeit der betroffenen Gelenke. Im weiteren Verlauf vermehrt sich das Bindegewebe in den entzündeten Gelenken und der Flüssigkeitseinstrom nimmt zu. Aufgrund dessen stülpt sich die Gelenkkapsel nach außen und eine eingeschränkte Beweglichkeit ist die Folge.

Schreitet die Erkrankung weiter voran, können Fehlstellungen der Fingergelenke resultieren, als Beispiel ist die Schwanenhalsdeformation anzuführen.

Bei fortführender Progression werden die Sehnenscheiden zerstört und im Anschluss die Fingerknochen. In Ausnahmefällen können auch Organe wie Herz und Lunge von der rheumatischen Erkrankung betroffen sein, wobei dies heutzutage durch rechtzeitig eingeleitete Therapiemaßnahmen vermieden werden kann.

Die Diagnosestellung umfasst eine Anamnese und eine körperliche Untersuchung, bei der speziell die Art und Dauer der Schmerzen erfragt werden. Es schließt sich eine Dokumentation der betroffenen Gelenke, der Gelenkschwellungen sowie möglicher Morgensteifigkeit und/ oder Tagesmüdigkeit an. Daraufhin wird eine Blutabnahme mit Auswertung der Laborparameter vorgenommen. Wichtige Parameter sind die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG/ ESR) und das C-reaktive-Protein (CRP) als Entzündungsparameter und IgM-Rheumafaktoren (RF) sowie Antikörper gegen zyklisch citrullinierte Peptide (ACPA) [75]. Mit Hilfe regelmäßiger bildgebender Verfahren im Abstand von ein bis zwei Jahren können erosive Gelenkveränderungen dargestellt werden. Essenziell sind Röntgenaufnahmen der Hände und Füße. Darüber hinaus sind Aufnahmeverfahren wie MRT, Gelenksonographie und Szintigrafie bei Bedarf möglich.

Seit dem Jahr 2010 sind durch das American College of Rheumatology (ACR) und die European League Against Rheumatism (EULAR) gemeinsame Kriterien zur Diagnosestellung der RA veröffentlicht worden (Abb.5). Diese zielen vor allem darauf ab, bereits frühe Formen der RA ausfindig zu machen und möglichst zeitnah medikamentös zu behandeln.

Hierbei gibt es vier Kategorien mit jeweiligen Untergliederungen, die mit unterschiedlichen Punktzahlen bewertet werden. Nach Addieren der zutreffenden Punktzahlen und einem Wert  $\geq 6$  Punkten liegt die Diagnose einer RA vor:

<b>A</b>	<b>Gelenkbeteiligung</b>	<b>Punktzahl</b>
	1 großes Gelenk	0
	2-10 große Gelenke	1
	1-3 kleine Gelenke	2
	4-10 kleine Gelenke	3
	> 10 Gelenke	5
<b>B</b>	<b>Serologie</b>	
	negativer RF und negative ACPA	0
	niedrig positiver RF <i>oder</i> niedrig positive ACPA	2
	hoch positiver RF <i>oder</i> hoch positive ACPA	3
<b>C</b>	<b>Akute-Phase-Proteine</b>	
	normales CRP und normale ESR	0
	abnormales CRP und abnormale ESR	1
<b>D</b>	<b>Dauer der Symptome</b>	
	< 6 Wochen	0
	$\geq 6$ Wochen	1

Abbildung 5: Kriterien zur Diagnosestellung der Rheumatoiden Arthritis nach EULAR/ ACR

Differentialdiagnostisch sollten von der RA die Arthrose (chronisch degenerative Gelenkveränderung mit Knorpelabbau), die Spondylitis ankylosans (Morbus Bechterew) und der Lupus erythematodes (Autoimmunerkrankung aus der Gruppe der Kollagenosen) abgegrenzt werden.

Durch die Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh) wurde auf der Grundlage der oben genannten ACR/EULAR – Kriterien die S1-Leitlinie zur Behandlung der RA in Abhängigkeit von aktuellen wissenschaftlichen Beiträgen erstellt.

Standard- und Basistherapiemittel der ersten Wahl ist Methotrexat (MTX), das zu der Gruppe der Disease modifying anti rheumatic drugs (DMARD) gehört. Es wird anfangs in einer Dosierung von 20-30 mg/ Woche gegeben und mit einem Glukokortikoid kombiniert. Dabei wird zumeist Prednisolon verabreicht mit Dosen < 10 mg/ Tag. Die antientzündliche Wirkung beider Medikamente sowie der krankheitsmodifizierende Effekt des Prednisolons haben eine positive Wirkung auf den Krankheitsverlauf und die Knochendegeneration.

Im Abstand von vier bis zwölf Wochen werden Kontrolltermine mit den Patienten vereinbart, um die Akzeptanz des Körpers auf die verschriebenen Therapeutika zu evaluieren. Dies geschieht über ein Monitoring mit validierten Gelenkscores (DAS, DAS28: Disease activity score). Sollte die beschriebene Therapie nicht ausreichend sein, ist eine Kombinationstherapie mehrerer DMARDs möglich. Als sekundäre Basistherapeutika werden Leflunomid (Immunsuppressivum) oder Sulfasalazin (Entzündungshemmer) empfohlen.

Ist nach sechs Monaten keine Remission der Erkrankung bzw. sogar eine Progression zu verzeichnen, kommen Biologika zum Einsatz. Das sind Medikamente, die biotechnologisch und mit vitalen Zellen hergestellt und per infusionem bzw. per injectionem dem Körper zugeführt werden. Diese können in Kombination mit MTX gegeben oder bei Unverträglichkeit auf MTX sogar als Monotherapie angewendet werden. Dies gilt für Tocilizumab und Abatacept. Beide sind TNF- $\alpha$ -Hemmer. Die Datenlage für den IL-1 Rezeptor-Antagonisten Anakinra weist eine schwächere Wirksamkeit gegenüber anderen Biologika auf. Folgend ist davon abzusehen IL-1-Rezeptor-Antagonisten als primäre Biologika anzuwenden.

Stellt sich eine Remission ein, die bei mehrfacher Kontrolle Bestand hat, kann der Versuch einer Reduktion der Basistherapeutika vorgenommen werden.

Ätiologisch handelt es sich bei der RA um ein multifaktorielles Geschehen, bei dem sowohl endogene als auch exogene Faktoren einen Einfluss haben.

Der Faktor Geschlecht soll bei der Pathogenese der Erkrankung eine Rolle spielen. Vor allem Frauen erkranken dreimal häufiger an einer RA als Männer [40].

Auch der Risikofaktor Rauchen trägt entscheidend zur Pathogenese bei. Klareskog et al. haben in ihrer Arbeit von 2008 [46] den möglichen Zusammenhang zwischen dem Rauchen und der

Entstehung einer RA beschrieben. So lautet ihre Vermutung, dass starkes Rauchen einen erhöhten Einstrom von immunmodulierenden Zellen in der Lunge zur Folge hat. Die Toxine aus dem Rauch würden vor allem die neutrophilen Zellen aktivieren und zur Apoptose anregen. Durch die Zerstörung der Zellen würden die zelleigene humane Peptidylarginindeiminase (PAD4) stimuliert und Proteine in der Lunge citrulliniert werden. Menschen, die zusätzlich das HLA-DRB1\*04-Allel tragen und PTPN22-positiv sind, haben ein bis zu 20-fach erhöhtes Risiko für RA. PTPN22 (Tyrosin-protein phosphatase non-receptor type 22) stellt einen negativen Regulator des T-Zell-Rezeptors dar. Mittels direkter Dephosphorylierung wird die Funktion des Rezeptors eingeschränkt.

Die citrullinierten Proteine könnten durch antigen-präsentierende Zellen (APC) über HLA-DRB1\*04 den T-Zellen präsentiert werden. Daraufhin werden diese stimuliert und würden im weiteren Verlauf wiederum die B-Zellen anregen, dass sie sich in Plasmazellen umwandeln und Antikörper bilden, sogenannte ACPAs.

Auf genetischer Ebene hat das HLA-DRB1\*04-Allel den größten Einfluss auf die Entstehung einer RA, gefolgt von einem Polymorphismus auf dem PTPN22-Gen. HLA-Merkmale nehmen eine wichtige Funktion bei der Immunabwehr ein. Sie befinden sich auf der Oberfläche kernhaltiger Zellen und tragen zur Unterscheidung zwischen körpereigenen und -fremd bei.

Holoshitz erläutert in seinem Review von 2010 das HLA-DRB1-SE. Dabei handelt es sich um das Shared Epitope (SE), das eine Sequenz aus fünf Aminosäuren darstellt und sich auf der  $\beta$ -Kette des HLA-DRB-Allels befindet. Typische SE-Allele sind: HLA-DRB1\*01, \*04, \*10, \*14. Ihre Hypothese beinhaltet, dass ca. 80% der RA-Patienten SE-positiv und ca. 20% SE-negativ seien. Des Weiteren sollen Probanden mit dem positiven SE-Allel auch häufiger ACPA-positiv sein. Schlussfolgernd schreibt er, dass das HLA-DRB-SE-Allel die wichtigste Gen-Region in Bezug zur ACPA-Bildung sei [38].

Der zweitwichtigste genetische Einflussfaktor ist das PTPN22 620W. Es ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase und kommt ausschließlich in hämatopoetischen Zellen vor. Dabei dephosphorylieren diese Enzyme ihre Substrate, entfernen also ein Phosphat. Hinzu kommt, dass der PTPN22-Positive Patient auch häufiger ACPA-positiv ist. Eine starke Assoziation besteht zwischen HLA-DRB-SE, PTPN22, Rauchen und der ACPA-Bildung [38, 45, 72].

Es ist physiologisch, dass in der Synovialflüssigkeit bei Entzündungsprozessen Peptide durch eine Deiminase citrulliniert werden. Dabei entsteht aus dem Argininrest unter Calcium-Zufuhr Citrullin, welches eine andere Struktur und Ladung aufweist. Der Körper sieht die citrullinierten Peptide jedoch bei größerer Ansammlung als fremd an. Es folgt die Phagozytose der citrullinierten Peptide durch Monozyten und Makrophagen. Über ihre MHC-Komplexe präsentieren sie partiell die citrullinierten Peptide auf ihrer Oberfläche. Erkennen die T-Zellen mittels T-Zell-Rezeptor die Antigene, kommt es kaskadenartig zur Aktivierung der B-Zellen. Es schließt sich deren Umwandlung in Plasmazellen an und die anschließende Bildung der

Antikörper gegen die citrullinierten Peptide bzw. Antigene. Folgend sind Antikörper gegen citrullinierte Peptide entstanden, sogenannte ACPAs.

## 1.3 Zusammenhang RA und PA

Der Zusammenhang zwischen RA und PA wird bereits seit vielen Jahren untersucht. 1968 erschien eine Studie von Helminen-Pakkala und beleuchtete parodontale Aspekte bei Patienten mit RA im Vergleich zu Patienten ohne RA. Die Studie stützte sich auf klinische und röntgenologische Untersuchungen [32].

Gegenwärtig sind folgende Fragen von besonderer Bedeutung: Wie kommt es zur ACPA-Bildung bzw. welches Antigen ist dafür verantwortlich? Wird durch äußere Faktoren über mehrere Jahre ein Antigen produziert? Oder könnten Bakterien anderer Erkrankungen, wie der PA zur Bildung citrullinierter Peptide beitragen und folglich die Pathogenese der RA triggern?

Verschiedene Studien beleuchteten bereits, dass eine PA häufiger bei RA-Erkrankten vorkommt [22, 40, 73, 99]. Des Weiteren ist das Risiko, bei einer bestehenden PA an einer RA zu erkranken um das Vierfache erhöht im Vergleich zu Probanden ohne RA. Dies wiesen Lundberg et al. bereits 2008 nach.

Dabei ist der parodontale Leitkeim *P.g.* näher untersucht worden und konnte in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden [90]. Da *P.g.* dafür bekannt ist, über bestimmte Virulenzfaktoren, wie Lipopolysaccharide oder Gingipains zu verfügen, wurde auch herausgefunden, dass *P.g.* der einzige Parodontalkeim ist, der selbst eine PPAD produzieren kann, die zu über 80% der Struktur der humanen PAD entspricht [58]. Wegner et al., 2010 konnten in ihrer Studie nachweisen, dass der Wildtyp W83 von *P.g.* das humane Fibrinogen und die humane  $\alpha$ -Enolase citrullinieren kann. Es wird angenommen, dass diese citrullinierten Peptide die Hauptantigene für ACPAs darstellen [60]. Außerdem können bei 40-60% der RA-Patienten Antikörper gegen citrullinierte  $\alpha$ -Enolase nachgewiesen werden [117].

Lundberg [59] stellte die These auf, dass es bei einer bestehenden PA und einem Vorhandensein des Leitkeims *P.g.* über die PPAD zur Citrullinierung von Peptiden kommen kann. Daraufhin sollen Antikörper in der Mundhöhle gebildet werden. Diese könnten über die Blutbahn in gelenknahe Regionen wandern. Bei einer vorherrschenden Entzündung eines unbestimmten Gelenks ist es möglich, dass die vorher in der Mundhöhle gebildeten Antikörper nun die dortigen citrullinierten Peptide, die auf physiologischer Weise entstanden sind, binden und Immunkomplexe bilden. In der Konsequenz kommt es zu einer fortlaufenden und permanent unterhaltenden Inflammation der Gelenkregion. Die Toleranz des Immunsystems nimmt ab und

der Weg der Pathogenese einer RA ist somit geebnet.

Laugisch präsentierte in seiner Studie, dass sowohl bei 50 % der RA-Patienten mit einer PA als auch bei 48 % der Kontrollprobanden ohne RA, aber mit PA eine Citrullinierung von Peptiden stattfand. Innerhalb der RA-Gruppe konnte bei 69 % die Aktivität der humanen PAD und bei 58 % die der bakterielle PAD (PPAD) detektiert werden. Ebenso stellte sich heraus, dass 68 % der Patienten ohne RA eine Aktivität der humanen PAD und 50 % dieser Patienten eine Aktivität der bakteriellen PAD aufwiesen. Das Fazit war, dass PAD und PPAD zum einen bei RA-Patienten und zum anderen bei Patienten ohne RA, aber mit PA erhöht sind. Folgend könnten die Deiminasen die ACPA-Bildung fördern, vor allem bei immungeschwächten Menschen [55].

Marchant versuchte 2013 bei einer In-vitro-Studie nachzuweisen, dass die bakterielle PAD von *P.g.* die Citrullinierung zusätzlich pathologisch beeinflusst, während die humane PAD nur lokal in den Monozyten/ Makrophagen ansteigt. Das Resultat war, dass die PPAD nur in mononuklearen Zellen im Beisein von lebenden *P.g.* detektiert wurde. Folglich stiegen die extrazellulären Citrullinierungen an, aber die humanen PAD2 und PAD4 wurden nicht durch *P.g.* beeinflusst. Er schlussfolgerte, dass die PPAD zur Bildung citrullinierter Proteine im gingivalen Gewebe beiträgt, jedoch keinen Einfluss auf die PAD-Expression der Monozyten/ Makrophagen hat [64].

In-vitro-Studien an Ratten zeigten, dass eine *P.g.*-Infektion eine Arthritisbildung förderte [6, 12].

Allerdings konnten bis heute keine eindeutigen Ergebnisse erlangt werden und Smit et al., 2015 schrieben, dass in vitro Zusammenhänge zwischen *P.g.* und der RA herausgefunden wurden, jedoch nicht in vivo [103]. Dies deckt sich mit der Aussage von Mikuls et al., 2014 [70].

Andere Studien untersuchten Antikörper gegen *P.g.*, die auch mit einem positiven CCP-Befund und höheren RF sowie inflammatorischen Werten assoziiert waren [3, 35, 68].

Einen neuen Ansatz liefern König et al, 2016 mit ihrer These, dass *A.a.* der parodontale Leitkeim sein könnte, der verantwortlich für die Entstehung einer RA bei einer bestehenden PA [52] ist. Der durch *A.a.* gebildete Virulenzfaktor Leukotoxin A ist ein pore-forming protein und könnte die Membran neutrophiler Zellen zerstören. Im Anschluss würde Calcium in die Zelle gelangen und die PAD4 der Neutrophilen aktivieren, wodurch es zu einer leukotoxischen Hypercitrullinierung (LTH) kommen könnte. Durch Kumulierung vieler citrullinierter Peptide würden die Neutrophilen zugrunde gehen. Der Zellinhalt würde sich im Extrazellularraum ausbreiten und per Phagozytose antigenpräsentierender Zellen über das HLA-DRB-SE den T-Zellen präsentiert werden. Daraufhin würden B-Zellen aktiviert werden und könnten als Plasmazellen Antikörper gegen die citrullinierten Produkte/ Peptide bilden. Die

verantwortlichen Antigene sind weiterhin unbekannt und müssten durch weitere Studien untersucht bzw. ermittelt werden.

Silvestre et al., 2016 konnten in ihrer Meta-Analyse zeigen, dass eine nicht chirurgische PA-Behandlung signifikant die BSG und den DAS-28 senken konnte [101]. Der DAS-28 dient der Einteilung der Schwere der RA und würde bedeuten, dass das therapeutische Outcome der RA durch eine PA-Behandlung verbessert werden kann [44]. Ebenso argumentierte auch Mikuls et al., 2014, dass eine bestehende PA mit höheren DAS-28-Werten assoziiert ist [70, 102].

## 2. Zielstellung und Hypothesen

Die aktuelle Studienlage weist darauf hin, dass bei PA-Patienten das Risiko an einer RA zu erkranken viermal größer ist als bei Patienten ohne PA. Außerdem neigen RA-Erkrankte eher dazu eine PA zu entwickeln.

Innerhalb dieser Studie stellten wir zum einen die Haupthypothese auf, dass eine klinisch schwere PA mit erhöhten Antikörper-Titern gegen Anti-CEP-1 und Anti-CCP bei Patienten mit RA assoziiert ist.

Dabei wurde die Schwere der PA einerseits nach der CDC-Klassifikation definiert, andererseits wurden die PESA- und PISA-Daten bestimmt.

Zum anderen untersuchten wir den Einfluss fünf parodontaler Leitkeime auf die Bildung der ACPAs. Vorhergehende Studien zeigten, dass vor allem das Bakterium *P.g.* eine entscheidende Rolle dabei spielen könnte.

Es konnte bisher belegt werden, dass parodontale Leitkeime eigene Virulenzfaktoren und speziell *P.g.* eine eigens gebildete PPAD produzieren kann. Diese PPAD bewirkt, dass die physiologisch vorkommende Aminosäure Arginin zu Citrullin umgewandelt wird. Dieses Produkt scheint in seiner Tertiärstruktur in einem Maß verändert zu sein, dass der Körper es als körperfremd ansieht und die Autoantikörperproduktion daraufhin eingeleitet wird.

Auf genetischer Ebene wurden die HLA-DRB1-Allele näher beleuchtet. Insbesondere, ob das HLA-DRB1\*04-Allel eine triggernde Wirkung auf die Produktion citrullinierter Antikörper haben könnte.

Weitere Nebenziele bzw. Nebenhypothesen waren, dass Faktoren wie Alter, Geschlecht, Nikotinkonsum oder die Einnahme von Rheumatologika ebenfalls die Bildung citrullinierter Antikörper beeinflussen könnten.

Sollten Zusammenhänge dargestellt werden können, wäre dies ein Hinweis darauf, dass Parodontitis und/ oder parodontale Leitkeime bei einer bestimmten genetischen Konstellation (HLA-DRB1\*04-Träger) aktiv an der Entstehung einer RA beteiligt sind. Dadurch wäre es

möglich, Risikopatienten für RA zu identifizieren und diesen bei Notwendigkeit eine parodontale Therapie anzubieten.

### 3. Material und Methodik

In der folgenden Grafik (Abb.6) sind die angewendeten Methoden dargestellt.

Am Anfang fand die Probandenrekrutierung und die parodontale Untersuchung statt, gefolgt von der Blutabnahme für weitere Laboruntersuchungen (HLA-Typisierung, Bestimmung citrullinierter Antikörper) und der abschließenden mikrobiellen Untersuchung.

Die Ergebnisse wurden mittels der Software IBM SPSS Statistics 22 (SPSS 22.0 package, Chicago, IL) ausgewertet.

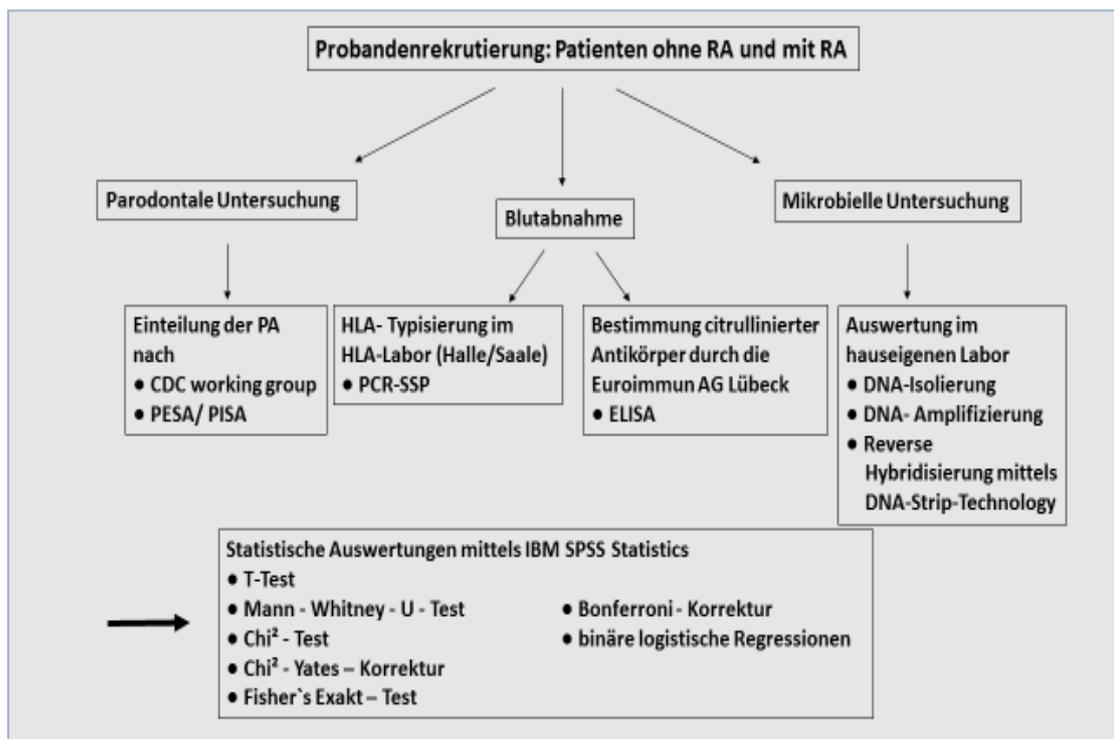


Abbildung 6: Fließdiagramm der vorliegenden Studie

#### 3.1 Patienten mit RA

Über einen Zeitraum von knapp eineinhalb Jahren (Dezember 2014 bis April 2016) konnten 77 Probanden mit RA im Rheumahauses, Berufsausübungsgemeinschaft Bohl-Bühler & Dr. Reckert,

Dr. Weinerth in Potsdam, in der Internistisch-Rheumatologischen Arztpraxis Dr. Liebhaber und in der Klinik für Innere Medizin II, Arbeitsbereich Rheumatologie (Prof. G. Keyßer, Dr. C. Schäfer) am Universitätsklinikum Halle (Saale) rekrutiert werden. Weitere 30 Probanden stammten aus einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe [30]. In dieser Studie wurden innerhalb von fünf Jahren (September 2006 bis September 2011) Probanden mit RA in rheumatologischen Praxen (Dr. Carlo Weimann, Magdeburg; Uta Kopsch, Magdeburg; Dr. Thomas Linde, Halle (Saale); Dr. Ralf Schobeß, Halle (Saale)) und in Kliniken für Orthopädie (Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie der Pfeifferschen Stiftungen Magdeburg und Dr. Jörg Brand, Universitätsklinikum Halle, Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin) rekrutiert. Zur Beurteilung der Normalverteilung der Serumwerte für Anti-CCP und Anti-CEP-1 konnten auch Daten einer Gruppe von Probanden ohne RA (n=89), die keine oder maximal eine milde Parodontitis hatten, genutzt werden [92].

Vorab wurde eine Genehmigung für diese Studie von der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität eingeholt.

In einem Eingangsgespräch wurden die Probanden über den Ablauf der Untersuchung und den Nutzen der Studie aufgeklärt sowie ihr schriftliches Einverständnis eingeholt. Insbesondere wurde darauf hingewiesen, dass die Einverständniserklärung ohne Angaben von Gründen oder persönlichen Nachteilen jederzeit widerrufen werden kann.

Es folgten eine parodontale Untersuchung, die Entnahme subgingivaler Plaqueproben mittels endodontischer Papierspitzen für den molekularbiologischen Nachweis von fünf parodontalen Markerkeimen (micro-Ident, Hain Lifescience) und eine Blutentnahme zur Bestimmung der citrullinierten Antikörper (Anti-CCP, Anti-CEP-1) und der Nachweis von HLA-Klasse II-Allelen.

### 3.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Vor der Studienteilnahme wurden für die RA-Probanden Ein- und Ausschlusskriterien definiert. Es wurden nur RA-Patienten eingeschlossen, die das 18. Lebensjahr vollendet hatten und mindestens vier eigene Zähne aufwiesen. Da auch genetische Untersuchungen geplant waren, wurden nur Deutsche kaukasischer Herkunft, die zudem untereinander nicht verwandt sein durften, aufgenommen.

Ausschlusskriterien waren ein Diabetes mellitus Typ I und Typ II sowie eine koronare Herzerkrankung. Weiterhin führte die Einnahme von Medikamenten wie Cyclosporin A, Hydantoin oder Nifedipin zum Studienausschluss, da diese Arzneimittel Gingivahyperplasien verursachen können und eine exakte parodontale Diagnostik nicht möglich gewesen wäre. Des Weiteren führte eine Schwangerschaft zum Teilnahmeausschluss. Nicht in die Studie eingeschlossen wurden Probanden, die weniger als sechs Monate vor der geplanten

zahnärztlichen Untersuchung ein subgingivales Scaling und Root planing oder eine systemische Antibiotikatherapie weniger als drei Monate vor der Untersuchung erhielten.

In der Testgruppe wurde die Rheumatoide Arthritis durch erfahrene Rheumatologen nach den aktuellen Kriterien zur Klassifikation der RA von 2010, ausgearbeitet durch das ACR und die EULAR in der Revision von 1987, diagnostiziert.

Dazu gehören folgende sieben Kriterien: 1) Morgensteifigkeit, 2) Arthritis von drei oder mehr Gelenken, 3) Arthritis der Hand, 4) symmetrische Arthritis, 5) Rheumaknoten, 6) Rheumafaktor im Serum nachweisbar und 7) radiologische Veränderungen.

Um sicherstellen zu können, dass es sich tatsächlich um eine RA handelte, mussten die ersten vier genannten Kriterien mindesten sechs Wochen bestehen und vier von sieben Kriterien erfüllt sein.

Während unserer Studie wurden die Patienten in der Anamnese zu ihrem allgemeinen Gesundheitszustand, ihrer täglichen Mundhygiene und zur Häufigkeit jährlich durchgeführter zahnärztlicher Vorsorgeuntersuchungen befragt.

Der Raucherstatus wurde erhoben, indem gefragt wurde, ob der Proband Raucher sei und bei positiver Antwort wie viele Zigaretten er am Tag konsumieren würde (Raucher vs. Nichtraucher). Als ehemalige Raucher (past smoker) wurden Personen bezeichnet, die mindestens ein Jahr nicht mehr geraucht hatten.

Für die Kontrollprobanden waren folgende Ein- und Ausschlusskriterien ausschlaggebend: Sie mussten ein Mindestalter von 30 Jahren haben sowie Deutsche kaukasischer Herkunft sein. Sie durften weder eine RA noch eine Erkrankung mit bekannter Assoziation zur Parodontitis (z.B. Diabetes mellitus, koronare Herzerkrankung) aufweisen. Der klinische Attachmentverlust durfte nicht  $\geq 3,5$  mm sein mit Ausnahme eines Attachmentverlusts infolge überhängender Füllungsänder, nach kieferorthopädischer Therapie oder aufgrund traumatischen Zähneputzens. Auch Pseudotaschen an endständigen Molaren waren kein Ausschlusskriterium. Ähnlich den RA-Probanden führte eine Schwangerschaft, eine Antibiotikaeinnahme bis zu drei Monate sowie ein subgingivales Scaling und Root planing bis zu sechs Monate vor der Untersuchung oder eine zur Hyperplasie führende Medikamenteneinnahme zum Ausschluss aus der Studie.

### 3.1.2 Klinisch parodontologische Untersuchung der RA-Probanden

Bei den Patienten mit RA wurde zuerst der proximale Plaqueindex (API) nach Lange (1975) visuell und mittels zahnärztlicher Sonde aufgenommen. Dazu wurden die Approximalräume des I. und III. Quadranten von oral und die des II. und IV. Quadranten von vestibulär visuell und durch Ausstreichen mit der Sonde bewertet. Die Approximalräume zwischen den Zähnen 11/21 und 31/41 wurden nicht beurteilt. Bei den Patienten mit RA musste auf die vorherige Anfärbung

der Approximalräume mit einem Plaquerelevator verzichtet werden, da die Untersuchungen nicht auf einer zahnärztlichen Einheit mit der Möglichkeit einer anschließenden Zahnreinigung durchgeführt werden konnten. Der API in Prozent wurde berechnet, indem die Anzahl der plaquepositiven Approximalräume mit 100 multipliziert und das Produkt durch die Gesamtzahl der bewerteten Approximalräume dividiert wurde. Klinisch wurden an sechs Messstellen jedes Zahnes (distovestibulär, vestibulär, mesiovestibulär, mesiooral, oral und distooral) Rezessionen (Distanz der Schmelz-Zement-Grenze bis zum Beginn der marginalen Gingiva), die Sondiertiefen (PD= Distanz der marginalen Gingiva bis zum apikalen Stopp der Sonde) sowie der klinische Attachmentverlust (CAL= Distanz der Schmelz-Zement-Grenze bis zum apikalen Stopp der Sonde) bestimmt. Die Mittelwerte für PDmax und CALmax errechneten sich aus der Summierung der jeweils höchsten Werte eines jeden Zahnes und anschließender Division durch die Anzahl der vorhandenen Zähne.

Für die Bestimmung von Rezessionen, PD und CAL wurde zunächst eine druckkalibrierte Sonde (Vivacare TPS Probe, Vivadent, Schaan, Liechtenstein) genommen. Der Schaft bestand aus sterilisierbarem Polyvinylchlorid und besaß ein auswechselbares Arbeitsende, das nach jeder Untersuchung entsorgt wurde. Am Arbeitsende befand sich eine Halbkugel mit einem Durchmesser von 0,5 mm. Die Skalierung begann bei 1,5 mm in Millimeterschritten, wobei dicke schwarze Markierungen bei 3,5; 4,5; 5,5; 8,5; 9,5 und 10,5 mm die Ablesbarkeit erleichtern sollten. Ein Federmechanismus am Arbeitsende erlaubte die Justierung des Sondierdrucks auf 0,20 N, indem die schwarze Markierung am Arbeitsende und die am Sondengriff vorhandene Markierung in Übereinstimmung gebracht wurden. Aufgrund der begrenzten Anzahl von 44 TPS-Arbeitsenden konnten nicht alle RA-Probanden mit dieser druckkalibrierten Sonde untersucht werden. Deshalb wurden die weiteren Patienten mit einer aus Metall bestehenden, sterilisierbaren, auf 0,20 N druckkalibrierten Sonde von Aesculap (DB764R Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) untersucht. Diese Sonde besaß eine Millimeterskalierung.

Traten Blutungen (BOP - Bleeding on probing) 30 sec nach Sondierung auf, wurden diese ebenfalls in einer Sechs-Punkt-Messung registriert. Die Zahl blutungspositiver Flächen wurde in Relation zur Gesamtzahl der bewerteten Zahnflächen in Prozent berechnet (BOP%).

Weiterhin wurde auch die prozentuale Anzahl von Zähnen, bei denen eine Blutung nach Sondierung auftrat (BOP/ Zahn), berechnet.

Für die Definition eines „Parodontitisfalles“ und Beurteilung der Schwere der Parodontitis wurde das Studienmodell der Center of Disease Control working group (CDC working group, 2007) angewandt. Hierbei bestand ein schwerer Parodontitisfall, wenn mindestens zwei proximale Flächen mit einem Attachmentverlust  $\geq 6$  mm **und** mindestens eine proximale Fläche mit einer Sondiertiefe  $\geq 5$  mm vorhanden waren. Eine moderate Parodontitis wurde definiert als Attachmentverlust  $\geq 4$  mm an mindestens zwei proximalen Flächen **oder** als das

Vorhandensein von mindestens zwei approximalen Sondertiefen  $\geq 5$  mm. Der approximale Attachmentverlust durfte dabei nicht am selben Zahn lokalisiert sein. Traf keine dieser beiden Einteilungen zu, wurde geschlussfolgert, dass keine oder maximal eine milde Parodontitis vorlag.

Eine weitere Einteilung erfolgte nach PESA/ PISA (**P**eriodontal **E**pithelial **S**urface **A**rea/**P**eriodontal **I**nflamed **S**urface **A**rea). Dabei spiegelt der PESA die durch die Parodontitis betroffene epitheliale Fläche der Zahnwurzel wieder. Berechnet wird dieser Wert indem nach einer Sechs-Punkt-Messung die Rezessionen eines Zahnes (RSA – Rezession Surface Area) von dem Attachmentverlust (ALSA – Attachment Loss Surface Area) subtrahiert werden (ALSA-RSA= PESA). Der PESA kann auch nicht entzündete Zahnfleischtaschen beinhalten. Um eine Abgrenzung zur Entzündungsfläche zu schaffen, wurde der PISA entwickelt. Dieser nimmt Bezug auf die Größe der Entzündungsfläche, die durch eine Parodontitis hervorgerufen wird. Dabei sind einige Schritte mittels der vorprogrammierten und frei zur Verfügung stehenden Excel-Tabelle von Willem Nesse durchzuführen [77]. In die jeweiligen Tabellen werden der Attachmentverlust und die Rezessionen nach der Sechs-Punkt-Messung für jeden Zahn eingegeben. Es wird für jeden Zahn der Durchschnittswert des CAL und der Rezessionen berechnet. Daraus ergibt sich vorerst der PESA in  $\text{cm}^2$ .

Der wichtigste Parameter zur Identifizierung der Entzündungsfläche ist der BOP. Dieser wird in einer weiteren Tabelle ebenfalls in Sechs-Punkt-Messung für jeden Zahn niedergeschrieben. Mithilfe bestimmter Logarithmen wird der PESA mit der Anzahl der Blutungsflächen eines jeden Zahnes multipliziert und durch sechs dividiert. Das Ergebnis ist der PISA für den individuellen Zahn. Anschließend wird der Mittelwert der Entzündungsfläche für alle Zähne in  $\text{cm}^2$  angegeben.

Im Vergleich zu den RA-Patienten konnte der API bei den Kontrollprobanden nach Anfärben der Approximalräume mit einem Plaquerelevator (Mira-2-Ton, Hager & Werken, Duisburg, Deutschland) bestimmt werden. Dabei wurden die oralen Zahnflächen des I. und III. Quadranten sowie die vestibulären Zahnflächen des II. und IV. Quadranten mit dem Färbemittel touchiert. Nach einmaligem Ausspülen mit Wasser durch den Patienten wurde anhand der Färbung bestimmt, ob und an welchen Approximalräumen Plaquerückstände vorzufinden waren. Die Berechnung erfolgte wie in der Testgruppe.

Sondertiefenmessungen, Messungen von Rezessionen und klinischer Attachmentverlust wurden mit einem Parodontometer (PCPUNC156, Hu-Friedy, Chicago, USA) in mm-Einteilung vorgenommen. 30 Sekunden nach Sondierung wurde bestimmt, ob eine Sondierblutung aufgetreten ist. Dabei wurde die Sondierblutung in Abhängigkeit von der Anzahl der Zähne berechnet.

In gleicher Weise wie bei RA-Probanden wurden die Werte für PDmax und CALmax bestimmt.

Am Ende der parodontalen Untersuchung erfolgte bei beiden Kohorten ein mikrobiologischer Test im Labor der Universitätsklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie unter Anwendung der Chemikalien und Bearbeitungsvorschrift des micro-IDent®-Tests, Hain Lifescience, Nehren. Dazu wurden die vier Zähne mit der tiefsten Sondiertiefe pro Quadrant supragingival gereinigt und jeweils eine der vier zur Verfügung stehenden sterilen Papierspitzen unter relativer Trockenlegung mittels Pinzette für ca. 20 sec eingeführt. Fehlten Zähne in einem Quadranten, wurde die entsprechende Probe von dem benachbarten Quadranten entnommen. Bei der Entnahme von subgingivaler Plaque sollten Speichel- und Blutkontamination vermieden werden, um Fehler bei der Bestimmung der Keime zu vermeiden. Nach kompletter Probenentnahme wurden die vier Papierspitzen in ein steriles Gefäß überführt (Poolprobe) und unter Angabe der betroffenen Zähne und der jeweiligen Sondiertiefe im Labor der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie bearbeitet. Für die Blutentnahme wurden zwei Monovetten, eine mit EDTA und eine für Serum, mit ca. 10 ml Blut gefüllt. Das Serumröhrchen wurde innerhalb von 24 Stunden zentrifugiert (Haraeus-Zentrifuge 1000 xg, zehn Minuten bei 4°C). Anschließend wurden jeweils 500 µl Serum in zwei Reaktionsgefäßen pipettiert und bei -20°C tiefgefroren.

## 3.2 Mikrobiologischer Test auf parodontale Markerkeime

Mit diesem Test wurde die bakterielle DNA der parodontalen Markerkeime: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.), *Porphyromonas gingivalis* (P.g.), *Tannerella forsythia* (T.f.), *Prevotella intermedia* (P.i.) und *Treponema denticola* (T.d.) semiquantitativ erfasst.

Ein Bakterium galt in unserer Studie dann als nachgewiesen, wenn es über der Nachweisgrenze von  $10^4$  (P.i., P.g., T.f., T.d.) bzw.  $10^3$  (A.a.) Genom Nachweisen lag.

### 3.2.1 Isolation der bakteriellen DNA mittels QIAamp® DNA Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden)

Der molekularbiologische Nachweis der bakteriellen DNA von fünf parodontopathogenen Bakterien erfolgte im Labor der Universitätsklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie der Martin-Luther-Universität Halle (Saale) unter Verantwortung der Leiterin Frau PD Dr. S. Schulz.

Bei erstmaliger Anwendung des kommerziellen Kits wurde den vorgefertigten Puffern AW1 und AW2 Ethanol zugegeben.

Der wiederum kommerziell hergestellte ATL-Puffer musste vorab in warmes Wasser gestellt

werden und jeweils ein Heizblock wurde auf 70°C und ein Heizblock auf 95°C vorgewärmt.

Zur Auflösung der bakteriellen Zellwand wurden 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K-Lösung in einem extra Gefäß gemischt. Dieser Mix wurde jeder Patientenprobe, die nun zerkleinerte Papierspitzen enthielt, zugegeben und für 30 Sekunden gevortext. Daraufhin wurde die Probe bei 70 °C für 10 Minuten inkubiert und anschließend anzentrifugiert. Zur weiteren Zellmembranauflösung der Bakterien wurden 200 µl AL-Puffer zugeführt. Eine Inkubation bei 95°C für 5 Minuten schloss sich an. Im weiteren Verlauf kam es durch Zugabe von 200 µl Ethanol zur Ausfällung der DNA als Salz. Die Lösung wurde in das obere Reservoir eines Filter-Gefäßes pipettiert, verschlossen und in einer Standard-Tischzentrifuge bei ca. 8000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und der Ausfällung wurden 500 µl AW1-Puffer zugefügt und wiederum bei ca. 8000 rpm für 1 Minute in der Standard-Tischzentrifuge zentrifugiert. Erneut wurde der Durchlauf verworfen und diesmal 500 µl AW2-Puffer hinzu pipettiert. Eine anschließende Zentrifugation für 3 Minuten bei höchster Geschwindigkeit fügte sich an. Der nächste Schritt beinhaltete das Verwerfen des Auffanggefäßes und das Filtergefäß wurde in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß eingesetzt. Um die DNA zu erhalten, wurden 400 µl AE-Puffer für vier Papierspitzen zugegeben. Die wiederholte Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Minute schloss sich an sowie eine weitere Zentrifugation bei ca. 8000 rpm für 1 Minute. Daraufhin entfernte man das Filtergefäß und hatte die DNA im Eluat, die bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C tiefgefroren wurde. Für die anschließende Polymerase-Kettenreaktion wurden für jede Patientenprobe 5 µl DNA-Lösung angesetzt.

### 3.2.2 Multiplex-Amplifizierung durch Biotin-markierte Primer unter Verwendung des micro-Ident®-Kits von HAIN Lifescience

Man benötigte pro Probe 10 µl Amplifikations-Mix A (AM-A), 35 µl Amplifikations-Mix B (AM-B) und 5 µl DNA-Lösung, was insgesamt ein Volumen von 50 µl ergab.

Anfangs wurde ein Master-Mix aus AM-A und AM-B hergestellt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Der Mix wurde in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und die 5 µl DNA-Lösung zugefügt.

Das Programmierprotokoll des Thermocycler (Mastercycler gradient Eppendorf, Hamburg, Deutschland) umfasste zum einen den 1. Zyklus für die Denaturierung. Dieser Schritt erfolgte bei 95°C für 5 Minuten. Es schlossen sich 10 Zyklen Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden und das Annealing bei 58°C für 2 Minuten an. Des Weiteren folgten jeweils 20 Zyklen bei 95°C für 25 Sekunden sowie bei 53°C für 40 Sekunden und bei 70°C für 40 Sekunden. Ein finaler

Elongationsschritt wurde bei 70°C für 8 Minuten durchgeführt. Die nun erhaltenen Amplifikationsprodukte konnten bei +8 bis -20°C gelagert werden.

### 3.2.3 Hybridisierung

Zur Vorbereitung wurde das Schüttelwasserbad (TwinCubator) auf 45 °C vorgewärmt. Ebenso wurden der Hybridisierungspuffer (HYB, grün) und die Stringent-Waschlösung (STR, rot) auf 37-45 °C erwärmt. Zusätzlich wurde das Konjugat-Konzentrat mit dem Puffer CON-D und das Substrat-Konzentrat mit dem Puffer SUB-D in einem Verhältnis 1:100 verdünnt. Für jeden Membranstreifen verdünnte man 10 µl Konzentrat mit 1 ml des entsprechenden Puffers.

Zusätzlich stand eine Denaturierungsreagenz (DEN, blau) zur Verfügung.

In einer Wannenkavität wurde für jede Probe 20 µl Denaturierungsreagenz pipettiert, daraufhin wurden 20 µl des Amplifikats zugegeben, beides miteinander vermischt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Währenddessen wurde mit einer Pinzette ein Membranstreifen aus dem Röhrchen entnommen und die Beschriftung vorgenommen. Zur Lösung wurde 1 ml HYB zugegeben und die Wanne vorsichtig geschwenkt bis die Lösung eine homogene Farbe aufwies. Höchste Priorität kam der Vermeidung einer möglichen Verunreinigung benachbarter Kavitäten zu. Folgend wurde in jede benutzte Kavität ein Membranstreifen eingelegt, sodass diese vollständig mit Flüssigkeit bedeckt waren. Die Wanne wurde anschließend bei 45°C für 30 Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde der Hybridisierungspuffer vollständig entfernt. Anschließend gab man 1 ml STR in die Wanne und inkubierte bei 45 °C für 15 Minuten unter leichtem Schütteln im Wasserbad. Danach erfolgte die Arbeit bei Raumtemperatur und die Stringentlösung wurde vollständig entfernt. Der Membranstreifen wurde auf einem Horizontalschüttler mit 1 ml Rinse-Lösung gewaschen und danach die Rinse-Lösung abgeschüttet. Daraufhin gab man 1 ml verdünntes Konjugat zu jedem Membranstreifen hinzu und es folgte eine weitere Inkubation von 30 Minuten auf dem Horizontalschüttler. Die Lösung wurde abgeschüttet, daran anschließend zweimal für je eine Minute 1 ml Rinse-Lösung und einmal 1 ml destilliertes Wasser zugefügt und auf dem Horizontalschüttler gewaschen. Das Wasser wurde in einem nächsten Schritt vollständig entfernt. 1 ml verdünntes Substrat wurde jedem Membranstreifen zugegeben und lichtgeschützt für 3-20 Minuten in Abhängigkeit von den Testbedingungen (Raumtemperatur) inkubiert. Allerdings sollte eine zu lange Inkubation vermieden werden, um eine zu starke Hintergrundfarbe zu vermeiden, die eine exakte Auswertung erschweren würde. Die Substratreaktion wurde durch zweimaliges Waschen mit destilliertem Wasser gestoppt. Die

Membranstreifen wurden mit einer Pinzette entnommen und auf ein saugfähiges Papier zum Trocknen gelegt.

### 3.2.4 Auswertung:

Die Membranstreifen mussten auf eine geeignete Unterlage geklebt und lichtgeschützt aufbewahrt werden.

Bei erfolgreicher Durchführung der vorangegangenen Schritte sind auf dem Membranstreifen folgende Reaktionszonen zu sehen (Abb.7):

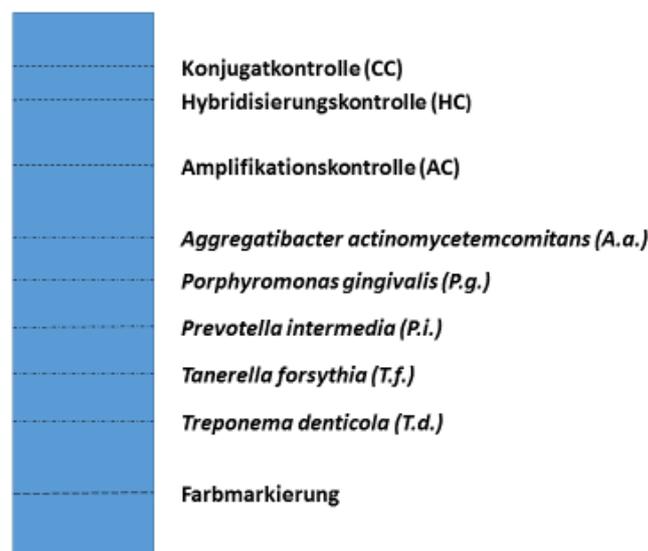


Abbildung 7: Auswertung des mikrobiologischen Tests

Die **Konjugatkontrolle** musste immer vorhanden sein. Sie zeigt die effiziente Bindung von Konjugat und Substrat während der Hybridisierung.

Die **Hybridisierungskontrolle** erscheint zwischen der Konjugat- und der Amplifikationskontrolle. Diese zeigt die effizient durchgeführte Hybridisierung an.

Wenn die **Amplifikationskontrolle** als Bande farblich nachgewiesen ist, sind keine Fehler bei der Amplifikationsreaktion aufgetreten. Die Amplifikationskontrolle kann unter Umständen abgeschwächt sein oder ganz wegfallen aufgrund von Kompetitionsreaktionen. In diesem Fall ist der Test jedoch als positiv zu bewerten und muss nicht wiederholt werden.

Die weiteren Banden zeigten den Nachweis parodontopathogener Bakterienarten in der jeweiligen Probe an. Diese Auswertung erfolgt semiquantitativ. Wurden von *A.a.* mindestens

10<sup>3</sup> bzw. 10<sup>4</sup> Genom Nachweise von *P.g.*, *P.i.*, *T.f.* und *T.d.* festgestellt, erschien eine Schwärzung an entsprechender Stelle. Eine genaue Anzahl vorhandener bakterieller DNA kann bei diesem Test nicht beschrieben werden.

### 3.3 Molekulargenetischer Nachweis von HLA-DRB1-Allelen

HLA-Allele stellen als peptidantigenpräsentierende Strukturen der T-zellulären Immunabwehr unveränderliche Oberflächenmerkmale dar. Im Gegensatz zu den auf allen kernhaltigen Zellen exprimierten HLA-Klasse-I-Merkmalen sind die HLA-Klasse-II-Merkmale konstitutiv nur auf bestimmten Zellen, den APCs zu finden. Zu diesen gehören neben Monozyten und Makrophagen mit ihren gewebespezifischen Ausprägungen (z.B. Kupffer-Sternzellen der Leber) auch Dendritische Zellen (DC) und B-Lymphozyten im Blut sowie in den sekundären lymphatischen Organen.

Der molekulargenetische Nachweis der HLA-Klasse-II-Allele erfolgte im interdisziplinären HLA-Labor (GHATT) des Universitätsklinikums Halle (Saale) unter Verantwortung der Leiter Dr. W. Altermann und PD. Dr. G. Schlaf unter Verwendung des so genannten SSP-PCR-Verfahrens. Dabei werden Allelgruppen-spezifische Primer in einer Kombination verwendet, die eine molekulargenetische Differenzierung der HLA-Klasse-II-Allelgruppen des Genlocus HLA-DRB1\* (HLA-DR) in der sogenannten „Low Resolution“ bzw. „2-stelligen Auflösung“ erlauben.

#### 3.3.1 Isolierung der DNA aus Vollblut

Angewendet wurde die Aussalzmethode nach Miller (1988), um die DNA aus den Leukozyten des nicht koagulierten Zitratblutes zu gewinnen. Anfangs wurde eine Zentrifugation bei 4.000 U/min für 5 Minuten durchgeführt, um die kernhaltigen Leukozyten und die Erythrozyten aus dem Plasma abzutrennen. Der Plasmaüberstand wurde verworfen. Die kernlosen und aus diesem Grund nicht gewünschten Erythrozyten wurden durch die Zugabe von 45 ml Red Cell Lysis Buffer (RCLB) hypoosmotisch lysiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde erneut mit RCLB zur Wiederholung des Lysevorgangs resuspendiert und anschließend zentrifugiert. Um die Erythrozyten weitgehend zu entfernen, wurde dieser Vorgang noch zwei- bis dreimalig wiederholt. Das verbliebene Leukozytenpellet wurde in ein Reaktionsgefäß pipettiert, in 1 ml RCLB resuspendiert und bei 14.000 U/min für 1 Minute sedimentiert. Der Überstand wurde abermals entfernt, woraufhin 200 µl RCLB und 50µl Proteinase-K-Lösung zur Einleitung des Leukozytenverdaus hinzugegeben wurden [91]. Zusätzlich wurden 30 µl SDS-Lösung (Sodium Dodecyl Sulfat 10 %ig) zugegeben, worauf das Zellpellet bei 65 °C für 1

Stunde im Eppendorf-Thermomixer inkubiert wurde. Für die sogenannte Aussalzung wurden 100 µl gesättigte NaCl-Lösung zugesetzt und die Lösung bei 4°C für 30 Minuten inkubiert, um die Proteine selektiv auszufällen. Eine weitere Zentrifugation bei 14.000 U/min für 1 Minute ermöglichte, dass sich die DNA durch selektive Proteinausfällung im Überstand befand. Unter Zugabe von 750 µl Isopropanol wurde anschließend die DNA aus diesem Überstand unter vorsichtigem Schwenken gefällt. Es folgte eine Zentrifugation bei 14.000 U/min für 3 min und eine anschließende Überführung der DNA in 200 µl Aqua destillata zur Resuspension. Es schloss sich eine Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten an. Das vorliegende DNA-Pellet wurde bei -72 °C gelagert.

Um den DNA-Gehalt messen zu können, kam ein Spektrometer (UV/VIS- Spektrometer) zum Einsatz. Eine Extinktion von 1, gemessen bei einer Wellenlänge von 260 nm, entspricht einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNA.

### 3.3.2 Genotypisierung der HLA-Klasse-II-Allele mittels PCR unter Verwendung sequenzspezifischer Primer (SSP-PCR)

Zur Genotypisierung der HLA-Klasse-II- Allelgruppen kamen geringauflösende kommerzielle Kits zur Aufschlüsselung der Genorte HLA-DRB1\* (DR), -DRB3\*(DR52), -DRB4\*(DR53), -DRB5\*(DR51) zum Einsatz. Ein Mastermix und Primermix wurden bereitgestellt. Dabei bestand der Mastermix aus 3 µl PCR-Lösung, 2 µl Proben-DNA mit einem DNA-Gehalt von 100 ng und 0,1 µl einer hitzestabilen Taq-Polymerase. Die in die unterschiedlichen Kavitäten der insgesamt 96 Kavitäten umfassenden PCR-Typisierungsplatten vorpipettierten Primerkombinationen ermöglichten die gezielte Vermehrung von DNA-Abschnitten ausgewählter HLA-Allele. Zusätzlich liegt in jeder Kavität ein Kontroll-Primerpaar vor, das die Amplifikation einer nicht HLA-spezifischen Kontroll-DNA bewirkt und auf diese Weise angemessene PCR-Bedingungen anzeigt, auch wenn keine HLA-spezifischen Amplifikate zu generieren sind. Für jede PCR-Reaktion wurden 5 µl Primermix und 5µl PCR-Mastermix in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Mithilfe eines Thermocyclers (Gene Amp 9600, Perkin Elmer, Weiterbach) mit folgendem Programm wurde die Amplifikation bei folgenden Zyklen durchgeführt:

1. Initiale Denaturierung (94°C für 2 Minuten), erneute Denaturierung über 10 Zyklen bei 94°C für jeweils 10 Sekunden
2. Annealing und Extension bei 65°C für 60 Sekunden
3. Denaturierung von 20 Zyklen bei 94°C für jeweils 10 Sekunden
4. Annealing und Extension bei 65°C für 50 Sekunden
5. wiederholte Extension bei 72°C für 30 Sekunden [82, 83, 91].

### 3.3.3 Agarosegelelektrophorese zum Nachweis amplifizierter HLA-Allelfragmente

Zur Auftrennung der in der PCR generierten Amplifikate wurde eine horizontale Agarosegelelektrophorese eingesetzt.

DNA ist durch die deprotonierten Phosphatgruppen negativ geladen und wandert folglich nach Anlegen einer elektrischen Spannung während der Gelelektrophorese in Richtung Anode. Dabei wird die DNA ihrer Größe nach aufgetrennt. Gleichzeitig wurden Längenstandards von DNA-Fragmenten bekannter Größe aufgetragen, um die Größe der PCR-Produkte bestimmen zu können.

Im Vorfeld wurden unter Bestrahlung in einer Mikrowelle 3 g Agarose in 100 ml TBE-Laufpuffer gelöst. Daraufhin wurden nach Abkühlen auf 60°C 100 ml des Agarosegels und 30 µl Ethidiumbromid / Acridinorange - Färbelösung vermengt. Mittels des Farbstoffes ist eine Auswertung unter UV-Licht möglich. Im weiteren Verlauf wurde das Gel in einen Träger gegossen und vor dem Erstarren durch das Einbringen eines sogenannten Kammes mit 24 Auftragskammern versehen. Eine mit Puffer gefüllte Elektrophoresekammer war zur Aufnahme des erstarrten Gels bereit. Den einzufügenden DNA-Amplifikaten wurden 2 µl Marker, bestehend aus einer Mischung aus Blue-Marker und Ethidiumbromid in einem Verhältnis von 10 : 1 mg/ ml zugegeben und schließlich in die Auftragskammern überführt. Die Zeitdauer betrug 15 Minuten bei einer angelegten Spannung von 100 V. Mit Hilfe eines Transilluminators wurden anhand ihrer relativen Längen sowohl die HLA-spezifischen als auch die Kontrollamplifikate unter UV-Licht identifiziert und über eine Auswertetabelle ihren entsprechenden Allelen zugeordnet. Damit lagen die HLA-Klasse-II-spezifischen Allele der Patienten vor.

### 3.4 Testverfahren Anti-CEP-1- und Anti-CCP-ELISA

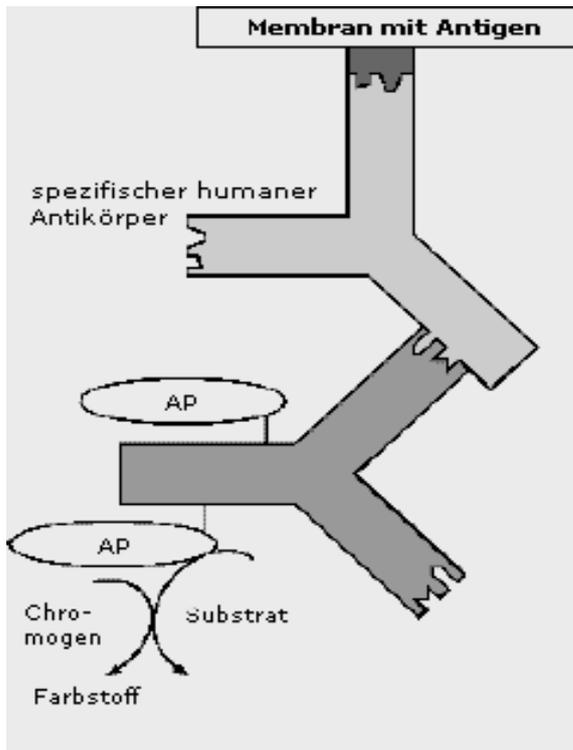


Abbildung 8: ELISA-Test für citrullinierte Antikörper (Quelle EUROIMMUN AG)

In der Labordiagnostik der RA werden heute spezielle Testverfahren angewendet (Abb.8). Diese beruhen auf einem **Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**. In der vorliegenden Studie handelt es sich speziell um den Anti-CEP-1-ELISA (IgG) und den Anti-CCP-ELISA (IgG) (Fa. Euroimmun AG).

CEP-1 steht für citrulliniertes Peptid der  $\alpha$ -Enolase und CCP für cyclisch citrullinierte Peptide. CCP sind spezielle für den serologischen Test synthetisierte Peptide. Dagegen können CEP-1 als wahre körpereigene Autoantigene betrachtet werden.

Voraussetzung für den ELISA sind Antigene, die auf Polystyrol-Mikrotiterstreifen in einer

sogenannten festen Phase verwendet werden. Es handelt sich einmal um citrullinierte  $\alpha$ -Enolase Peptid-1- und zum anderen um synthetisch cyclisch citrullinierte Peptidantigene mit modifizierten Argininresten. Die Reagenzien sind gebrauchsfertig kommerziell zu erhalten (EUROIMMUN AG, Lübeck, Deutschland). Eine Ausnahme bildet der Waschpuffer, der angefertigt werden muss.

Die Bestimmung der Proben wurde unter Anleitung von Dr. Schlumberger von EuroImmun durchgeführt. Die Patientenprobe in Form von Serum oder Plasma wird in einem Verhältnis von 1:101 in Probenpuffer gelöst und zugefügt. Während der ersten Inkubation bei Raumtemperatur für 60 Minuten binden sich die nachzuweisenden Antikörper aus positiven Proben an die Antigene. Eine Waschung wird daraufhin vollzogen und in einem zweiten Schritt folgt die Zugabe von Peroxidase-markierten Anti-Human-Antikörpern. Erneut bei Raumtemperatur wird für 30 Minuten inkubiert. Abermals wird eine Waschung vorgenommen. Im weiteren Verlauf erfolgte eine Farbreaktion durch Zugabe einer Chromogen-/Substratlösung zur Probe bei einer Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten.

Die bei 450 nm messbare Extinktion ist proportional zur Antikörper - Konzentration. Dabei liegt die Referenzwellenlänge zwischen 620 nm und 650 nm (EuroImmun AG). Die

Nachweisgrenze für Anti-CCP liegt bei einem Cut off von 5 RE/ ml und für Anti-CEP-1 bei einem Cut off von 20 RE/ ml.

### 3.5 Statistische Berechnungen

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm IBM SPSS Statistics 22 (SPSS 22.0 package, Chicago, IL) verwendet.

Metrische Variablen wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov- und Shapiro-Will-Test auf Normalverteilung getestet. Lag eine Normalverteilung vor, wurde für Mittelwertvergleiche der T-Test durchgeführt. Lag keine Normalverteilung vor, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Bei der Berechnung der Werte nach der CDC-Klassifikation handelte es sich um drei Gruppen. Daher erfolgten die Mittelwertvergleiche mit dem Kruskal-Wallis-Test (keine Normalverteilung) und bei Vorliegen einer Normalverteilung fand die einfaktorielle ANOVA Anwendung.

Kategoriale Variablen wurden mit dem Chi<sup>2</sup>-Test verglichen und im Falle von 2x2 Tabellen die Yates-Korrektur angewandt. Waren die erwarteten Häufigkeiten in einem Feld der Vierfeldertabelle  $\leq$  fünf wurden die p-Werte mit Hilfe des Fishers Exakt-Test berichtigt.

Bei Mehrfachvergleichen wurde zur Vermeidung zufällig signifikanter Ergebnisse die Bonferroni-Korrektur angewendet. Dabei wurden die p-Werte mit der Anzahl der Vergleiche multipliziert. Um den Einfluss mehrerer Variablen gleichzeitig auf einen positiven Anti-CCP- oder Anti-CEP-1-Nachweis bewerten zu können, wurde das Verfahren der binären logistischen Regression genutzt. Dadurch konnten adjustierte Odds Ratios generiert werden. Generell wurde das Signifikanzniveau auf  $p \leq 0,05$  festgelegt.

## 4. Ergebnisse

Für die Studie wurden zwei Gruppen von Probanden untersucht. Eine Testgruppe umfasste 107 Probanden mit klinisch diagnostizierter RA, die nach Anwendung der CDC-Klassifikation entweder keine bzw. eine milde PA aufwiesen (35,5%) oder an einer moderaten PA (37,4%) bzw. schweren PA (27,1%) erkrankt waren. Die Kontrollgruppe dagegen war nicht an RA erkrankt und hatte maximal eine milde Form der PA (100%). Die Kontrollgruppe diente dazu, die Normalverteilung von Anti-CEP-1- und Anti-CCP-Antikörpern im Serum bei Probanden ohne klinische Symptome einer RA zu evaluieren und der Testgruppe gegenüberzustellen.

### 4.1 Demografische und klinische Parameter

Zwischen beiden Kohorten konnten bzgl. des Alters, des Geschlechts und des Rauchverhaltens signifikante Unterschiede ermittelt werden. Auffallend ist der große Anteil weiblicher (70,1%) gegenüber männlicher (29,9%) Probanden innerhalb der RA-Gruppe.

Des Weiteren sticht hervor, dass RA-Patienten in der Vergangenheit und auch in der Gegenwart häufiger geraucht haben oder rauchen als Probanden ohne RA ( $p=0.006$ ).

Klinisch parodontologische Variablen wie Sondiertiefen, Attachmentverlust (allgemein und an den Positionen, an denen Plaque für den mikrobiologischen Test entnommen wurde) sowie die Anzahl fehlender Zähne waren in der RA-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Tabelle 1).

Dagegen hatten RA-Patienten deutlich niedrigere Werte bezüglich der Sondierblutung pro Zahn (26,1% vs. 48,2%) und wiesen weniger Plaque auf den Zahnoberflächen auf (34,8% vs. 43,0%) als die Kontrollkohorte.

Tabelle 1: Demografische und klinische Parameter bei Probanden ohne RA und Probanden mit RA

	<b>keine RA und keine oder maximal milde Parodontitis (n=89)</b>	<b>RA (n=107)</b>	<b>p-Wert</b>
<i>Demografische Parameter</i>			
Alter Mittelwert $\pm$ SD	46,9 $\pm$ 10,9	55,0 $\pm$ 13,6	<0,0001 <sup>1*</sup>

	<b>keine RA und keine oder maximal milde Parodontitis (n=89)</b>	<b>RA (n=107)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Geschlecht n (%)</b>			
männlich	43 (48,3)	32 (29,9), davon 11 (34,4) schwere PA	
weiblich	46 (51,7)	75 (70,1), davon 13 (17,3) schwere PA	0,008 <sup>2*</sup>
<b>Rauchen n (%)</b>			
Nichtraucher	56 (62,9)	45 (42,1)	
Ehemalige Raucher	14 (15,7)	36 (33,6)	
Raucher	19 (21,3)	26 (24,3)	0,006 <sup>2*</sup>
<i>Klinische Variablen</i>			
API (%)	43,0 (31,4/61,0)	34,8 (11,5/63,2)	0,031 <sup>3*</sup>
Median ( 25./75. Perzentil)			
BOP/Fläche (%)	12,7 (5,8/20,5)	8,9 (3,5/20,0)	0,063 <sup>3</sup>
Median (25./75. Perzentil)			
BOP/Zahn (%)	48,2 (30,2/64,3)	26,1 (16,7/57,1)	0,001 <sup>3*</sup>
Median (25./75.Perzentil)			
PDmax (mm)	2,6 (2,3/2,8)	3,0 (2,7/3,7)	<0,0001 <sup>3*</sup>
Median (25./75. Perzentil)			
CALmax (mm)	2,9 (2,6/3,2)	3,4 (2,9/4,3)	<0,0001 <sup>3*</sup>
Median (25./75. Perzentil)			
PDbakt (mm)	3,0 (3,0/3,4)	4,0 (3,3/4,8)	<0,0001 <sup>3*</sup>

	<b>keine RA und keine oder maximal milde Parodontitis</b> (n=89)	<b>RA</b> (n=107)	<b>p-Wert</b>
Median (25./75. Perzentil)			
CALbakt (mm)	3,3 (3,0/3,5)	4,0 (3,3/5,0)	<0,0001 <sup>3*</sup>
Median (25./75. Perzentil)			
Fehlende Zähne	2,0 (0,0/4,0)	5,0 (2,0/10,0)	<0,0001 <sup>3*</sup>
Median (25./75. Perzentil)			

1=T-Test, 2=Chi<sup>2</sup>-Test Pearson, 3=Mann-Whitney-U-Test, n = Anzahl, SD = Standardabweichung, API = Approximaler Plaque Index, BOP = Bluten auf Sondieren (Bleeding on probing), PDmax = maximale Sondiertiefe (Pocket Depth), CALmax = maximaler Attachmentverlust (Clinical Attachment Loss), \*=signifikant p<0,05

Innerhalb der RA-Gruppe hatten nach der CDC-Einteilung 38 Patienten keine oder milde PA, 40 eine moderate PA und 29 Probanden eine schwere PA. Der API-Wert war bei RA- Patienten mit schwerer PA im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen signifikant erhöht (58,0% vs. 27,3% vs. 7,7%). Ebenso war der BOP-Wert bei schwerer PA etwa doppelt so hoch im Vergleich zu der Kohorte mit moderater PA und fast fünffach so hoch wie der Wert bei keiner bzw. milder PA (Tabelle 2).

Die tägliche Mundhygiene und auch die Kontrollbesuche beim Zahnarzt unterschieden sich dagegen nicht signifikant in Abhängigkeit von der parodontalen Diagnose (Tabelle 2).

Tabelle 2: Klinische Parameter innerhalb der RA-Gruppe mit Unterscheidung zwischen keiner oder milder, moderater und schwerer PA nach CDC-Klassifikation

	<b>RA mit keiner oder milder Parodontitis (n=38)</b>	<b>RA mit moderater Parodontitis (n=40)</b>	<b>RA mit schwerer Parodontitis (n=29)</b>	<b>p-Wert</b>
<i>Klinische Variablen</i>				
API (%)	7,7	27,3	58,0	0,002*
Median (25./75. Perzentil)	(1,8/60,8)	(14,3/54,2)	(34,1/77,1)	
BOP/Fläche (%)	3,5	9,0	16,7	< 0,001*
Median (25./75. Perzentil)	(1,8/8,5)	(4,5/13,7)	(4,8/34,7)	
PDmax (mm)	2,6	3,2	4,4	<0,0001*
Median (25./75. Perzentil)	(2,5/2,8)	(2,9/3,7)	(3,8/5,6)	
CALmax (mm)	2,9	3,8	5,4	<0,0001*
Median (25./75. Perzentil)	(2,7/3,0)	(3,2/4,1)	(4,5/6,1)	
PDbakt (mm)	3,1	4,3	5,5	<0,0001*
Median (25./75. Perzentil)	(3,0/3,5)	(3,5/4,8)	(4,8/6,3)	
CALbakt (mm)	3,1	4,5	5,8	<0,0001*
Median (25./75. Perzentil)	(3,0/3,5)	(4,0/5,0)	(4,9/6,8)	
Fehlende Zähne	3,0	5,0	9,0	<0,0001*
Median (25./75. Perzentil)	(0,5/9,0)	(2,0/8,0)	(5,0/13,5)	
Zahnpflege/Tag (n)	2,0	2,0	2,0	0,973
Median (25./75. Perzentil)	(2,0/2,0)	(2,0/2,0)	(2,0/2,0)	
Zahnarztbesuche/Jahr (n)	1,5	2,0	2,0	0,203
Median (25./75. Perzentil)	(1,0/2,0)	(1,0/2,0)	(1,0/2,0)	

Kruskal-Wallis-Test, n = Anzahl, API = Approximaler Plaque Index, BOP = Bluten auf Sondieren, PDmax = maximale Sondiertiefe, CALmax = maximaler Attachmentverlust, \*= signifikant p<0,05

## 4.2 Nachweis bakterieller DNA

Die gepoolten subgingivalen Plaqueproben wurden sowohl in der Test- als auch in der Kontrollgruppe auf die DNA von fünf parodontpathogenen Markerkeimen hin untersucht. Dazu gehörten *A.a.*, *P.g.*, *P.i.*, *T.f.* und *T.d.*. Bei beiden Kohorten konnte die DNA aller Keime nachgewiesen werden. In der RA-Gruppe waren signifikant mehr Individuen positiv für *P.g.*, *T.f.* und *T.d.*. In der Kontrollgruppe waren signifikant mehr Probanden positiv für *A.a.* (Tabelle 3).

Tabelle 3: Anzahl bakterienpositiver Individuen bei gesunden und RA-Probanden

	keine RA und keine oder milde Parodontitis (n=89)	RA (n=107)	p-Wert
<i>Anzahl bakterienpositiver Individuen n (%)</i>			
<i>Aggregatibacter</i>			
<i>actinomycetemcomitans</i>	15 (16,9)	7 (6,7)	0,0272*
<i>Porphyromonas</i> <i>gingivalis</i>	19 (21,3)	46 (44,2)	0,0012*
<i>Prevotella intermedia</i>	27 (30,3)	25 (24,0)	0,326
<i>Tannerella forsythia</i>	61 (68,5)	85 (81,7)	0,0332*
<i>Treponema denticola</i>	55 (61,8)	70 (67,3)	0,424

Chi<sup>2</sup>-Test Person, n = Anzahl, \*=signifikant p<0,05

Innerhalb der RA-Gruppe waren Patienten mit schwerer PA signifikant häufiger positiv für *P.g.* im Vergleich zu Patienten, die keine/milde oder eine moderate PA aufwiesen. Dagegen kamen die Bakterien *P.i.* und *T.f.* häufiger bei RA-Patienten mit moderater PA vor (Tabelle 4).

Tabelle 4: Anzahl bakterienpositiver Individuen innerhalb der RA-Gruppe in Abhängigkeit vom Parodontalstatus

	RA ohne oder mit maximal milder Parodontitis (n=38)	RA mit moderater Parodontitis (n=40)	RA mit schwerer Parodontitis (n=29)	p-Wert
<i>Anzahl bakterienpositiver Individuen n (%)</i>				
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	2 (28,6)	2 (28,6)	3 (42,9)	0,571
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	7 (15,2)	18 (39,1)	21 (45,7)	<0,0001*
<i>Prevotella intermedia</i>	3 (12,0)	12 (48,0)	10 (40,0)	0,015*
<i>Tannerella forsythia</i>	26 (30,6)	33 (38,8)	26 (30,6)	0,029*
<i>Treponema denticola</i>	22 (31,4)	26 (37,1)	22 (31,4)	0,166

Chi<sup>2</sup>-Test Pearson, n = Anzahl, \*=signifikant p<0,05

#### 4.3 Nachweis der Serumspiegel für Anti-CCP und Anti-CEP-1 bei RA- Probanden und Kontrollprobanden ohne RA

Innerhalb der RA-Gruppe waren von insgesamt 107 Probanden 50 Anti-CEP-1-positiv und 67 Personen positiv für Anti-CCP. In der Kontrollgruppe war kein Proband Anti-CCP-positiv, aber drei Probanden waren positiv für Anti-CEP-1 (Abb.9).

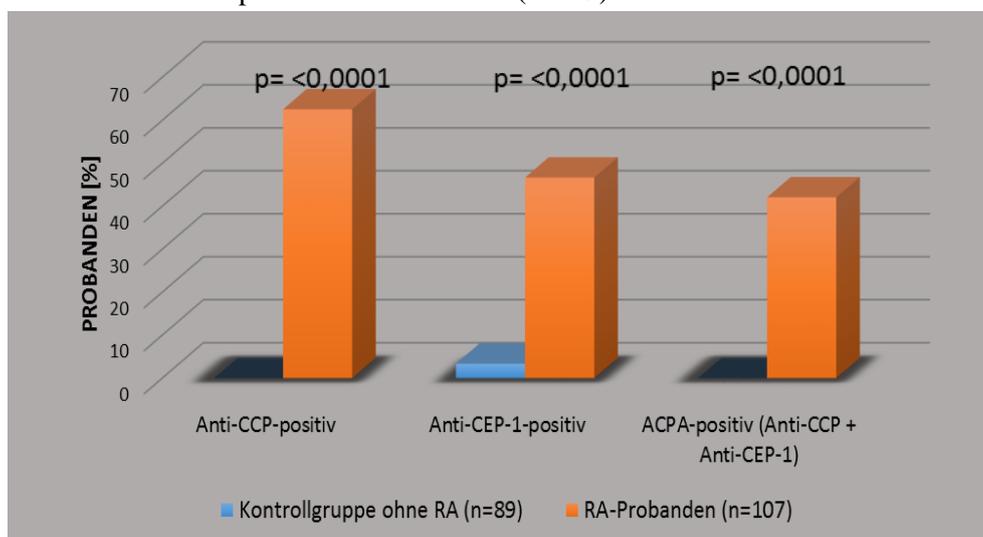


Abbildung 9: ACPAs in der Kontrollgruppe ohne RA mit milder PA im Vergleich zur RA-Gruppe

#### 4.3.1 Nachweis von Anti-CEP-1, Anti-CCP und ACPAs (Anti-CEP-1 + Anti-CCP) innerhalb der RA-Gruppe in Abhängigkeit vom parodontalen Befund

##### a) CDC-Klassifikation

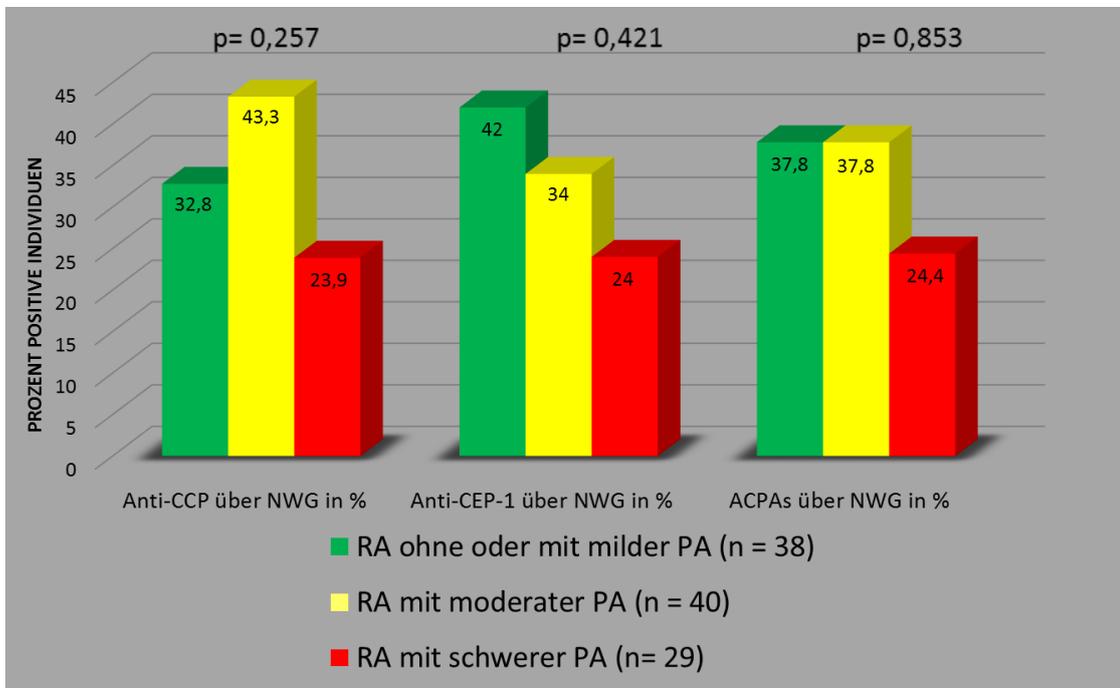


Abbildung 10: Prozentzahl von Probanden mit RA, die positiv für anti-CCP, anti-CEP-1 oder beide Antikörper (ACPA) waren in Abhängigkeit von der parodontalen Diagnose nach der CDC-Klassifikation (Chi<sup>2</sup>-Test – Pearson, n = Anzahl, NWG = Nachweisgrenze)

Abb.10 zeigt die Verteilung Anti-CCP- und Anti-CEP-1-positiver Individuen in Abhängigkeit vom parodontalen Befund nach der CDC-Klassifikation. Dabei ist zu erkennen, dass Patienten mit einer moderaten PA von der Tendenz häufiger Anti-CCP-positiv waren als Patienten mit keiner oder einer schweren PA. RA-Patienten mit keiner oder maximal milder PA waren von der Tendenz häufiger Anti-CEP-1-positiv. Patienten mit schwerer PA waren von der Tendenz am wenigsten häufig Anti-CEP-1, Anti-CCP oder für beide Antikörper positiv. Es konnte keine signifikante Assoziation zwischen der Schwere der parodontalen Erkrankung und der Expression von Anti-CEP-1- und Anti-CCP-Antikörpern festgestellt werden.

b) PESA (Periodontal Epithelial Surface Area)

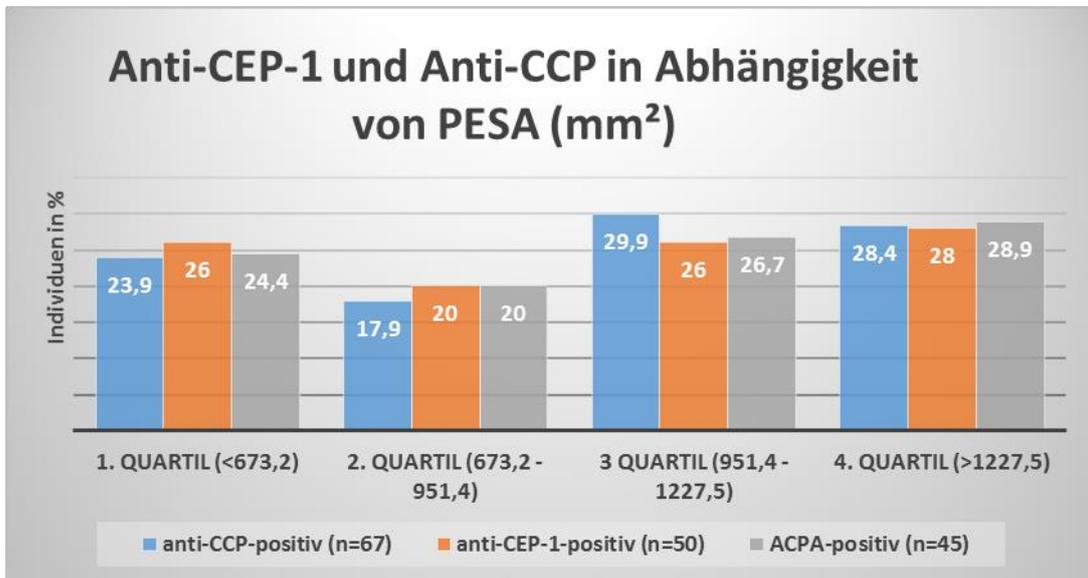


Abbildung 11: Prozentzahl von Probanden mit RA, die positiv für anti-CCP und anti-CEP-1 waren in Abhängigkeit vom PESA (mm<sup>2</sup>)

Beim PESA handelt es sich um eine weitere Einteilung, bei der speziell das von Parodontitis betroffene Epithelgewebe betrachtet wurde. Um die Beziehung zwischen der Schwere der parodontalen Erkrankung und der Bildung citrullinierter Antikörper zu untersuchen, wurden die berechneten PESA-Daten in Quartile unterteilt. Probanden mit den PESA-Werten im dritten und vierten Quartil waren von der Tendenz häufiger Anti-CCP- und ACPA (Anti-CEP-1 + Anti-CCP)-positiv. Patienten mit PESA-Werten im vierten Quartil waren am häufigsten ACPA-positiv. Da keine der beschriebenen Unterschiede signifikant waren, konnte keine Assoziation zwischen der Schwere der Parodontitis gemessen als PESA-Wert und der Bildung citrullinierter Antikörper nachgewiesen werden.

c) PISA (Periodontal Inflammation Surface Area)

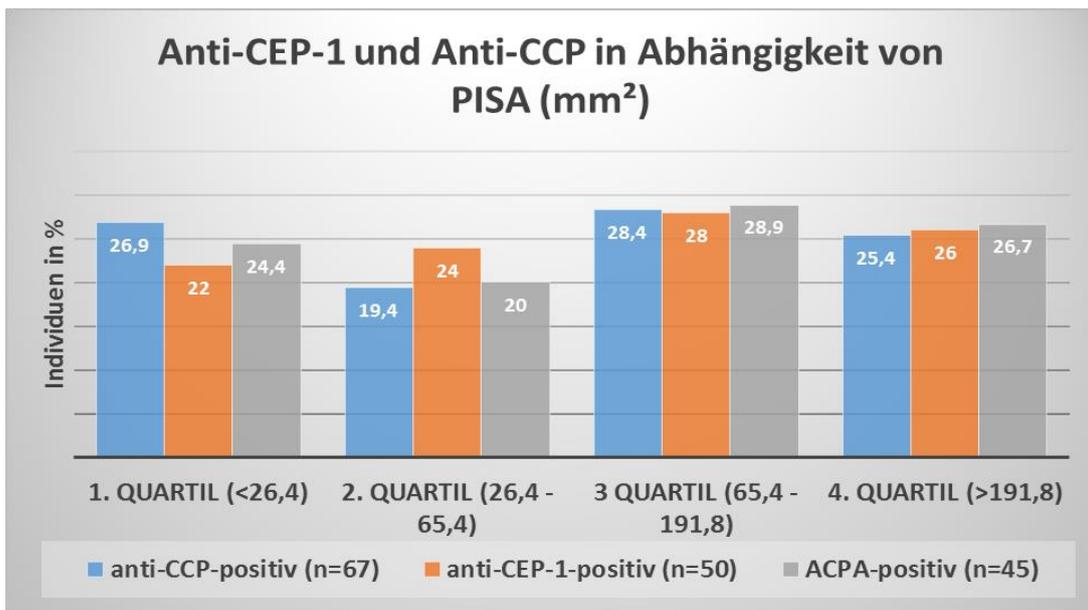


Abbildung 12: Prozentzahl von Probanden mit RA, die positiv für anti-CCP und anti-CEP-1 waren in Abhängigkeit vom PISA (mm<sup>2</sup>)

Der Wert PISA ist ein Modell zur Beschreibung des infolge einer Parodontitis entzündeten Gewebes. Auch dieser Wert wurde in Quartile unterteilt. Bei Patienten im dritten Quartil war die Prozentzahl Anti-CCP-, Anti-CEP-1- und ACPA-positiver Individuen am höchsten. Ähnlich wie bei der Berücksichtigung des PISA-Wertes konnten jedoch keine signifikanten Assoziationen gezeigt werden.

#### 4.4 Parodontale Leitkeime in Assoziation zum ACPA-Nachweis innerhalb der RA-Gruppe

Mögliche Assoziationen zwischen dem Nachweis der fünf parodontalen Markerkeime in der subgingivalen Plaque zum Serumspiegel für Anti-CCP und Anti-CEP-1 wurden anschließend untersucht. RA-Patienten mit dem Nachweis von *A.a.* waren gleichzeitig auch signifikant häufiger positiv für Anti-CCP (Abb.13). Der Nachweis aller anderen Bakterien war dagegen nicht signifikant mit den Serumspiegeln für Anti-CEP-1 und Anti-CCP assoziiert (Abb.13-17).

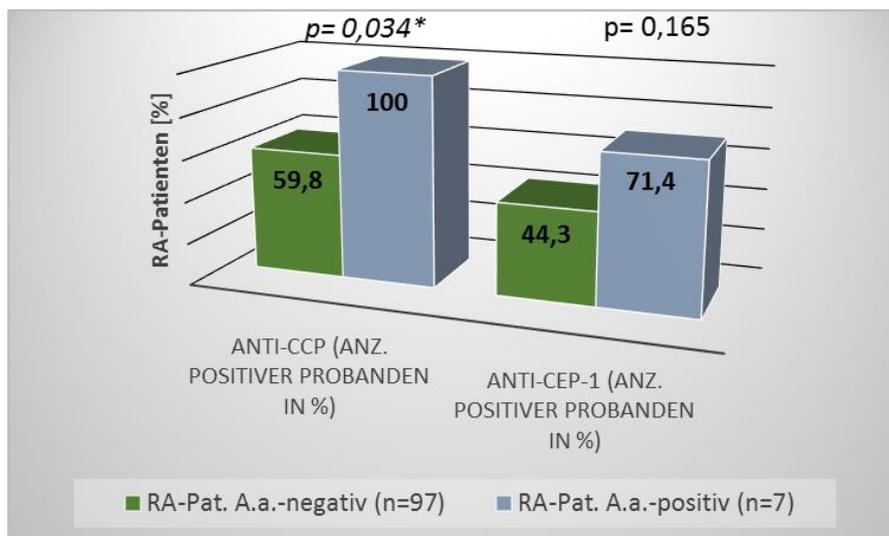


Abbildung 13: Nachweis von *A.a.* in Abhängigkeit von citrullinierten Antikörpern innerhalb der RA-Gruppe  
 \*=signifikant  $p < 0,05$ , Chi<sup>2</sup>-Test

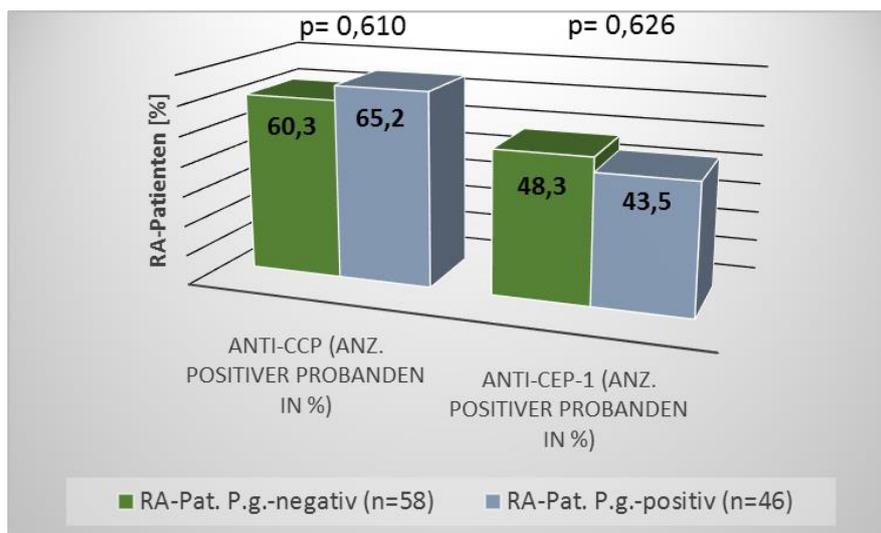


Abbildung 14: Nachweis von *P.g.* in Abhängigkeit von citrullinierten Antikörpern innerhalb der RA-Gruppe, Chi<sup>2</sup>-Test

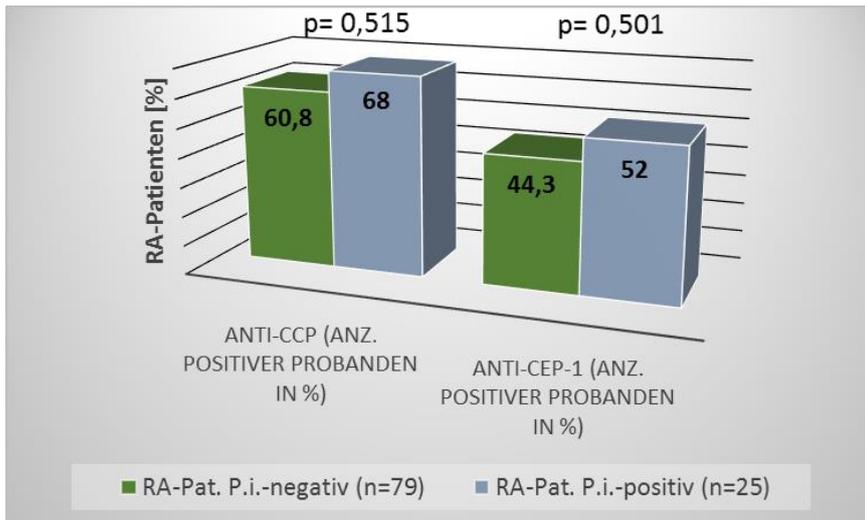


Abbildung 15: Nachweis von P.i. in Abhängigkeit von citrullinierten Antikörpern innerhalb der RA-Gruppe, Chi<sup>2</sup>-Test

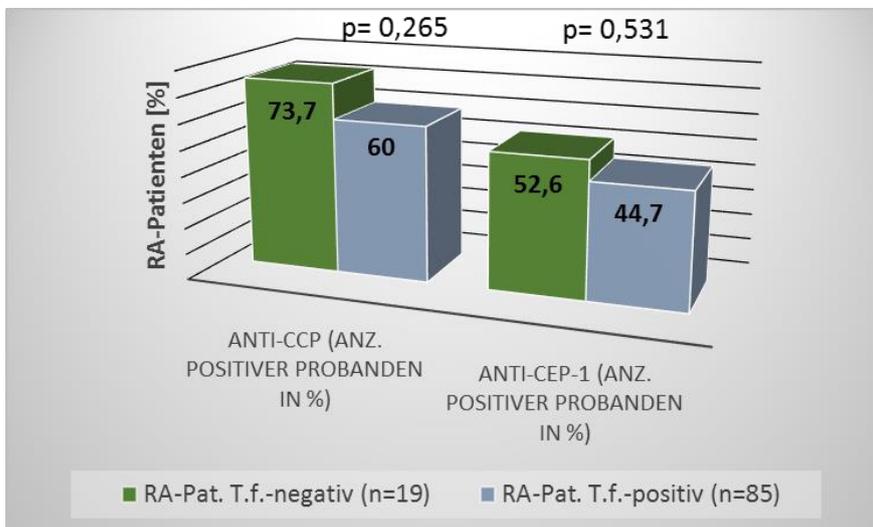


Abbildung 16: Nachweis von T.f. in Abhängigkeit von citrullinierten Antikörpern innerhalb der RA-Gruppe, Chi<sup>2</sup>-Test

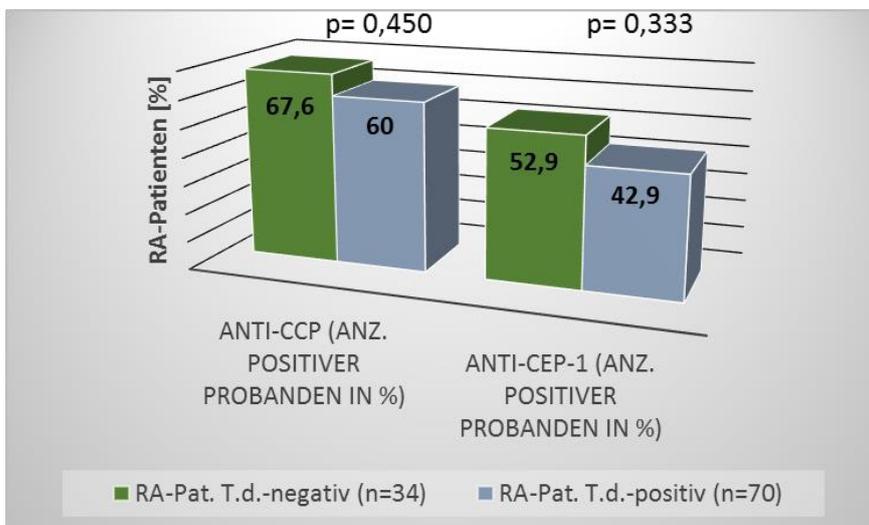


Abbildung 17: Nachweis von T.d. in Abhängigkeit von citrullinierten Antikörpern innerhalb der RA-Gruppe, Chi<sup>2</sup>-Test

## 4.5 Individuelle Expression von HLA-Klasse-II-Merkmalen in Assoziation zum Serumspiegel für Anti-CCP und Anti-CEP-1 innerhalb der RA-Gruppe

Zu den in dieser Studie untersuchten HLA-Merkmalen (Humane-Leukozyten-Antigene) der Klasse II gehörten die Allele HLA-DRB1\*01, \*04, \*07, \*08, \*09, \*10, \*11, \*13, \*14, \*15, \*16. Innerhalb der RA-Gruppe erhöhte die individuelle Expression von HLA-DRB1\*04 signifikant die Odds Ratio (OR) für einen positiven Anti-CCP- (unadjustierte OR = 3,120; 95% Konfidenzintervall: 1,329 - 7,324) (Abb.18) und Anti-CEP-1-Befund (unadjustierte OR= 3,663; 95% Konfidenzintervall: 1,589 - 8,444) (Abb.19). HLA-DRB1\*07- und \*13-positive RA-Patienten waren dagegen signifikant negativ zu Anti-CCP-Antikörpern (DRB1\*07:  $p=0,029$ ; unadjustierte OR = 0,226; 95% Konfidenzintervall: 0,04 - 0,797; DRB1\*13:  $p=0,009$ ; unadjustierte OR = 0,167; 95% Konfidenzintervall: 0,042 - 0,663 ) (Abb.18) assoziiert. HLA-DRB1\*13 war auch negativ zu Anti-CEP-1 ( $p=0,011$ ; unadjustierte OR=0,093; 95% Konfidenzintervall: 0,012 - 0,752) (Abb.19) Antikörpern assoziiert.

Um zufällig signifikante Ergebnisse bei Mehrfachvergleichen zu vermeiden, wurde die Bonferroni Korrektur angewandt. Die Assoziation von HLA-DRB1\*04- ( $p=0,168$ ), HLA-DRB1\*07 ( $p=0,348$ ) und HLA-DRB1\*13 ( $p=0,108$ ) zu positiven Anti-CCP Serumspiegeln waren danach nicht mehr signifikant.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich im Zusammenhang zwischen HLA-DRB1\*13 und Anti-CEP-1 ( $p=0,132$ ).

HLA-DRB1\*04 war jedoch auch nach der Bonferroni Korrektur signifikant zum Anti-CEP-1 Serumspiegel assoziiert ( $p=0,048$ ).

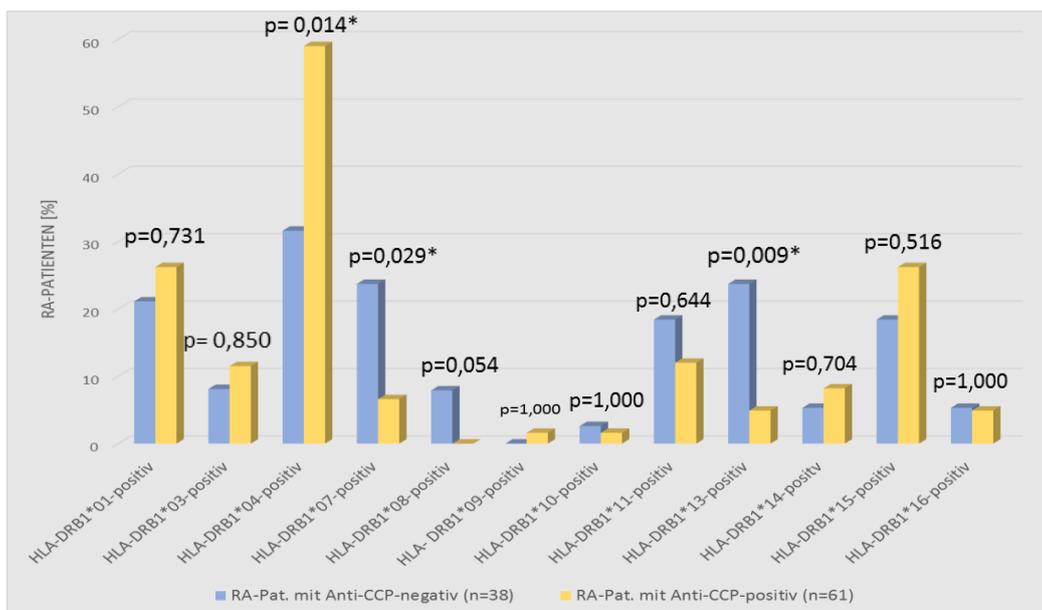


Abbildung 18: Prozentzahl Anti-CCP-positiver RA-Patienten in Abhängigkeit von HLA-DRB1-Allelen  $p$  berechnet mit  $\chi^2$ -Test, korrigiert nach Yates oder mit Fishers Exakt. Test, \*=signifikant

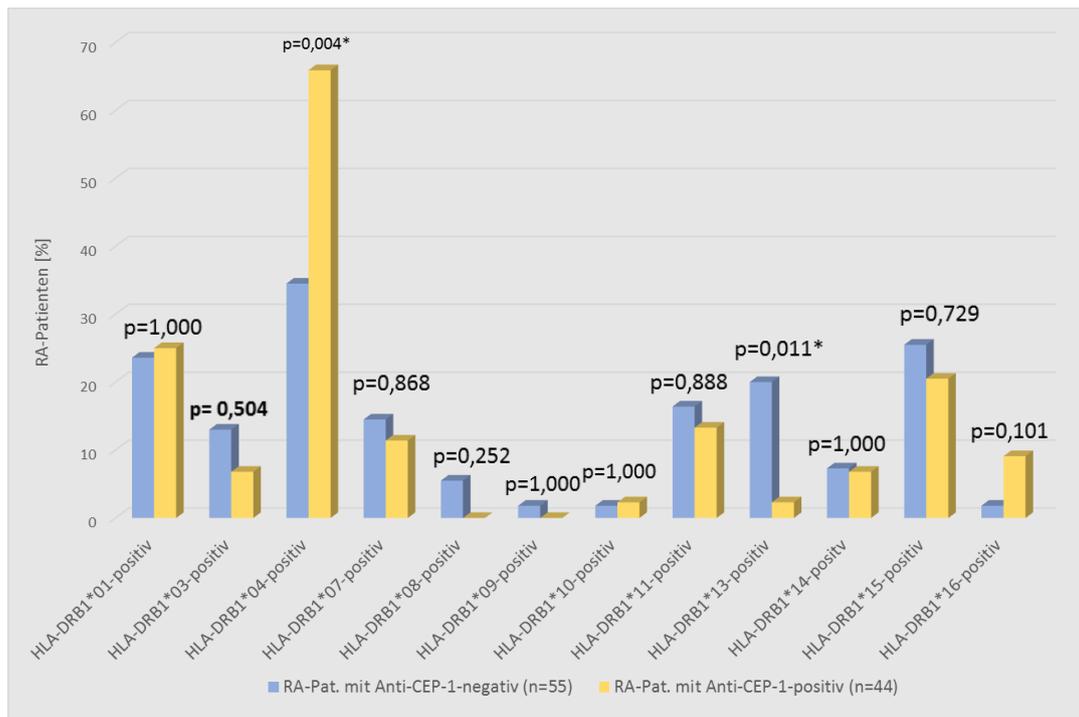


Abbildung 19: Prozentzahl Anti-CEP-1-positiver RA-Patienten in Abhängigkeit von HLA-DRB1-Allelen  
p berechnet mit Chi<sup>2</sup>-Test, korrigiert nach Yates oder mit Fishers Exakt-Test, \*=signifikant

#### 4.6 Zusammenhang zwischen der Gabe von antirheumatischen Medikamenten und dem Serumspiegel für Anti-CEP-1 und Anti-CCP

Die Medikamente der RA-Patienten können unterteilt werden in NSAIDs (Non-Steroidale-Antirheumatic-Drugs), Basistherapeutika, Vitamine und Biologika.

Innerhalb der RA-Gruppe wurde eine signifikante Assoziation zwischen den Basistherapeutika und Anti-CCP-Werten (unadjustierte OR=2,752; 95 % Konfidenzintervall: 1,164 6,507) ermittelt (Tabelle 5). Alle anderen Medikamente hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Bildung von Anti-CEP-1 und Anti-CCP Antikörpern (Tab.5-6).

Tabelle 5: Einnahme antirheumatischer Medikamente und ihre Auswirkungen auf den Anti-CCP-Serumspiegel

	RA-Patienten CCP-positiv (n=66)	RA-Patienten CCP-negativ (n=38)	p-Wert
NSAID (%) positive Probanden)	28 (42,4)	22 (57,9)	0,128

	<b>RA-Patienten CCP-positiv (n=66)</b>	<b>RA-Patienten CCP-negativ (n=38)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Basistherapeutika (% positive Probanden)</b>	51 (77,3)↑	21 (55,3)	0,019*
<b>Biologika (% positive Probanden)</b>	32 (48,5)	14 (36,8)	0,250
<b>Vitamine (% positive Probanden)</b>	43 (65,2)	24 (63,2)	0,838

NSAID = Nichtsteroidales Antirheumatikum, \* = signifikant

Tabelle 6: Einnahme antirheumatischer Medikamente und ihre Auswirkungen auf den Anti-CEP-1-Serumspiegel

	<b>RA-Patienten CEP- 1-positiv (n=49)</b>	<b>RA-Patienten CEP- 1-negativ (n=55)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>NSAID (% positive Probanden)</b>	24 (49,0)	26 (47,3)	0,862
<b>Basistherapeutika (% positive Probanden)</b>	38 (77,6)	34 (61,8)	0,083
<b>Biologika (% positive Probanden)</b>	22 (44,9)	24 (43,6)	0,897
<b>Vitamine (% positive Probanden)</b>	29 (59,2)	38 (69,1)	0,292

NSAID = Nichtsteroidales Antirheumatikum

#### 4.7 Multivariate Analysen zur Generation adjustierter Odds Ratios für einen positiven Anti-CEP-1- und Anti-CCP-Serumspiegel unter Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Innerhalb der RA-Gruppe war die Einnahme von Basistherapeutika (OR= 3,209; 95% Konfidenzintervall: 1,243 – 80281) sowie die individuelle Expression von HLA-DRB1\*04 (OR= 2,941; 95% Konfidenzintervall 1,177 – 7,353) mit einer erhöhten adjustierten Odds Ratio für einen Nachweis von Anti-CCP assoziiert (Tabelle 7). Nicht signifikant dagegen war der Einfluss des PA-Befundes (Tabelle 7 CDC, Tab. 8 PESA, Tab. 9 PISA).

Tabelle 7: Untersuchung möglicher Assoziationen der Variablen: Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Basistherapeutika, HLA-DRB1\*04, Parostatus nach CDC zum Nachweis von Anti-CCP im Serum

Variable	Regressions- koeffizient B	p- Wert	Odds Ratio	95% Konfidenzinter- vall für Exp (B)	
				Unterer Wert	Oberer Wert
<b>Alter zum Untersuchungszeitpunkt</b>	,009	,600	1,009	,976	1,043
<b>Geschlecht (weiblich)</b>	,114	,830	1,120	,396	3,168
<b>Raucherstatus (aktuell+ehemalig vs. Nichtraucher)</b>	,582	,217	1,790	,711	4,509
<b>Basistherapeutika</b>	1,166	,016*	3,209	1,243	8,281
<b>HLA-DRB1*04-positiv</b>	1,079	,021*	2,941	1,177	7,353
<b>PA CDC schwer vs. moderat und leicht</b>	-,616	,249	,540	,190	1,538
<b>Konstante</b>	-1,509	,205	,221		

vs. = versus, \* = signifikant

Tabelle 8: Untersuchung möglicher Assoziationen der Variablen: Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Basistherapeutika, HLA-DRB1\*04, PESA zum Nachweis von Anti-CCP im Serum

Variable	Regressionskoeffizient B	p- Wert	Odds Ratio	95% Konfidenzintervall für Exp (B)	
				Unterer Wert	Oberer Wert
<b>Alter zum Untersuchungszeitpunkt</b>	,017	,390	1,017	,979	1,056
<b>Geschlecht (weiblich)</b>	,261	,613	1,298	,472	3,566
<b>Raucherstatus (aktuell+ehemalig vs. Nichtraucher)</b>	,405	,398	1,499	,587	3,829
<b>Basistherapeutika</b>	1,092	,022*	2,979	1,168	7,597
<b>HLA-DRB1*04-positiv</b>	1,026	,030*	2,789	1,105	7,044
<b>PESA</b>	,001	,278	1,001	,999	1,002
<b>Konstante</b>	-2,674	,089	,069		

vs.= versus, \* = signifikant

Tabelle 9: Untersuchung möglicher Assoziationen der Variablen Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Basistherapeutika, HLA-DRB1\*04, PISA zum Nachweis von Anti-CCP im Serum

Variable	Regressionskoeffizient B	p- Wert	Odds Ratio	95% Konfidenzintervall für Exp (B)	
				Unterer Wert	Oberer Wert
<b>Alter zum Untersuchungszeitpunkt</b>	,007	,691	1,007	,974	1,040
<b>Geschlecht (weiblich)</b>	,270	,597	1,310	,481	3,564
<b>Raucherstatus (aktuell+ehemalig vs. Nichtraucher)</b>	,514	,273	1,672	,666	4,198
<b>Basistherapeutika</b>	1,081	,024*	2,949	1,150	7,559
<b>HLA-DRB1*04-positiv</b>	1,114	,017*	3,045	1,224	7,575
<b>PISA</b>	,000	,926	1,000	,997	1,003
<b>Konstante</b>	-1,609	,176	,200		

vs. = versus, \* = signifikant

HLA-DRB1\*04 war auch mit einer erhöhten adjustierten Odds Ratio für einen positiven Anti-CEP-1-Serumspiegel assoziiert (OR= 3,616; 95% Konfidenzintervall: 1,490 – 8,775) (Tab.10). Alle anderen Co-Faktoren einschließlich des Parodontalstatus nach der CDC-Klassifikation oder nach PESA/ PISA (Tab.11-12) hatten keinen signifikanten Einfluss auf den Anti-CEP-1-Serumspiegel.

*Tabelle 10: Untersuchung möglicher Assoziationen der Variablen Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Basistherapeutika, HLA-DRB1\*04, Parostatus nach CDC zum Nachweis von Anti-CEP-1 im Serum*

Variable	Regressionskoeffizient B	p- Wert	Odds Ratio	95% Konfidenzintervall für Exp (B)	
				Unterer Wert	Oberer Wert
<b>Alter zum Untersuchungszeitpunkt</b>	,001	,946	1,001	,969	1,034
<b>Geschlecht (weiblich)</b>	-,549	,299	,578	,205	1,625
<b>Raucherstatus (aktuell+ehemalig vs. Nichtraucher)</b>	,479	,297	1,614	,656	3,974
<b>Basistherapeutika</b>	,875	,077	2,399	,910	6,328
<b>HLA-DRB1*04-positiv</b>	1,285	,004*	3,616	1,490	8,775
<b>PA CDC schwer vs. moderat und leicht</b>	-,534	,322	,586	,204	1,687
<b>Konstante</b>	-1,271	,274	,281		

vs. = versus, \* = signifikant

Tabelle 11: Untersuchung möglicher Assoziationen der Variablen Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Basistherapeutika, HLA-DRB1\*04, PESA zum Nachweis von Anti-CEP-1 im Serum

Variable	Regressionskoeffizient B	p- Wert	Odds Ratio	95% Konfidenzintervall für Exp (B)	
				Unterer Wert	Oberer Wert
<b>Alter zum Untersuchungszeitpunkt</b>	-,002	,897	,998	,962	1,035
<b>Geschlecht (weiblich)</b>	-,403	,422	,668	,250	1,787
<b>Raucherstatus (aktuell+ehemalig vs. Nichtraucher)</b>	,450	,335	1,568	,629	3,913
<b>Basistherapeutika</b>	,825	,093	2,282	,871	5,974
<b>HLA-DRB1*04-positiv</b>	1,344	,004*	3,835	1,554	9,469
<b>PESA</b>	,000	,796	1,000	,999	1,001
<b>Konstante</b>	-1,152	,437	,316		

vs.= versus, \* = signifikant

Tabelle 12: Untersuchung möglicher Assoziationen der Variablen Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Basistherapeutika, HLA-DRB1\*04, PISA zum Nachweis von Anti-CEP-1 im Serum

Variable	Regressionskoeffizient B	p- Wert	Odds Ratio	95% Konfidenzintervall für Exp (B)	
				Unterer Wert	Oberer Wert
<b>Alter zum Untersuchungszeitpunkt</b>	,000	,995	1,000	,968	1,033
<b>Geschlecht (weiblich)</b>	-,396	,431	,673	,251	1,805
<b>Raucherstatus (aktuell+ehemalig vs. Nichtraucher)</b>	,395	,392	1,484	,601	3,664
<b>Basistherapeutika</b>	,801	,106	2,228	,844	5,881
<b>HLA-DRB1*04-positiv</b>	1,310	,004*	3,706	1,533	8,958
<b>PISA</b>	,000	,785	1,000	,998	1,003
<b>Konstante</b>	-1,426	,223	,240		

vs. = versus, \* = signifikant

Zur gleichzeitigen Bildung von Anti-CEP-1 und Anti-CCP war in den folgenden Berechnungen nur die Expression von HLA-DRB1\*04 assoziiert. Die Variablen zur Bezeichnung der Schwere der PA waren dagegen nicht mehr mit der ACPA-Bildung assoziiert (Tab.13-15).

Tabelle 13: Untersuchung möglicher Assoziationen der Variablen Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Basistherapeutika, HLA-DRB1\*04, Parostatus nach CDC zum Nachweis von ACPA im Serum

Variable	Regressionskoeffizient B	p- Wert	Odds Ratio	95% Konfidenzintervall für Exp (B)	
				Unterer Wert	Oberer Wert
<b>Alter zum Untersuchungszeitpunkt</b>	,010	,547	1,010	,977	1,045
<b>Geschlecht (weiblich)</b>	-,603	,259	,547	,192	1,560
<b>Raucherstatus (ehemalig+aktuell vs. Nichtraucher)</b>	,465	,321	1,593	,636	3,990
<b>Basistherapeutika</b>	1,017	,051	2,765	,997	7,667
<b>HLA-DRB1*04-positiv</b>	1,246	,007*	3,477	1,400	8,634
<b>PA CDC schwer vs. moderat und leicht</b>	-,521	,343	,594	,202	1,744
<b>Konstante</b>	-2,068	,092	,126		

vs. = versus, \* = signifikant

Tabelle 14: Untersuchung möglicher Assoziationen der Variablen Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Basistherapeutika, HLA-DRB1\*04, PESA zum Nachweis von ACPA im Serum

Variable	Regressionskoeffizient B	p- Wert	Odds Ratio	95% Konfidenzintervall für Exp (B)	
				Unterer Wert	Oberer Wert
<b>Alter zum Untersuchungszeitpunkt</b>	,013	,505	1,013	,975	1,053
<b>Geschlecht (weiblich)</b>	-,461	,365	,631	,233	1,708
<b>Raucherstatus (ehemalig+aktuell vs. Nichtraucher)</b>	,358	,450	1,431	,564	3,628
<b>Basistherapeutika</b>	,964	,062	2,621	,952	7,215
<b>HLA-DRB1*04-positiv</b>	1,248	,008*	3,483	1,390	8,731
<b>PESA</b>	,000	,684	1,000	,999	1,001
<b>Konstante</b>	-2,608	,102	,074		

vs.= versus, \* = signifikant

Tabelle 15: Untersuchung möglicher Assoziationen der Variablen Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Basistherapeutika, HLA-DRB1\*04, PISA zum Nachweis von ACPA im Serum

Variable	Regressionskoeffizient B	p- Wert	Odds Ratio	95% Konfidenzintervall für Exp (B)	
				Unterer Wert	Oberer Wert
<b>Alter zum Untersuchungszeitpunkt</b>	,010	,573	1,010	,976	1,044
<b>Geschlecht (weiblich)</b>	-,448	,380	,639	,235	1,735
<b>Raucherstatus (ehemalige+aktuell vs. Nichtraucher)</b>	,364	,439	1,440	,572	3,622
<b>Basistherapeutika</b>	,939	,072	2,556	,920	7,106
<b>HLA-DRB1*04-positiv</b>	1,272	,006*	3,568	1,443	8,822
<b>PISA</b>	,001	,680	1,001	,998	1,003
<b>Konstante</b>	-2,256	,069	,105		

vs. = versus, \* = signifikant

#### 4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Vergleicht man RA-Probanden mit den Kontrollprobanden ohne RA, ist eindeutig nachgewiesen, dass RA-Probanden signifikant häufiger positiv für Anti-CCP (62,6% vs. 0%,  $p < 0,0001$ ), anti-CEP-1 (46,7% vs. 3,4%,  $p < 0,0001$ ) sowie den gemeinsamen Nachweis beider ACPAs (42,1% vs. 0%,  $p < 0,0001$ ) waren. Es ist zu schlussfolgern, dass Anti-CCP- bzw. Anti-CEP-1-spezifische Parameter für eine RA sind und unter Probanden ohne RA nur sehr selten auftreten. Die schon publizierte Normalverteilung liegt bei Probanden ohne RA bzgl. Anti-CEP-1-Antikörpern bei 2-3% [59] und bzgl. Anti-CCP-Antikörpern bei weniger als 2% [47].

Des Weiteren wurde angenommen, dass RA-Patienten mit einer schweren PA häufiger einen Anti-CEP-1- und Anti-CCP-positiven Serumspiegel aufweisen. Dies bestätigte sich nicht. Innerhalb der RA-Gruppe war die Schwere der PA, beurteilt nach der CDC-Klassifikation, nach PESA und PISA nicht mit der Bildung citrullinierter Antikörper assoziiert.

Da Bakterien in der Ätiologie der PA eine große Rolle spielen, wurden die RA-Individuen mit positivem Bakterienbefund der gesunden Kontrollgruppe gegenübergestellt und ein Zusammenhang zu der Bildung citrullinierter Antikörper untersucht. In der RA-Gruppe wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne RA häufiger *P. g.* (44,2% vs. 21,3%,  $p = 0,001$ ), *T. f.* (81,7% vs. 68,5%,  $p = 0,033$ ) und *T. d.* (67,3% vs. 61,8%,  $p = 0,424$ ) nachgewiesen, während *A. a.* häufiger unter den Kontrollprobanden ohne RA nachgewiesen wurde (16,9% vs. 6,7%,  $p = 0,027$ ). Innerhalb der RA-Gruppe war *P. g.* mit schwerer PA assoziiert (15,2% vs. 39,1% vs.

45,7%,  $p = < 0,0001$ ). Die ursprüngliche Hypothese, dass besonders *P. g.* als parodontaler Leitkeim bei RA-Patienten vorkommt und über die eigens gebildete PPAD die Bildung citrullinierter Antikörper befördert, konnte durch die Ergebnisse unserer Arbeit nicht unterstützt werden. RA-Patienten mit positivem *P.g.* Befund waren nicht signifikant häufiger positiv für Anti-CEP-1 ( $p = 0,626$ ) und Anti-CCP ( $p = 0,610$ ) als RA-Patienten, bei denen *P.g.* in der subgingivalen Plaque nicht nachgewiesen wurde.

Allerdings wiesen wir innerhalb der RA-Gruppe nach, dass alle Patienten, bei denen *A.a.* in der subgingivalen Plaque nachgewiesen wurde, auch seropositiv für Anti-CCP waren ( $p = 0,034$ ). Auf genetischer Ebene wurde nachgewiesen, dass RA-Patienten, die Träger von HLA-DRB1\*04 waren, signifikant häufiger auch positiv für citrullinierte Antikörper waren. Diese Assoziation konnte sowohl für Anti-CCP ( $p = 0,014$ ) als auch für Anti-CEP-1 ( $p = 0,004$ ) sowie den gleichzeitigen Nachweis beider Antikörper ( $p = 0,007$ ) gezeigt werden. Zusätzlich konnten signifikant negative Assoziationen zwischen RA-Probanden mit positivem HLA-DRB1\*07-Befund zu Anti-CCP-Serumspiegeln ( $p = 0,029$ ) sowie signifikant negative Assoziationen zwischen positivem HLA-DRB1\*13-Befund zu Anti-CCP ( $p = 0,009$ ) und Anti-CEP-1 ( $p = 0,011$ ) ermittelt werden. Diese Befunde waren jedoch nach Bonferroni-Korrektur nicht mehr signifikant.

Eine weitere Betrachtung hinsichtlich der Einnahme bestimmter antirheumatischer Medikamente erbrachte die Erkenntnis, dass Basistherapeutika signifikant assoziiert sind zu positiven Anti-CCP-Serumspiegeln ( $p = 0,019$ ).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass HLA-DRB1\*04 und der Nachweis von *A. a.* mit erhöhten Antikörpertitern gegen citrullinierte Peptide assoziiert sind. Das Krankheitsbild einer schweren PA erwies sich jedoch nicht als signifikanter Einflussfaktor für den Nachweis von Anti-CCP- oder Anti-CEP-1-Antikörpern (Tab. 16).

*Tabelle 16: Zusammenfassung der innerhalb der RA-Gruppe ermittelten Assoziationen zwischen parodontologisch-klinischen und genetischen Parameter zum Serumnachweis für Anti-CEP-1, Anti-CCP und ACPA (Anti-CEP-1 + Anti-CCP)*

<b>Variable</b>	<b>Assoziation zu Anti-CEP-1</b>	<b>Assoziation zu Anti-CCP</b>	<b>Assoziation zu ACPA (Anti-CEP-1 + Anti-CCP)</b>
<b>RA</b>	Ja	Ja	Ja

<b>Variable</b>	<b>Assoziation zu Anti-CEP-1</b>	<b>Assoziation zu Anti-CCP</b>	<b>Assoziation zu ACPA (Anti-CEP-1 + Anti- CCP)</b>
<b>Parodontitis innerhalb der RA-Gruppe</b>			
<b>CDC-Klassifikation</b>	Nein	Nein	Nein
<b>PESA</b>	Nein	Nein	Nein
<b>PISA</b>	Nein	Nein	Nein
<b>Parodontale Bakterien</b>			
<i>A.a.</i>	Nein	Ja	Nein
<i>P.g.</i>	Nein	Nein	Nein
<i>P.i.</i>	Nein	Nein	Nein
<i>T.f.</i>	Nein	Nein	Nein
<i>T.d.</i>	Nein	Nein	Nein
<b>HLA-Merkmale</b>			
<b>HLA-DRB1*04</b>	Ja	Ja	Ja
<b>HLA-DRB1*07</b>	Nein	Ja (negative Assoziation)*	Nein
<b>HLA-DRB1*13</b>	Ja (negative Assoziation)*	Ja (negative Assoziation)*	Ja (negative Assoziation)*
<b>Andere Klasse-II- Merkmale</b>	Nein	Nein	Nein

<b>Variable</b>	<b>Assoziation zu Anti-CEP-1</b>	<b>Assoziation zu Anti-CCP</b>	<b>Assoziation zu ACPA (Anti-CEP-1 + Anti- CCP)</b>
<b>Einnahme bestimmter Rheumamedikamente</b>			
<b>NSAIDs</b>	Nein	Nein	Nein
<b>Basistherapeutika</b>	Nein	Ja	Nein, aber Tendenz
<b>Biologika</b>	Nein	Nein	Nein
<b>Vitamine</b>	Nein	Nein	Nein

\* keine Signifikanz nach Bonferroni-Korrektur

## 5. Diskussion

Die PA gehört zu den häufigsten Volkskrankheiten. In Deutschland leidet jeder fünfte der 65 bis 74-Jährigen darunter. Ebenso neigt bereits jeder zwölfte der 35 bis 44-jährigen Menschen zu Parodontitiden [42].

Als für die Ätiologie der PA entscheidend wird eine Dysbiose der vorherrschenden Parodontalkeime im Biofilm angesehen. Dadurch erhöht sich die Pathogenität des Biofilms. Die Pathogenese der Parodontitis wird durch eine Reihe von Risikofaktoren, wie z.B. mangelnde Mundhygiene, Rauchen, Allgemeinerkrankungen, die zu einer Verschlechterung des Abwehrvermögens führen können, und genetische und epigenetische Faktoren beeinflusst.

Zu den Allgemeinerkrankungen, für die eine Wechselbeziehung zur PA bekannt ist, zählen z.B. der Diabetes mellitus Typ I oder Typ II sowie die RA. Der Einfluss der PA auf diese Allgemeinerkrankungen kann durch parodontale Leitkeime, die von der Mundhöhle in den Körper gelangen können, möglich sein. Aarabi et al., 2018 stellten heraus, dass **a) orale Bakterien** in der Lage sind in den Blutstrom oder in die Lymphe zu gelangen. Dadurch wäre z.B. eine direkte Gefäßschädigung durch parodontale Bakterien denkbar. Zum anderen führt eine PA zum **b) Anstieg von Entzündungsparametern** wie proinflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) oder in der Leber gebildeten Akute-Phase-Proteinen wie CRP und Fibrinogen. Es wird vermutet, dass diese Entzündungsmarker auch proatherogen wirken können. Des Weiteren ist es denkbar, dass die durch orale Bakterien **c) induzierte Immunantwort des Wirts** auch zu Autoimmunprozessen führen kann. Schließlich könnten **d) von Bakterien selbst abgegebene Stoffe**, wie z.B. das von *A.a.* produzierte LtxA, oder die von *P.g.* produzierte PPAD nicht nur zur Schädigung von Leukozyten führen, sondern auch proatherogen wirken [1].

Durch den Kauvorgang oder das tägliche Zähneputzen können z.B. *P. g.* und *A. a.* in die Lunge [9, 47], in Koronargefäße [16, 121] oder in Gelenke gelangen [80, 90]. Trotz der beschriebenen Pathomechanismen ist nicht ausgeschlossen, dass die gezeigten Assoziationen zwischen Parodontitis und einigen Allgemeinerkrankungen auch darauf beruhen, dass beide Erkrankungen gemeinsame Risikofaktoren teilen.

Ziel dieser Studie ist es gewesen, unter Patienten mit RA zu untersuchen, ob die Schwere der parodontalen Erkrankung mit dem Nachweis von Anti-CCP und Anti-CEP-1 assoziiert ist. Dabei sollten auch die beiden Einflussfaktoren, lokale Infektion mit fünf parodontalen Leitkeimen und das individuelle HLA-DRB1\* Muster, berücksichtigt werden. Bislang gibt es

keine Studie, die den Einfluss klinisch parodontologischer, mikrobiologischer und genetischer Faktoren auf den Serumspiegel von Anti-CCP und Anti-CEP-1 gleichzeitig betrachtete.

## 5.1 Methodendiskussion

Für die Studie wurden 77 RA-Probanden innerhalb von 15 Monaten in drei internistischen Praxen rekrutiert. 30 Probanden stammen aus einer vorher durchgeführten Studie [30]. Diese wurden parodontal untersucht und nach der international vergleichbaren CDC-Klassifikation unterteilt. Die Anzahl der Probanden in den drei Diagnosegruppen war relativ homogen verteilt (keine oder milde PA: n= 38, moderate PA: n= 40, schwere PA: n= 29). Die CDC-Klassifikation stellt eine gängige, aber doch recht grobe Einteilung der Schwere und Ausbreitung der Parodontitis dar, da Zwischenstufen nicht erfasst werden.

Die Sondierblutung wird bei der CDC-Einteilung außerdem nicht berücksichtigt. Daher wurde die Bestimmung der PESA- und PISA-Werte angeschlossen. Der größte Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Fläche des von Parodontitis betroffenen Epithels (PESA) einschließlich des entzündeten Anteils (PISA) abgeschätzt werden kann. Außerdem lagen nun zur Definition der Parodontitis keine kategorialen sondern metrische Variablen vor.

Die Rekrutierung der Studienprobanden gestaltete sich als sehr schwierig. Viele Patienten mit RA waren zusätzlich an Diabetes oder koronaren Herzerkrankungen erkrankt. Dies führte zum Studienausschluss. Einige wiesen für die Studienteilnahme eine nicht mehr ausreichende Anzahl von Zähnen auf. Des Weiteren waren nicht alle Patienten bereit an einer Studie teilzunehmen, da sie darin keinen Vorteil für sich sahen. Eine finanzielle Entschädigung konnte nicht angeboten werden. Um die Probandenanzahl zu erhöhen, wurden RA-Patienten an verschiedenen Rheumazentren rekrutiert und parallel zur Rheumasprechstunde parodontal untersucht. Die damit verbundene Reisetätigkeit erforderte einen enormen Aufwand durch die Untersucherin, ersparte den Patienten aber einen Extratermin zur zahnärztlichen Untersuchung in der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie in Halle. Dies trug im Wesentlichen dazu bei, dass sich viele RA-Probanden, die häufig ärztliche Termine wahrnehmen müssen, für die Studienteilnahme entschieden. Nachteilig war, dass eine zahnärztliche Einheit für die Untersuchung der Studienprobanden in den verschiedenen Rheumazentren nicht zur Verfügung stand. Jedoch gab es Untersuchungsliegen, die genutzt werden konnten. Um die Nachteile einer fehlenden zahnärztlichen Einheit auszugleichen, erfolgte die parodontale Untersuchung unter Tageslicht. Um die Anzahl der RA-Probanden auf mindestens n=100 zu erhöhen, wurden 30 Patienten einer bereits publizierten Studie [30] unserer Arbeitsgruppe mit eingeschlossen. Die Kontrollprobanden ohne RA stammten ebenfalls von einer bereits publizierten Studie unserer Arbeitsgruppe [85]. Da an der parodontalen Untersuchung der verschiedenen Gruppen mehrere Untersucher (Rheumagruppe = 2

Untersucher, Probanden ohne RA = 4 Untersucher) beteiligt waren, sind Interrater-Differenzen nicht ausgeschlossen. Alle Untersucher wurden jedoch anhand von Phantommodellen (A-PB frasaco GmbH, Tettngang, Deutschland) in der Anwendung der PA-Sonden geschult und klinisch trainiert. Doppelmessungen zur Kalibrierung der Untersucher wurden jedoch nicht durchgeführt.

Die eingeschlossenen RA-Patienten umfassten sowohl Neuerkrankte als auch lange an RA leidende Patienten. Der Mittelwert der Erkrankungszeit lag bei 32,86 Monaten. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Erkrankungszeit und dem ACPA-Spiegel nachgewiesen werden. Jedoch ist nicht ausgeschlossen, dass eine lange medikamentöse Therapie mit Antirheumatika den ACPA-Serumspiegel beeinflusst. Deshalb wurde die Einnahme dieser Medikamente in der multivariaten Analyse berücksichtigt.

Mit dem microIdent®-Test konnte die DNA von fünf verschiedenen Parodontalkeimen (*A.a.*, *P.g.*, *T.f.*, *P.i.*, *T.d.*) nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass durch die Nutzung von Tests, die ein größeres Keimspektrum erfassen, neben der Assoziation von *A.a.* zu Anti-CCP noch weitere Assoziationen zwischen parodontopathogenen Bakterien und Anti-CCP oder Anti-CEP-1 Serumentern gefunden werden könnten. Bei molekularbiologischen Tests, wie dem auch in dieser Studie verwendeten, wird nur die bakterielle DNA nachgewiesen. Aussagen über die Vitalität der nachgewiesenen Bakterien sind nicht möglich. Deshalb könnte der von uns verwendete molekularbiologische Test in seinen Aussagen begrenzt sein.

Bisher wurde die Citrullinierung humaner Gewebe nur durch vitale Bakterien des Leitkeims *P.g.* nachgewiesen. Es wurde u.a. gezeigt, dass Mäuse mit verschiedenen vitalen *P.g.*-Strängen wie W83 oder 2561 infiziert wurden und diese dann mehr citrullinierte Peptide aufwiesen im Vergleich zu nichtinfizierten Mäusen [39].

Wünschenswert wäre die Möglichkeit gewesen, Antikörper gegen Parodontitisbakterien nachweisen zu können. Dadurch wäre die Aussage möglich, ob eine Kolonisation dieser Bakterien in der parodontalen Tasche tatsächlich auch eine Immunreaktion hervorgerufen hätte. Weiterhin hätte dann die Möglichkeit bestanden, den Antikörpertiter gegen Parodontitisbakterien in Assoziation zum Anti-CCP- und Anti-CEP-1-Serumspiegel zu setzen.

Engström erläutert dagegen in ihrer 2018 erschienenen Studie, dass die Citrullinierung unabhängig von den Bakterien *P.g.* und *A.a.* abläuft. Ihrer Meinung nach sind die Virulenzfaktoren dieser Leitkeime ausschlaggebend, bei *P.g.* die PPAD und bei *A.a.* das LtxA [20].

Die untersuchten citrullinierten Antikörper gehören zur Gruppe der ACPA's. Bereits in den 90er Jahren wurden Anti-CCP-Tests im Labor angewendet. Anti-CCP entspricht einem synthetisch hergestellten citrulliniertem Peptid. Über mehrere Jahre wurde der Test hinsichtlich seiner

Spezifität und Sensitivität optimiert. Heute beträgt die Spezifität eines positiven Anti-CCP-Tests für RA etwa 97% und die Sensitivität liegt bei 79% [115]. Des Weiteren können Anti-CCP-Antikörper bereits Jahre vor Ausbruch einer RA nachgewiesen werden. Durch Anwendung dieses Tests besteht die Möglichkeit, Risikopatienten frühzeitig zu erkennen und zu behandeln. Größere Schäden, wie abnorme Gelenkdeformationen könnten vermieden werden. Somit würde auch die Berufsfähigkeit weitestgehend erhalten bleiben und es würden weniger Kosten für das Gesundheitssystem entstehen. Mittlerweile kann mit Hilfe der Anti-CCP-Bestimmung eine bessere Abgrenzung gegenüber anderen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, wie z.B. Lupus erythematoses und Sjögren-Syndrom erreicht werden. Dies gelang durch die Ermittlung des RF nicht immer. Der RF gehört zur Gruppe der IgM-Antikörper und weist eine geringere Spezifität von 62% und eine ähnliche Sensitivität von 78% auf [115].

Die Entscheidung Anti-CEP-1 ebenfalls in die vorliegende Studie einzubeziehen, unterlag dem Wissen, dass mit dem synthetisch produzierten Anti-CCP bestehende ACPAs nachgewiesen werden können, aber Anti-CCP so nicht im humanen Gewebe vorkommt. Dagegen liegt mit Anti-CEP-1 ein Antikörper vor, der direkt im humanen Gewebe (in vivo) gegen citrullinierte  $\alpha$ -Enolase gebildet wird [59]. Bisher besteht bei den folgend aufgeführten vier Antigenen der Verdacht, die Ätiologie der RA entscheidend zu beeinflussen: citrulliniertes Fibrinogen (Akute-Phase-Protein), citrulliniertes Vimentin (Teil des Zytoskeletts), citrulliniertes Kollagen Typ II (faserbildend in Knorpel) und citrullinierte  $\alpha$ -Enolase (glykolytisches Enzym). Insbesondere das verantwortliche Epitop der  $\alpha$ -Enolase, bestehend aus fünf Aminosäuren, hat eine besondere Relevanz bei der Bindung zu den HLA-Molekülen [60]. Antikörper, die an die immundominanten Epitope der humanen Enolase binden, können auch mit der bakteriellen Enolase von *P.g.* kreuzreagieren [111].

Anti-CEP-1-Antikörper gehören wie Anti-CCP-Antikörper zur Gruppe der IgG-Antikörper, weisen eine Spezifität von 97% und eine Sensitivität von 50% auf und wurden 2005 im Rahmen der Studie von Lundberg et al. bei 37-62% der RA-Patienten nachgewiesen [60]. Jedoch konnte anti-CEP-1 nur bei 2-3% der Individuen nachgewiesen werden, bei denen sich erst später eine RA entwickelte [59].

England wies in seinem Review von 2017 auf die pathogene Rolle der ACPAs hin. Allein die citrullinierten Antikörper können keine RA auslösen, jedoch die Entwicklung und Schwere dieser Erkrankung fördern. Drei Mechanismen unterschied er dabei:

- a) Aktivierung von Entzündungszellen durch ACPA-Immunkomplexe
- b) ACPA geförderter Zelltod der neutrophilen Zellen und in der Folge Entstehung von NETs → Freisetzung citrullinierter Antigene → Autoimmunität
- c) direkte Bindung der ACPAs an die Osteoklasten und somit die Förderung des Knochenabbaus [19].

Eine weitere pathogene Rolle der ACPAs beschreibt Gertel in seiner jüngst erschienenen Studie. ACPAs sollen die Produktion von IL-1 $\beta$  und IL-6 fördern [25]. Beides sind Zytokine, die die Entzündungsreaktion stark beeinflussen. IL-1 $\beta$  befördert die Akkumulation neutrophiler Zellen und die Produktion von Akute-Phase-Proteinen sowie des IL-6.

IL-6 wiederum sorgt ebenso für die Erhöhung von Akute-Phase-Proteinen und stimuliert die Ansammlung der Lymphozyten.

HLA-DRB1-Allele gehören zur Klasse II der HLA-Merkmale und werden auf der Oberfläche antigenproduzierender Zellen exprimiert. HLA-Klasse-II-Moleküle präsentieren Peptidfragmente von Proteinen und Krankheitserregern, die von Makrophagen oder dendritischen Zellen internalisiert werden – u.a. CD4 positiven, T<sub>H</sub>2-Zellen, die daraufhin B-Zellen zur Differenzierung in Plasmazellen und Antikörperproduktion anregen können. Die Bindung citrullinierter Peptidfragmente ist HLA-restriktiv. Dies bedeutet, dass ihre Bindung durch bestimmte HLA-Moleküle (z.B. HLA-DRB1\*04) besser erfolgt als durch andere (z.B. HLA-DRB1\*13). Araújo et al. haben in ihrer Meta-Analyse von 2015 zusammenfassen können, dass RA-Patienten häufiger positiv für HLA-DRB1\*01, \*04 und \*10 waren [2].

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Anti-CCP- und Anti-CEP-1-Daten bei RA-Patienten im Vergleich zu Kontrollprobanden ohne RA

Mit Einsetzen der synthetischen Peptide (CCP2) als Antigene bei Tests zur Diagnostik der RA wurde vor allem die Spezifität von 85% auf 96-98% verbessert, bei einer gleichbleibenden Sensitivität von 65-70% [113]. Die synthetischen Peptide zeichnen sich durch ihre Ringstruktur aus. Diese wurde durch eine intramolekulare Disulfid-Brückenbindung erreicht. Positiv wirkt sich ein frühzeitiger Einsatz dieses Tests bei Patienten aus, die erste Symptome einer RA aufweisen. Somit kann eine noch nicht klinisch manifeste RA diagnostiziert und ein erosiver Verlauf der Erkrankung vermieden werden [114].

Die citrullinierte  $\alpha$ -Enolase ist ein weiteres relevantes citrulliniertes Antigen, das in dem Synovialgewebe RA-Erkrankter gefunden wurde. Beachtlich ist die Spezifität von 97,1%, was bei einer Patientengruppe mit früher RA herausgefunden wurde [97]. Die Sensitivität dieses Tests liegt bei ca. 50% [62].

Die RA-Probanden unserer Studie waren häufiger Anti-CCP- (n=67, 62,6%) als Anti-CEP-1- (n=50, 46,7%) positiv. In unserer Kohorte der RA-Patienten wiesen also beide Tests niedrigere Ergebnisse in der Sensitivität im Vergleich zu früheren Publikationen auf.

Dies kann z.B. dadurch begründet sein, dass die RA-Patienten hinsichtlich der die Erkrankung

auslösenden und beeinflussenden Faktoren, des Erkrankungsbeginns, der Erkrankungsdauer und des Therapieregimes nicht homogen waren.

Bei Probanden ohne RA liegt die schon publizierte Prävalenz der Anti-CCP-Antikörper unter 2% [47] und die der Anti-CEP-1-Antikörper bei 2-3% [59]. Unsere Kontrollgruppe wurde daraufhin selektiert, sowohl keine RA als auch keine schwere Parodontitis zu haben, da wir annahmen, dass Parodontitis die Bildung von ACPAs befördert. In unserer Kontrollgruppe konnten wir keine Anti-CCP-Antikörper nachweisen und lagen somit unterhalb der publizierten Normalverteilung. Dagegen entsprach der Nachweis von Anti-CEP-1-Antikörpern in unserer Kontrollgruppe mit 3,4% in etwa der Normalverteilung.

### 5.2.2 Klinischer Vergleich RA versus Kontrollgruppe

Einige Studien belegen, dass eine schwere PA mit RA assoziiert ist [5, 11, 22, 102]. Die RA-Patienten unserer Studie hatten im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne RA signifikant mehr fehlende Zähne und höhere Werte für PD und CAL [73, 99, 101].

Da die Kontrollgruppe jedoch daraufhin selektiert wurde, keine oder höchstens eine milde Parodontitis aufzuweisen, können wir mit unserer Arbeit nicht die Frage beantworten, ob Patienten mit RA generell parodontal schwerer erkrankt sind als Probanden ohne RA. Dies war auch kein Ziel der vorliegenden Arbeit. Die Kontrollgruppe ohne RA wurde deshalb in die Studie aufgenommen, um den Serumspiegel für anti-CEP-1 und anti-CCP in dieser Gruppe mit der RA-Gruppe (Testgruppe) vergleichen zu können. Trotzdem war auffällig, dass die RA-Patienten niedrigere Werte für API und BOP hatten im Vergleich zur Kontrollgruppe, obwohl sie höhere Daten für PD und CAL aufwiesen. Es ist möglich, dass Patienten mit RA durch ihre Erkrankung motiviert sind, generell mehr für ihre Gesundheit zu tun. Dies könnte auch die Mundpflege einschließen. Weiterhin ist es möglich, dass die Einnahme von antirheumatischen Medikamenten (MTX, Indometacin, Piroxicam) auch die Entzündungsneigung im Parodont hemmt und dadurch die BOP-Werte niedriger sind [13, 39, 43].

### 5.2.3 Anti-CCP- und Anti-CEP-1-Serumspiegel innerhalb der RA-Gruppe in Abhängigkeit von der parodontalen Diagnose

In unserer Studie konnte kein Zusammenhang zwischen der Schwere der parodontalen Erkrankung (CDC-Klassifikation) oder der Fläche von Parodontitis betroffenen Epithels (PESA, PISA) gezeigt werden. In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe, Reichert et al., 2015, konnte unter Probanden ohne RA aber mit generalisierter aggressiver oder generalisierter chronischer Parodontitis auch kein erhöhter Titer für Anti-CCP bzw. Anti-CEP-1 im Vergleich zu Probanden ohne PA nachgewiesen werden [4, 92]. Deshalb können wir die Ergebnisse

anderer Studien, die einen solchen Zusammenhang gezeigt haben [11, 18, 18, 26, 53, 70, 81], nicht bestätigen.

Mögliche Ursachen für die fehlende Konformität der Ergebnisse könnten u.a. auf Unterschiede im Studiendesign beruhen. Dazu gehören die Definition der PA, die Definition der Kontrollgruppe, die Anzahl der eingeschlossenen Test- und Kontrollprobanden sowie die verwendeten Tests zum Nachweis von ACPAs (Tabelle 17).

Tabelle 17: Vergleich von Studien zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Parodontitis und citrullinierten Antikörpern

<b>Studie</b>	<b>RA- Probanden (n)</b>	<b>Verwendeter Test zum Nachweis von ACPAs</b>	<b>PA-Definition</b>	<b>Positive Assoziation zwischen PA und ACPAs</b>
<b>Jurianz</b>	n=107	Anti-CEP-1 (cut-off >20RE/ml p=0,421) Anti-CCP (cut-off >5RE/ml, p=0,257)	CDC	nein
<b>Errikson,2016</b>	n=487	CCPlus® assay (p=n.s.)	Befragung der Probanden	nein
<b>Lappin,2013</b>	n=39	Anti-CCP p<0,001 Anti-CEP-1 p<0,001 Anti-REP-1 p<0,001	>2 Zähne PD>5mm	ja
<b>Gonzalez,2015</b>	n=287	Anti-CCP (cut-off >5U/ml, p=0,007)	Röntgenbilder ABL>20%	ja
<b>Okada,2013</b>	n=55	Anti-CCP (cut-off >4,5U/ml, p=0,09)	1 site CAL>4mm Klassifikation AAP	Ja (zwischen <i>P.g.</i> und Anti-CCP)

ABL=Alveolar bone loss, AAP=American Academy of Periodontology, n.s. = nicht signifikant

#### 5.2.4 PA-Keime in Assoziation zu beiden ACPAs innerhalb der RA-Gruppe

In der Vergangenheit wurden in vielen Studien Assoziationen zwischen *P.g.* und RA gezeigt. Vor allem der Weg über die bakterielle PAD, produziert von *P.g.* und der damit verbundenen

Entstehung humaner citrullinierter Peptide wurde stark diskutiert und erforscht [64, 66, 69, 117]. Allerdings konnte in unserer Studie kein Zusammenhang zwischen *P.g.* und erhöhten ACPA-Werten gezeigt werden, genauso wie in der Studie von Scher, 2012 [98]. Jedoch waren RA-Patienten mit *A.a.*-positivem Befund signifikant häufiger Anti-CCP- und HLA-DRB1\*04-positiv im Vergleich zu *A.a.*-negativen Probanden. Dieses Ergebnis deckt sich mit neuesten Erkenntnissen von König et al., 2016. Sie beschreiben den Weg der leukotoxischen Hypercitrullinierung über den Virulenzfaktor LtxA des parodontalen Leitkeims *A.a.* [52]. LtxA gehört zu den Poren bildenden Proteinen. Durch Ausschüttung von LtxA wird die Zellmembran der angegriffenen neutrophilen Zellen durchlässig für Calcium. Dieses strömt von extra- nach intrazellulär und aktiviert die humane PAD4. Daraufhin werden proinflammatorische Zytokine produziert und es kommt zu einer Hypercitrullinierung von Histon H3. Offen ist noch, ob es sich um eine NETosis (Neutrophile extracellular traps – extrazelluläre Fallen für Neutrophile) oder eine leukotoxische Hypercitrullinierung (LTH) handelt. Erste Ergebnisse weisen auf eine LTH hin. Bei diesem Vorgang gehen die neutrophilen Zellen zugrunde und die Überreste dieser Zellen könnten von den APCs phagozytiert und anschließend über HLA-Merkmale (HLA-DRB1\*04) den T-Zellen präsentiert werden. Über den T-Zell-Rezeptor kommt es zur Stimulierung u.a. von Th<sub>2</sub>-Zellen und in der Folge werden B-Zellen aktiviert, sich zu Plasmazellen umzuwandeln und Antikörper gegen diese citrullinierten Peptide zu bilden.

Es konnte ermittelt werden, dass *A.a.* eine höher zu bewertende Rolle in Bezug zum ätiologischen Zusammenhang zwischen der RA und PA einnimmt als erwartet. McHugh et al., 2017 wiesen ebenfalls darauf hin, dass *A.a.* die Membran der neutrophilen Zellen mittels LtxA schädigt und in der Folge die Auto-Antigenproduktion unterstütze [67]. Wahrscheinlich ist *P.g.* nicht der Hauptkeim allein, der die Entwicklung einer RA befördert [100]. Vielmehr ist zu erwarten, dass die Bakterien sich untereinander symbiotisch verhalten und gemeinsam die Entwicklung der RA triggern.

Über den neuen Ansatz der LTH, gefördert durch *A.a.* könnte es möglich sein, andere entsprechende Antigene eindeutig benennen zu können bzw. herauszufinden, welche Antigene die eigentlichen Verursacher der Bildung citrullinierter Antikörper sind. In dieser Studie waren sieben Probanden *A.a.*-positiv und gleichzeitig Anti-CCP-positiv. Ein Einschluss dieser geringen Fallzahl in die multivariate Analyse erschien uns nicht sinnvoll. Somit konnte diese Beziehung nicht multivariat bestätigt werden. Für die Replizierung dieses Zusammenhangs ist die Untersuchung größerer Patientenkollektive notwendig.

#### 5.2.5 Assoziationen von HLA-Merkmalen zu ACPA innerhalb der RA-Gruppe

In Bezug auf HLA-DRB1\*04 (SE) konnten wir ebenfalls in dieser Studie den Nachweis ermitteln, dass dieses Allel signifikant mit Anti-CCP (p=0,014) und Anti-CEP-1 (p=0,004)

assoziiert ist. Gestützt werden unsere Ergebnisse durch weitere Studien von Hitchon, 2010 und Murphy, 2017 [35, 74, 116], die ebenfalls herausgefunden haben, dass Träger des SE häufiger Anti-CCP- bzw. Anti-CEP-1-positiv sind. Murphy fand zusätzlich eine Assoziation zwischen SE und ACPAs in Kombination mit einem hohen Rheumafaktor. Ebenso zeigte Kharlamova, 2016 eine Assoziation zwischen ACPA-positiven RA-Probanden auf, die gleichzeitig Träger des HLA-DRB1-SE waren [45] (Tab.18).

Tabelle 18: Assoziation zwischen ACPAs und HLA-DRB1-SE-positiven Probanden

Studie	ACPAs	Anzahl Probanden (n)	p-Wert/ OR (95% KI)
<b>Jurianz</b>	Anti-CCP, Anti-CEP-1	n=107	p= 0,014, OR= 3,120 (1,329 7,324) p= 0,004, OR= 3,663 (1,589 8,444)
<b>Hitchon, 2010</b> (Verwandte von RA-Erkrankten)	Anti-CCP2	n=205	p= 0,02; OR=2,5
<b>Murphy, 2017</b>	Anti-CCP2 +RF	n=409	p=<0,01 (SE1:OR=9,0 (3,3- 28,8);SE2: OR=23,1 (5,5-200))
<b>Kharlamova, 2016</b>	Anti-CCP2 Anti-CEP-1	n=1974	OR=5,66 (4,22, 7,59)

RF= Rheumafaktor, SE1= Shared Epitope (HLA-DRB1\*04) 1. Allel, SE2= Shared Epitope 2. Allel

Auch bei Tieren konnte so eine Assoziation aufgezeigt werden. Das Mausmodell von Marchant et al., 2013 stellte dar, dass Mäuse, die HLA-DRB1-positiv waren und mit *P.g.* infiziert wurden, auch mit erhöhten ACPA-Werten assoziiert waren [64, 96].

Hill hat in seiner Studie Bindungsanalysen durchgeführt [34]. Darin beschreibt er, wie und ob citrulliniertes Vimentin an bestimmte HLA-Merkmale wie z.B. HLA-DRB1\*04 bindet. Dabei spielt das SE bzw. die Sequenz der angeordneten Aminosäuren die entscheidende Rolle. Das SE wird in der Studie als P4- pocket/ Bindungsstelle deklariert. Er konnte nachweisen, dass das Peptid mit einer negativ geladenen Asparaginsäure eine gute Bindung zu DRB1\*04 aufweist

und die Produktion von Interferon  $\gamma$  (INF  $\gamma$ ) stark fördert. Ein ähnliches Ergebnis stellte sich bei der Asparaginsäure, modifiziert mit Citrullin, ein. Auch hier kam es zu einer Bindung, die die Produktion von IFN  $\gamma$  stark unterstützte. Somit könnte ein citrulliniertes Peptid die T-Zell-Proliferation auch fördern. Um das zu bestätigen, hat Hill im Umkehrschluss Anti-DR-Ab zugefügt, was die Bindung zwischen T-Zell-Rezeptor und MHC-Komplex inhibiert. In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass es Allele gibt, die negativ zu den ACPAs assoziiert sind. Dies trifft für HLA-DRB1\*07 und \*13 zu. Es wird vermutet, dass citrullinierte Peptide unterschiedlich stark an die HLA-Moleküle binden und von dieser Bindung die Präsentation gegenüber dem T-Zell-Rezeptor und die nachfolgende Bildung von Autoantikörpern abhängig ist.

#### 5.2.6 Einnahme antirheumatischer Medikamente in Relation zum Nachweis von ACPA

Die Patienten dieser Studie waren unterschiedlich lange an der RA erkrankt. Der Mittelwert lag bei 32,86 Monaten. Die medikamentöse Therapie der RA-Probanden wurde berücksichtigt, da anzunehmen war, dass diese nicht nur die Blutung auf Sondierung, sondern auch den Serumlevel für Anti-CCP und Anti-CEP-1 beeinflussen könnte. Durch die logistischen Regressionen konnte ermittelt werden, dass die Basistherapeutika (MTX) mit einer erhöhten Odds Ratio für den Nachweis von Anti-CCP assoziiert waren. Eine Assoziation zu Anti-CEP-1 konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Vor allem Patienten mit schwerer RA sind häufiger Anti-CCP positiv und bekommen auch häufiger Basistherapeutika verabreicht. Somit deutet die von uns gezeigte Assoziation von Basistherapeutika zu Anti-CCP eher auf eine Assoziation von Anti-CCP zur Schwere der RA hin. Hensvold, 2015 zeigte, dass die Einnahme von Basistherapeutika sogar zu einer Verringerung des Serumspiegels für Anti-CCP führen kann ( $p < 0,005$ ) [33]. Daraus lässt sich folgern, dass Basistherapeutika keinen Risikofaktor für einen höheren ACPA-Spiegel darstellen.

## 6. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Es wird angenommen, dass Parodontitis und bestimmte parodontale Mikroorganismen wie z.B. *P.g.* oder *A.a.* die Entstehung einer RA triggern können. Orale Bakterien können über den Blutfluss oder den Transport durch Abwehrzellen den Mundraum verlassen und in anderen Körperregionen in Erscheinung treten. Die DNA parodontaler Bakterien wurde bereits in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen [71, 90]. Für *P.g.* wurde in der Zellkultur nachgewiesen, dass humane Chondrozyten infiziert und geschädigt werden können [86]. Damit ist es möglich, dass parodontale Bakterien direkt zur Schädigung von Gelenkstrukturen beitragen. Eine andere

Hypothese besagt, dass orale Bakterien die Citrullinierung parodontaler Gewebe triggern könnten. Das würde bedeuten, dass es bereits in der Mundhöhle bei bestimmter genetischer

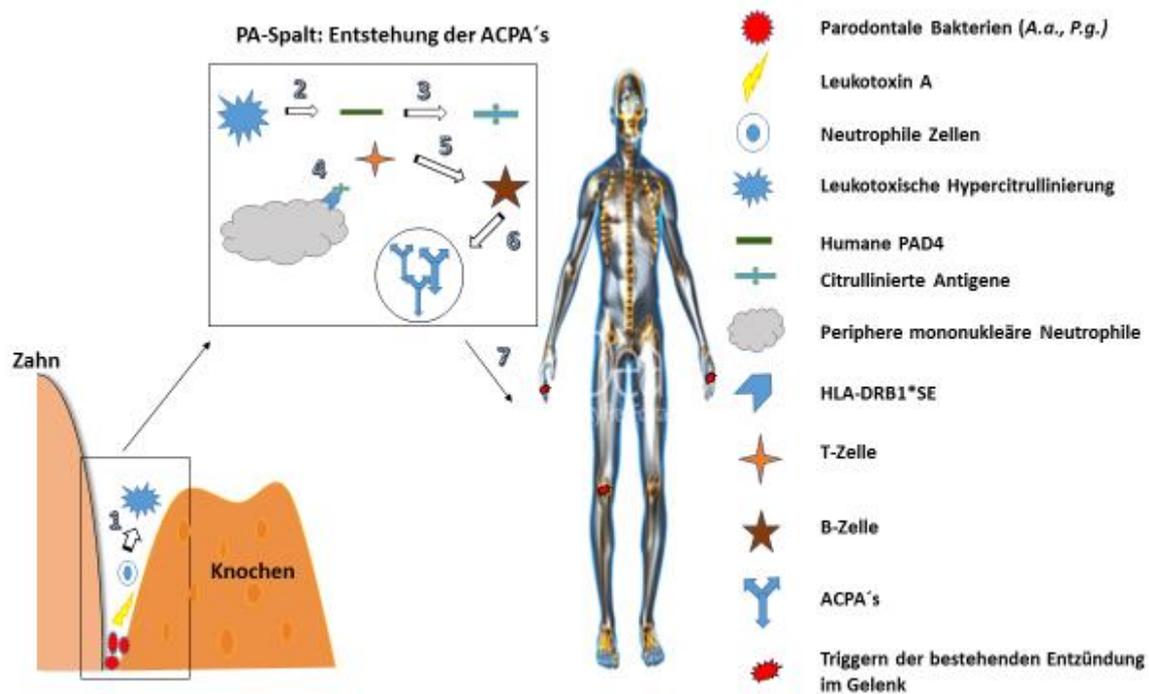


Abbildung 20: Produktion der ACPA's in der Mundhöhle: **1)** Neutrophile Zellen werden von Leukotoxin A angegriffen und es kommt zur leukotoxischen Hypercitrullinierung. **2)** Aus den destruierten Neutrophilen wird die humane PAD4 ausgeschüttet. **3)** PAD4 citrulliniert vorhandenes Arginin. **4)** Dieses wird von den PMN's phagozytiert und über die HLA-Merkmale den T-Zellen präsentiert. **5)** Die T-Zellen aktivieren die B-Zellen. **6)** B-Zellen produzieren Antikörper, differenzieren sich zu Plasmazellen und bilden ACPAs. **7)** ACPAs gelangen in weitere Körperregionen, z.B. Finger- oder Kniegelenke und triggern dort die Entstehung/Progression der RA

Konstellation zur Bildung von ACPAs kommt [78]. Diese können dann in Gelenke einwandern und wiederum an citrullinierte Peptide des Gelenks binden und damit eine chronische Entzündungsreaktion unterhalten [73] (Abb. 20).

Das Hauptziel unserer Studie bestand darin zu untersuchen, ob der parodontale Befund und/oder der Nachweis von fünf parodontalen Markerbakterien zum Serumspiegel für Anti-CCP- und Anti-CEP-1-Antikörper assoziiert ist. Dabei sollte auch der HLA-DRB1\*-Phänotyp berücksichtigt werden.

In dieser Studie wurden insgesamt 107 RA-Probanden und 89 Kontrollprobanden ohne RA parodontal untersucht. Die parodontale Einteilung wurde nach der CDC-Klassifikation in keine/milde, moderate und schwere PA vorgenommen. In der Testgruppe wurde weiterhin der Anteil des von Parodontitis betroffenen Epithels (PESA) und des Gewebes mit Blutung nach Sondierung (PISA) bestimmt. Des Weiteren wurde ein mikrobiologischer Test zur Bestimmung von fünf parodontalen Leitkeimen in der subgingivalen Plaque angeschlossen und eine Blutabnahme durchgeführt, mit deren Hilfe HLA-DRB1\*-Merkmale mit PCR-SSP sowie citrullinierte Antikörper mittels ELISA untersucht werden konnten. Die statistische Auswertung

erfolgte mit der Software IBM SPSS Statistics.

Die Testgruppe der RA-Patienten war erwartungsgemäß häufiger positiv für Anti-CCP (n=67 vs. n=0, p=<0,0001) und Anti-CEP-1 (n=50 vs. n=3, p=<0,0001) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Nachweisfrequenz von Anti-CCP in der Kontrollgruppe (0%) lag unter der in anderen Studien (ca. 2%) publizierten. Die Nachweisfrequenz von Anti-CEP-1 (3,4%) entsprach dagegen den publizierten Daten (2-3%) für Probanden ohne RA (Abb. 9).

In der Testgruppe wiesen 38 Probanden keine oder eine milde, 40 Patienten eine moderate und 29 Personen eine schwere PA auf. In der Kontrollgruppe hatte keiner der Probanden eine schwere PA. Obwohl die Patienten mit RA im Vergleich zur Kontrollgruppe höheren Stützgewebeverlust infolge der PA zeigten, wiesen wir hier geringere Werte für den Plaque- (34,8% vs. 43,0%, p=0,031) und Blutungsindex (26,1% vs. 48,2%, p=0,001) nach (Tabelle 1). Dies könnte auf ein höheres Gesundheitsbewusstsein, das auch die Mundhygiene einschließt, hindeuten und auf eine antiinflammatorische Wirkung der verabreichten antirheumatischen Medikamente.

In unserer Studie konnte nicht nachgewiesen werden, dass der parodontale Befund zum Nachweis von Anti-CCP- und Anti-CEP-1-Antikörpern assoziiert war. Damit scheint eine schwere PA kein Risikofaktor für die Bildung von Antikörpern gegen citrullinierte Peptide zu sein. Nur der Nachweis von *A.a.* war mit einem positiven Anti-CCP-Serumspiegel assoziiert (n=7, p=0,034). Dieses parodontale Bakterium könnte in der Ätiologie der RA von Bedeutung sein. Um dies nachzuweisen, muss die in unserer Studie gezeigte Assoziation in größeren Kohorten repliziert werden.

In Übereinstimmung mit anderen Studien konnten wir HLA-Allele identifizieren, die positiv oder negativ mit der Bildung von Anti-CCP- und Anti-CEP-1-Antikörpern assoziiert waren (Abb. 18/19).

Die individuelle HLA-Konstellation scheint eine bedeutende Rolle für die Bindung und Präsentation citrullinierter Peptide und damit der Bildung von Autoantikörpern zu haben. Aufgrund der Ergebnisse unserer Arbeit kann geschlussfolgert werden, dass eine Infektion mit *A.a.* das Risiko für die Bildung von Antikörpern gegen citrullinierte Peptide erhöhen kann. Ein besonders hohes Risiko tragen Patienten, die gleichzeitig positiv für HLA-DRB1\*04 sind. Vor der Anwendung dieser Erkenntnisse in Form von klinischen Tests müssen diese Ergebnisse jedoch in größeren Studien repliziert werden.

## 7. Literatur

1. Aarabi G, Schnabel RB, Heydecke G, Seedorf U (2018) Potential Impact of Oral Inflammations on Cardiac Functions and Atrial Fibrillation. *Biomolecules* 8(3). doi:10.3390/biom8030066
2. Araújo VMA, Melo IM, Lima V (2015) Relationship between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: Review of the Literature. *Mediators Inflamm* 2015:259074. doi:10.1155/2015/259074
3. Arvikar SL, Collier DS, Fisher MC, Unizony S, Cohen GL, McHugh G, Kawai T, Strle K, Steere AC (2013) Clinical correlations with *Porphyromonas gingivalis* antibody responses in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 15(5):R109. doi:10.1186/ar4289
4. Ballini A, Tete S, Scattarella A, Cantore S, Mastrangelo F, Papa F, Nardi GM, Perillo L, Crincoli V, Gherlone E, Grassi FR (2010) The role of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in periodontal disease. *Int J Immunopathol Pharmacol* 23(2):677–681. doi:10.1177/039463201002300234
5. Bartold PM, Marshall RI, Haynes DR (2005) Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review. *J Periodontol* 76(11 Suppl):2066–2074. doi:10.1902/jop.2005.76.11-S.2066
6. Bartold PM, Marino V, Cantley M, Haynes DR (2010) Effect of *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammation on the development of rheumatoid arthritis. *J Clin Periodontol* 37(5):405–411. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01552.x
7. Boer Ed (2014) Therapeutic Drug-Monitoring of Methotrexate-Polyglutamates in Rheumatoid Arthritis. Dissertation
8. Carman CV (2009) Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by 'invadosome-like protrusions'. *J Cell Sci* 122(Pt 17):3025–3035. doi:10.1242/jcs.047522
9. Catrina AI, Ytterberg AJ, Reynisdottir G, Malmström V, Klareskog L (2014) Lungs, joints and immunity against citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 10(11):645–653. doi:10.1038/nrrheum.2014.115
10. Choi J, Kim Y, Kweon H, Park E, Choi S, Lee J (2017) Effect of periodontitis on the development of osteoporosis: results from a nationwide population-based cohort study (2003-2013). *BMC Womens Health* 17(1):77. doi:10.1186/s12905-017-0440-9
11. Choi IA, Kim J, Kim YM, Lee JY, Kim KH, Lee EY, Lee EB, Lee Y, Song YW (2016) Periodontitis is associated with rheumatoid arthritis: a study with longstanding rheumatoid arthritis patients in Korea. *Korean J Intern Med*. doi:10.3904/kjim.2015.202
12. Chukkapalli S, Rivera-Kweh M, Gehlot P, Velsko I, Bhattacharyya I, Calise SJ, Satoh M, Chan EKL, Holoshitz J, Kesavalu L (2016) Periodontal bacterial colonization in synovial tissues exacerbates collagen-induced arthritis in B10.RIII mice. *Arthritis Res Ther* 18(1):161. doi:10.1186/s13075-016-1056-4
13. Ciancio SG, Mather ML, Zambon JJ, Reynolds HS (1989) Effect of a chemotherapeutic agent delivered by an oral irrigation device on plaque, gingivitis, and subgingival microflora. *J Periodontol* 60(6):310–315. doi:10.1902/jop.1989.60.6.310
14. Colombo APV, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, Socransky SS, Hasturk H, van Dyke TE, Dewhirst F, Paster BJ (2009) Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol* 80(9):1421–1432. doi:10.1902/jop.2009.090185
15. Coretti L, Cuomo M, Florio E, Palumbo D, Keller S, Pero R, Chiariotti L, Lembo F, Cafiero C (2017) Subgingival dysbiosis in smoker and non-smoker patients with chronic periodontitis. *Mol Med Rep* 15(4):2007–2014. doi:10.3892/mmr.2017.6269
16. Dietrich T, Webb I, Stenhouse L, Pattni A, Ready D, Wanyonyi KL, White S, Gallagher JE (2017) Evidence summary: the relationship between oral and cardiovascular disease. *Br Dent J* 222(5):381–385. doi:10.1038/sj.bdj.2017.224

17. Ding Y, Ren J, Yu H, Yu W, Zhou Y (2018) Porphyromonas gingivalis , a periodontitis causing bacterium, induces memory impairment and age-dependent neuroinflammation in mice. *Immun Ageing* 15:6. doi:10.1186/s12979-017-0110-7
18. Dissick A, Redman RS, Jones M, Rangan BV, Reimold A, Griffiths GR, Mikuls TR, Amdur RL, Richards JS, Kerr GS (2010) Association of periodontitis with rheumatoid arthritis: a pilot study. *J Periodontol* 81(2):223–230. doi:10.1902/jop.2009.090309
19. England BR, Thiele GM, Mikuls TR (2017) Anticitrullinated protein antibodies: origin and role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 29(1):57–64. doi:10.1097/BOR.0000000000000356
20. Engström M, Eriksson K, Lee L, Hermansson M, Johansson A, Nicholas AP, Gerasimcik N, Lundberg K, Klareskog L, Catrina AI, Yucel-Lindberg T (2018) Increased citrullination and expression of peptidylarginine deiminases independently of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* in gingival tissue of patients with periodontitis. *J Transl Med* 16(1):214. doi:10.1186/s12967-018-1588-2
21. Finoti LS, Nepomuceno R, Pigossi SC, Corbi SC, Secolin R, Scarel-Caminaga RM (2017) Association between interleukin-8 levels and chronic periodontal disease: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 96(22):e6932. doi:10.1097/MD.00000000000006932
22. Fuggle NR, Smith TO, Kaul A, Sofat N (2016) Hand to Mouth: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Association between Rheumatoid Arthritis and Periodontitis. *Front Immunol* 7:80. doi:10.3389/fimmu.2016.00080
23. Ganesan R, Rasool M (2017) Fibroblast-like synoviocytes-dependent effector molecules as a critical mediator for rheumatoid arthritis: Current status and future directions. *Int Rev Immunol* 36(1):20–30. doi:10.1080/08830185.2016.1269175
24. Gehlot P, Volk SL, Rios HF, Jepsen KJ, Holoshitz J (2016) Spontaneous destructive periodontitis and skeletal bone damage in transgenic mice carrying a human shared epitope-coding HLA-DRB1 allele. *RMD Open* 2(2):e000349. doi:10.1136/rmdopen-2016-000349
25. Gertel S, Karmon G, Szarka E, Shovman O, Hourli-Levi E, Mozes E, Shoenfeld Y, Amital H (2018) Anticitrullinated Protein Antibodies Induce Inflammatory Gene Expression Profile in Peripheral Blood Cells from CCP-positive Patients with RA. *J Rheumatol* 45(3):310–319. doi:10.3899/jrheum.170822
26. Gonzalez SM, Payne JB, Yu F, Thiele GM, Erickson AR, Johnson PG, Schmid MJ, Cannon GW, Kerr GS, Reimold AM, Sokolove J, Robinson WH, Mikuls TR (2015) Alveolar bone loss is associated with circulating anti-citrullinated protein antibody (ACPA) in patients with rheumatoid arthritis. *J Periodontol* 86(2):222–231. doi:10.1902/jop.2014.140425
27. Gutt B, Ren Q, Hauser-Gerspach I, Kardas P, Stübinger S, Astasov-Frauenhoffer M, Waltimo T (2018) Beneficial Oral Biofilms as Smart Bioactive Interfaces. *Front Microbiol* 9:107. doi:10.3389/fmicb.2018.00107
28. Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS (2006) Association of *Eubacterium nodatum* and *Treponema denticola* with human periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 21(5):269–282. doi:10.1111/j.1399-302X.2006.00287.x
29. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X (2008) Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* 23(3):196–205. doi:10.1111/j.1399-302X.2007.00411.x
30. Haffner M, Reichert S, Pischon N, Girndt M Molekularer Nachweis von parodontopathogenen Markerkeimen in der Synovialflüssigkeit von rheumatisch veränderten Gelenken
31. Hamilton JA, Hasturk H, Kantarci A, Serhan CN, van Dyke T (2017) Atherosclerosis, Periodontal Disease, and Treatment with Resolvins. *Curr Atheroscler Rep* 19(12):57. doi:10.1007/s11883-017-0696-4

32. Helminen-Pakkala E (1968) Periodontal conditions in rheumatoid arthritis. A clinical and roentgenological investigation. I. The control study in non-rheumatoids. *Suom Hammaslaak Toim* 64(6):219–361
33. Hensvold AH, Magnusson PKE, Joshua V, Hansson M, Israelsson L, Ferreira R, Jakobsson P, Holmdahl R, Hammarström L, Malmström V, Askling J, Klareskog L, Catrina AI (2015) Environmental and genetic factors in the development of anticitrullinated protein antibodies (ACPAs) and ACPA-positive rheumatoid arthritis: an epidemiological investigation in twins. *Ann Rheum Dis* 74(2):375–380. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203947
34. Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E (2003) Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1\*0401 MHC class II molecule. *J Immunol* 171(2):538–541
35. Hitchon CA, Chandad F, Ferucci ED, Willemze A, Ioan-Facsinay A, van der Woude D, Markland J, Robinson D, Elias B, Newkirk M, Toes RM, Huizinga TWJ, El-Gabalawy HS (2010) Antibodies to porphyromonas gingivalis are associated with anticitrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis and their relatives. *J Rheumatol* 37(6):1105–1112. doi:10.3899/jrheum.091323
36. Holgado ID (1997) Identification and cloning of two novel genes up-regulated by interleukin-1 in human synovial and gingival fibroblasts
37. Holmlund A, Lampa E, Lind L (2017) Oral health and cardiovascular disease risk in a cohort of periodontitis patients. *Atherosclerosis* 262:101–106. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.05.009
38. Holoshitz J (2010) The rheumatoid arthritis HLA-DRB1 shared epitope. *Curr Opin Rheumatol* 22(3):293–298. doi:10.1097/BOR.0b013e328336ba63
39. Howell TH, Fiorellini J, Weber HP, Williams RC (1991) Effect of the NSAID piroxicam, topically administered, on the development of gingivitis in beagle dogs. *J Periodontal Res* 26(3 Pt 1):180–183
40. Ibanez VS, Ferreira C, Contreras A, Valenzuela LO, Giadallah N, Jara V, Jaime F, Jarpa E (2015) Frequency and severity of periodontitis among patients with rheumatoid arthritis. *Rev Med Chil* 143(12):1539–1545. doi:10.4067/S0034-98872015001200006
41. Ishida K, Kobayashi T, Ito S, Komatsu Y, Yokoyama T, Okada M, Abe A, Murasawa A, Yoshie H (2012) Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *J Periodontol* 83(7):917–925. doi:10.1902/jop.2011.110356
42. Jordan AR, Micheelis W, Cholmakow-Bodechtel C (Hrsg) (2016) Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V). *Materialienreihe / Institut der Deutschen Zahnärzte, Band 35. Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV, Köln*
43. Jung G, Han J, Hwang K, Park C, Stathopoulou PG, Fiorellini JP (2018) Effects of Conventional Synthetic Disease-Modifying Antirheumatic Drugs on Response to Periodontal Treatment in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Biomed Res Int* 2018:1465402. doi:10.1155/2018/1465402
44. Kaur S, Bright R, Proudman SM, Bartold PM (2014) Does periodontal treatment influence clinical and biochemical measures for rheumatoid arthritis? A systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum* 44(2):113–122. doi:10.1016/j.semarthrit.2014.04.009
45. Kharlamova N, Jiang X, Sherina N, Potempa B, Israelsson L, Quirke A, Eriksson K, Yucel-Lindberg T, Venables PJ, Potempa J, Alfredsson L, Lundberg K (2016) Antibodies to Porphyromonas gingivalis Indicate Interaction Between Oral Infection, Smoking, and Risk Genes in Rheumatoid Arthritis Etiology. *Arthritis Rheumatol* 68(3):604–613. doi:10.1002/art.39491

46. Kirchner A, Jäger J, Krohn-Grimberghe B, Patschan S, Kottmann T, Schmalz G, Mausberg RF, Haak R, Ziebolz D (2017) Active matrix metalloproteinase-8 and periodontal bacteria depending on periodontal status in patients with rheumatoid arthritis. *J Periodontol Res* 52(4):745–754. doi:10.1111/jre.12443
47. Klareskog L, Rönnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L (2008) Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 26:651–675. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090244
48. Kobayashi T, Okada M, Ito S, Kobayashi D, Ishida K, Kojima A, Narita I, Murasawa A, Yoshie H (2014) Assessment of interleukin-6 receptor inhibition therapy on periodontal condition in patients with rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *J Periodontol* 85(1):57–67. doi:10.1902/jop.2013.120696
49. Kochi S, Yamashiro K, Hongo S, Yamamoto T, Ugawa Y, Shimoe M, Kawamura M, Hirata-Yoshihara C, Ideguchi H, Maeda H, Takashiba S (2017) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* regulates the expression of integrins and reduces cell adhesion via integrin  $\alpha 5$  in human gingival epithelial cells. *Mol Cell Biochem*. doi:10.1007/s11010-017-3076-z
50. Kojima A, Kobayashi T, Ito S, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H (2016) Tumor necrosis factor- $\alpha$  gene promoter methylation in Japanese adults with chronic periodontitis and rheumatoid arthritis. *J Periodontol Res* 51(3):350–358. doi:10.1111/jre.12314
51. Kolarz K, Targońska-Stepniak B, Majdan M (2018) Early reumatoid arthritis. *Wiad Lek* 71(5):1061–1065
52. Konig MF, Abusleme L, Reinholdt J, Palmer RJ, Teles RP, Sampson K, Rosen A, Nigrovic PA, Sokolove J, Giles JT, Moutsopoulos NM, Andrade F (2016) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* 8(369):369ra176. doi:10.1126/scitranslmed.aaj1921
53. Lappin DF, Apatzidou D, Quirke A, Oliver-Bell J, Butcher JP, Kinane DF, Riggio MP, Venables P, McInnes IB, Culshaw S (2013) Influence of periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis* and cigarette smoking on systemic anti-citrullinated peptide antibody titres. *J Clin Periodontol* 40(10):907–915. doi:10.1111/jcpe.12138
54. Larsen JM (2017) The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*. doi:10.1111/imm.12760
55. Laugisch O, Wong A, Sroka A, Kantyka T, Koziel J, Neuhaus K, Sculean A, Venables PJ, Potempa J, Moller B, Eick S (2016) Citrullination in the periodontium--a possible link between periodontitis and rheumatoid arthritis. *Clin Oral Investig* 20(4):675–683. doi:10.1007/s00784-015-1556-7
56. Lavu V, Venkatesan V, Venugopal P, Lakkakula, Bhaskar Venkata Kameswara Subrahmanya, Paul SFD, Peria K, Rao SR (2017) Clinical Relevance of Cytokines Gene Polymorphisms and Protein Levels in Gingival Cervical Fluid from Chronic Periodontitis Patients. *Iran J Immunol* 14(1):51–58
57. Leira Y, Seoane J, Blanco M, Rodríguez-Yáñez M, Takkouche B, Blanco J, Castillo J (2017) Association between periodontitis and ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol* 32(1):43–53. doi:10.1007/s10654-016-0170-6
58. Liu H, Luo T, Tan J, Li M, Guo J (2017) Osteoimmunology' Offers New Perspectives for the Treatment of Pathological Bone Loss. *Curr Pharm Des*. doi:10.2174/1381612823666170511124459
59. Lundberg K, Kinloch A, Fisher BA, Wegner N, Wait R, Charles P, Mikuls TR, Venables PJ (2008) Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum* 58(10):3009–3019. doi:10.1002/art.23936

60. Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T, Venables PJ (2010) Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. *Nat Rev Rheumatol* 6(12):727–730. doi:10.1038/nrrheum.2010.139
61. Mahalakshmi K, Krishnan P, Arumugam SB (2017) "Association of periodontopathic anaerobic bacterial co-occurrence to atherosclerosis" - A cross-sectional study. *Anaerobe* 44:66–72. doi:10.1016/j.anaerobe.2017.02.003
62. Mahdi H, Fisher BA, Källberg H, Plant D, Malmström V, Rönnelid J, Charles P, Ding B, Alfredsson L, Padyukov L, Symmons DPM, Venables PJ, Klareskog L, Lundberg K (2009) Specific interaction between genotype, smoking and autoimmunity to citrullinated alpha-enolase in the etiology of rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 41(12):1319–1324. doi:10.1038/ng.480
63. Malemud CJ (2017) Matrix Metalloproteinases and Synovial Joint Pathology. *Prog Mol Biol Transl Sci* 148:305–325. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.03.003
64. Marchant C, Smith MD, Proudman S, Haynes DR, Bartold PM (2013) Effect of *Porphyromonas gingivalis* on citrullination of proteins by macrophages in vitro. *J Periodontol* 84(9):1272–1280. doi:10.1902/jop.2012.120103
65. Martinez GL, Majster M, Bjurshammar N, Johannsen A, Figueredo CM, Boström EA (2017) Salivary Colony Stimulating Factor-1, Interleukin-34, and Matrix Metalloproteinase-8 as Markers of Periodontal Disease. *J Periodontol*:1–15. doi:10.1902/jop.2017.170081
66. Martinez-Martinez RE, Abud-Mendoza C, Patino-Marin N, Rizo-Rodriguez JC, Little JW, Loyola-Rodriguez JP (2009) Detection of periodontal bacterial DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients. *J Clin Periodontol* 36(12):1004–1010. doi:10.1111/j.1600-051X.2009.01496.x
67. McHugh J (2017) Rheumatoid arthritis: New model linking periodontitis and RA. *Nat Rev Rheumatol* 13(2):66. doi:10.1038/nrrheum.2016.221
68. Mikuls TR, Payne JB, Reinhardt RA, Thiele GM, Maziarz E, Cannella AC, Holers VM, Kuhn KA, O'Dell JR (2009) Antibody responses to *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) in subjects with rheumatoid arthritis and periodontitis. *Int Immunopharmacol* 9(1):38–42. doi:10.1016/j.intimp.2008.09.008
69. Mikuls TR, Thiele GM, Deane KD, Payne JB, O'Dell JR, Yu F, Sayles H, Weisman MH, Gregersen PK, Buckner JH, Keating RM, Derber LA, Robinson WH, Holers VM, Norris JM (2012) *Porphyromonas gingivalis* and disease-related autoantibodies in individuals at increased risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 64(11):3522–3530. doi:10.1002/art.34595
70. Mikuls TR, Payne JB, Yu F, Thiele GM, Reynolds RJ, Cannon GW, Markt J, McGowan D, Kerr GS, Redman RS, Reimold A, Griffiths G, Beatty M, Gonzalez SM, Bergman DA, Hamilton BC3, Erickson AR, Sokolove J, Robinson WH, Walker C, Chandad F, O'Dell JR (2014) Periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 66(5):1090–1100. doi:10.1002/art.38348
71. Moen K, Brun JG, Madland TM, Tynning T, Jonsson R (2003) Immunoglobulin G and A antibody responses to *Bacteroides forsythus* and *Prevotella intermedia* in sera and synovial fluids of arthritis patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 10(6):1043–1050
72. Morgan AW, Thomson W, Martin SG, Carter AM, Erlich HA, Barton A, Hocking L, Reid DM, Harrison P, Wordsworth P, Steer S, Worthington J, Emery P, Wilson AG, Barrett JH (2009) Reevaluation of the interaction between HLA-DRB1 shared epitope alleles, PTPN22, and smoking in determining susceptibility to autoantibody-positive and autoantibody-negative rheumatoid arthritis in a large UK Caucasian population. *Arthritis Rheum* 60(9):2565–2576. doi:10.1002/art.24752
73. Mühlberg S, Jäger J, Krohn-Grimberghe B, Patschan S, Mausberg RF, Schmalz G, Haak R, Ziebolz D (2017) Oral health-related quality of life depending on oral health in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Oral Investig*. doi:10.1007/s00784-017-2068-4

74. Murphy D, Matthey D, Hutchinson D (2017) Anti-citrullinated protein antibody positive rheumatoid arthritis is primarily determined by rheumatoid factor titre and the shared epitope rather than smoking per se. *PLoS ONE* 12(7):e0180655. doi:10.1371/journal.pone.0180655
75. Nakken B, Papp G, Bosnes V, Zeher M, Nagy G, Szodoray P (2017) Biomarkers for rheumatoid arthritis: From molecular processes to diagnostic applications-current concepts and future perspectives. *Immunol Lett.* doi:10.1016/j.imlet.2017.05.010
76. Nazir MA (2017) Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim)* 11(2):72–80
77. Nesse W, Abbas F, van der Ploeg I, Spijkervet FKL, Dijkstra PU, Vissink A (2008) Periodontal inflamed surface area: quantifying inflammatory burden. *J Clin Periodontol* 35(8):668–673. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01249.x
78. Nesse W, Westra J, van der Wal, Jacqueline E, Abbas F, Nicholas AP, Vissink A, Brouwer E (2012) The periodontium of periodontitis patients contains citrullinated proteins which may play a role in ACPA (anti-citrullinated protein antibody) formation. *J Clin Periodontol* 39(7):599–607. doi:10.1111/j.1600-051X.2012.01885.x
79. Noack B, Kipping T, Tervahartiala T, Sorsa T, Hoffmann T, Lorenz K (2017) Association between serum and oral matrix metalloproteinase-8 levels and periodontal health status. *J Periodontol Res.* doi:10.1111/jre.12450
80. Ogrendik M (2013) Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease caused by periodontal pathogens. *Int J Gen Med* 6:383–386. doi:10.2147/IJGM.S45929
81. Okada M, Kobayashi T, Ito S, Yokoyama T, Abe A, Murasawa A, Yoshie H Periodontal Treatment Decreases Levels of Antibodies to *Porphyromonas gingivalis* and Citrulline in Patients With Rheumatoid Arthritis and Periodontitis. *J Periodontol*
82. Olerup O, Zetterquist H (1992) HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 39(5):225–235
83. Otten HG, Tilanus MG, Barnstijn M, van Heugten JG, Gast GC de (1995) Serology versus PCR-SSP in typing for HLA-DR and HLA-DQ: a practical evaluation. *Tissue Antigens* 45(1):36–40
84. Pablo P de, Dietrich T, Chapple ILC, Milward M, Chowdhury M, Charles PJ, Buckley CD, Venables PJ (2014) The autoantibody repertoire in periodontitis: a role in the induction of autoimmunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 73(3):580–586. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202701
85. Patini R, Gallenzi P, Spagnuolo G, Cordaro M, Cantiani M, Amalfitano A, Arcovito A, Callà C, Mingrone G, Nocca G (2017) Correlation Between Metabolic Syndrome, Periodontitis and Reactive Oxygen Species Production. A Pilot Study. *Open Dent J* 11:621–627. doi:10.2174/1874210601711010621
86. Pischon N, Rohner E, Hocke A, N'Guessan P, Muller HC, Matziolis G, Kanitz V, Purucker P, Kleber B, Bernimoulin J, Burmester G, Buttgerit F, Detert J (2009) Effects of *Porphyromonas gingivalis* on cell cycle progression and apoptosis of primary human chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 68(12):1902–1907. doi:10.1136/ard.2008.102392
87. Rateitschak EM, Wolf HF, Rateitschak KH (2004) *Parodontologie*, 3. Aufl. *Farbatlanten der Zahnmedizin*, Bd. 1. THIEME, s.l.
88. Reichert S, Stein J, Gautsch A, Schaller H, Machulla HKG (2002) Gender differences in HLA phenotype frequencies found in German patients with generalized aggressive periodontitis and chronic periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 17(6):360–368
89. Reichert S, Stein J, Fuchs C, John V, Schaller H, Machulla HKG (2007) Are there common human leucocyte antigen associations in juvenile idiopathic arthritis and periodontitis? *J Clin Periodontol* 34(6):492–498. doi:10.1111/j.1600-051X.2007.01087.x

90. Reichert S, Haffner M, Keysser G, Schafer C, Stein JM, Schaller H, Wienke A, Strauss H, Heide S, Schulz S (2013) Detection of oral bacterial DNA in synovial fluid. *J Clin Periodontol* 40(6):591–598. doi:10.1111/jcpe.12102
91. Reichert S, Altermann WW, Stein JM, Schaller H, Machulla HK, Schulz S (2013) Individual composition of human leukocyte antigens and periodontopathogens in the background of periodontitis. *J Periodontol* 84(1):100–109. doi:10.1902/jop.2012.110545
92. Reichert S, Schlumberger W, Dahnrich C, Hornig N, Altermann W, Schaller H, Schulz S (2015) Association of levels of antibodies against citrullinated cyclic peptides and citrullinated alpha-enolase in chronic and aggressive periodontitis as a risk factor of Rheumatoid arthritis: a case control study. *J Transl Med* 13:283. doi:10.1186/s12967-015-0625-7
93. Sage PT, Carman CV (2009) Settings and mechanisms for trans-cellular diapedesis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14:5066–5083
94. Sağlam M, Köseoğlu S, Aral CA, Savran L, Pekbağrıyanık T, Çetinkaya A (2017) Increased levels of interleukin-33 in gingival crevicular fluids of patients with chronic periodontitis. *Odontology* 105(2):184–190. doi:10.1007/s10266-016-0259-0
95. Sakkas LI, Bogdanos DP, Katsiari C, Platsoucas CD (2014) Anti-citrullinated peptides as autoantigens in rheumatoid arthritis-relevance to treatment. *Autoimmun Rev* 13(11):1114–1120. doi:10.1016/j.autrev.2014.08.012
96. Sandal I, Karydis A, Luo J, Prislovsky A, Whittington KB, Rosloniec EF, Dong C, Novack DV, Mydel P, Zheng SG, Radic MZ, Brand DD (2016) Bone loss and aggravated autoimmune arthritis in HLA-DRbeta1-bearing humanized mice following oral challenge with *Porphyromonas gingivalis*. *Arthritis Res Ther* 18(1):249. doi:10.1186/s13075-016-1143-6
97. Saulot V, Vittecoq O, Charlionet R, Fardellone P, Lange C, Marvin L, Machour N, Le Loët X, Gilbert D, Tron F (2002) Presence of autoantibodies to the glycolytic enzyme alpha-enolase in sera from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46(5):1196–1201. doi:10.1002/art.10252
98. Scher JU, Ubeda C, Equinda M, Khanin R, Buischi Y, Viale A, Lipuma L, Attur M, Pillinger MH, Weissmann G, Littman DR, Pamer EG, Bretz WA, Abramson SB (2012) Periodontal disease and the oral microbiota in new-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 64(10):3083–3094. doi:10.1002/art.34539
99. Schmickler J, Rupprecht A, Patschan S, Patschan D, Muller GA, Haak R, Mausberg RF, Schmalz G, Kottmann T, Ziebolz D (2017) Cross-Sectional Evaluation of Periodontal Status and Microbiologic and Rheumatoid Parameters in a Large Cohort of Patients With Rheumatoid Arthritis. *J Periodontol* 88(4):368–379. doi:10.1902/jop.2016.160355
100. Seror R, Le Gall-David S, Bonnaure-Mallet M, Schaeffer T, Cantagrel A, Minet J, Gottenberg J, Chanson P, Ravaud P, Mariette X (2015) Association of Anti-*Porphyromonas gingivalis* Antibody Titers With Nonsmoking Status in Early Rheumatoid Arthritis: Results From the Prospective French Cohort of Patients With Early Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* 67(7):1729–1737. doi:10.1002/art.39118
101. Silvestre-Rangil J, Bagan L, Silvestre FJ, Bagan JV (2016) Oral manifestations of rheumatoid arthritis. A cross-sectional study of 73 patients. *Clin Oral Investig*. doi:10.1007/s00784-016-1745-z
102. Smit M de, Westra J, Vissink A, Doornbos-van der Meer B, Brouwer E, van Winkelhoff AJ (2012) Periodontitis in established rheumatoid arthritis patients: a cross-sectional clinical, microbiological and serological study. *Arthritis Res Ther* 14(5):R222. doi:10.1186/ar4061
103. Smit MJ de, Westra J, Brouwer E, Janssen KMJ, Vissink A, van Winkelhoff AJ (2015) Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: What Do We Know? *J Periodontol* 86(9):1013–1019. doi:10.1902/jop.2015.150088

104. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P (2007) New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* 370(9602):1861–1874. doi:10.1016/S0140-6736(07)60784-3
105. Socransky SS (1979) Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 6(7):16–21
106. Socransky SS, Haffajee AD (1992) The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts. *J Periodontol* 63 Suppl 4S:322–331. doi:10.1902/jop.1992.63.4s.322
107. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25(2):134–144
108. Svedha PR, Mahendra J, Theayarajar R, Namachivayam A (2017) Comparison of bone mineral density among pre- and post-menopausal women with and without chronic generalized periodontitis. *J Indian Soc Periodontol* 21(2):119–124. doi:10.4103/jisp.jisp\_43\_16
109. Teles FR, Teles RP, Sachdeo A, Uzel NG, Song XQ, Torresyap G, Singh M, Papas A, Haffajee AD, Socransky SS (2012) Comparison of microbial changes in early redeveloping biofilms on natural teeth and dentures. *J Periodontol* 83(9):1139–1148. doi:10.1902/jop.2012.110506
110. Terao C, Asai K, Hashimoto M, Yamazaki T, Ohmura K, Yamaguchi A, Takahashi K, Takei N, Ishii T, Kawaguchi T, Tabara Y, Takahashi M, Nakayama T, Kosugi S, Sekine A, Fujii T, Yamada R, Mimori T, Matsuda F, Bessho K (2015) Significant association of periodontal disease with anti-citrullinated peptide antibody in a Japanese healthy population - The Nagahama study. *J Autoimmun.* doi:10.1016/j.jaut.2015.03.002
111. Umeda N, Matsumoto I, Sumida T (2017) The pathogenic role of ACPA in rheumatoid arthritis. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 40(6):391–395. doi:10.2177/jsci.40.391
112. Unriza-Puin S, Bautista-Molano W, Lafaurie GI, Valle-Onate R, Chalem P, Chila-Moreno L, Bello-Gualtero JM, Romero-Sanchez C (2017) Are obesity, ACPAs and periodontitis conditions that influence the risk of developing rheumatoid arthritis in first-degree relatives? *Clin Rheumatol* 36(4):799–806. doi:10.1007/s10067-016-3519-z
113. van Venrooij WJ, Hazes JM, Visser H (2002) Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. *Neth J Med* 60(10):383–388
114. van Venrooij WJ, Zendman AJW, Pruijn GJM (2006) Autoantibodies to citrullinated antigens in (early) rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 6(1):37–41. doi:10.1016/j.autrev.2006.03.008
115. Vasishta A (2002) Diagnosing early-onset rheumatoid arthritis: the role of anti-CCP antibodies. *Am Clin Lab* 21(7):34–36
116. Wegner N, Lundberg K, Kinloch A, Fisher B, Malmstrom V, Feldmann M, Venables PJ (2010) Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 233(1):34–54. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00850.x
117. Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen K, Lundberg K, Kinloch A, Culshaw S, Potempa J, Venables PJ (2010) Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 62(9):2662–2672. doi:10.1002/art.27552
118. Yu JJ, Ruddy MJ, Conti HR, Boonantananasarn K, Gaffen SL (2008) The interleukin-17 receptor plays a gender-dependent role in host protection against *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontal bone loss. *Infect Immun* 76(9):4206–4213. doi:10.1128/IAI.01209-07
119. Zhang P, Liu J, Xu Q, Harber G, Feng X, Michalek SM, Katz J (2011) TLR2-dependent modulation of osteoclastogenesis by *Porphyromonas gingivalis* through differential

- induction of NFATc1 and NF-kappaB. *J Biol Chem* 286(27):24159–24169.  
doi:10.1074/jbc.M110.198085
120. Zheng J, Chen S, Albiero ML, Vieira GHA, Wang J, Feng JQ, Graves DT (2018) Diabetes Activates Periodontal Ligament Fibroblasts via NF-κB In Vivo. *J Dent Res*:22034518755697.  
doi:10.1177/0022034518755697
121. Ziebolz D, Jahn C, Pegel J, Semper-Pinnecke E, Mausberg RF, Waldmann-Beushausen R, Schöndube FA, Danner BC (2018) Periodontal bacteria DNA findings in human cardiac tissue - Is there a link of periodontitis to heart valve disease? *Int J Cardiol* 251:74–79.  
doi:10.1016/j.ijcard.2017.09.001

## 8. Thesen

- 1) In epidemiologischen Untersuchungen wurde zwischen einer RA und einer PA eine Wechselbeziehung nachgewiesen. Sowohl Patienten mit einer bestehenden RA haben ein höheres Risiko an einer PA zu erkranken als auch Menschen mit einer bestehenden PA können häufiger eine RA entwickeln.
- 2) Die biologische Plausibilität der Beziehung zwischen beiden Erkrankungen ist unklar. Es wird u.a. vermutet, dass parodontale Bakterien Peptide z.B. im Parodont citrullinieren können und dadurch die Bildung von Antikörpern gegen citrullinierte Peptide (ACPAs) getriggert werden könnte.
- 3) Das Kernziel dieser Studie bestand deshalb darin zu untersuchen, ob innerhalb einer RA-Gruppe (Testgruppe) die Parodontitis und/oder parodontale Leitkeime zum Nachweis von zwei verschiedenen ACPAs, nämlich Anti-CCP und Anti-CEP-1 assoziiert ist. Neben der Parodontitis wurden in multivariaten Analysen noch weitere Risikofaktoren wie der HLA-DRB1\*-Befund und die Medikamenteneinnahmen berücksichtigt. Eine Kontrollkohorte ohne RA und mit maximal milder Parodontitis repräsentierte die Verteilung der beiden untersuchten ACPAs in der Normalbevölkerung.
- 4) Es konnten 107 Probanden mit RA parodontal untersucht und in die Studie eingeschlossen werden. Demgegenüber standen 89 Kontrollprobanden ohne RA.
- 5) Patienten mit RA waren erwartungsgemäß signifikant häufiger ACPA-positiv als die Kontrollprobanden ohne RA. Von den 107 Probanden mit RA waren 67 Personen Anti-CCP- und 50 Personen Anti-CEP-1-positiv. Dagegen hatten nur 3 Probanden ohne RA einen positiven Anti-CEP-1-Befund.
- 6) Innerhalb der Testgruppe war die Schwere der PA, definiert nach CDC und PESA/ PISA nicht signifikant zum ACPA-Nachweis assoziiert. Patienten mit schwerer PA waren sogar von der Tendenz weniger häufig Anti-CCP- und Anti-CEP-1-positiv.
- 7) RA-Patienten, bei denen der parodontale Leitkeim *A.actinomycetemcomitans* (*A.a.*) in der subgingivalen Plaque mittels PCR nachgewiesen wurde, waren signifikant häufiger auch positiv für Anti-CCP im Vergleich zu RA Patienten ohne Nachweis dieses Bakteriums. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass *A.a.* über LtxA humane neutrophile Zellen angreifen und eine leukotoxische Hypercitrullinierung bewirken kann. Dies wiederum fördert die Anti-CCP-Bildung. Die Beziehung zwischen *A.a.* und Anti-CCP muss in größeren Kohorten repliziert werden.

- 8) RA-Patienten mit positivem HLA-DRB1\*04-Befund waren häufiger Anti-CCP- und Anti-CEP-1-positiv. Dies stützt die Hypothese, dass die ACPA-Bildung auch von genetischen Faktoren beeinflusst wird.
- 9) Die Ergebnisse unserer Studie wiesen darauf hin, dass eine subgingivale Besiedlung mit *A.a.* und der Nachweis von HLA-DRB1\*04 Risikoindikatoren für die Bildung von ACPAs darstellen. Vermutlich tragen diese Probanden ein höheres Erkrankungsrisiko für RA. Dies kann jedoch nur in einem longitudinalen Studienansatz untersucht werden.

# Lebenslauf

## **Persönliche Daten**

Name Elisa Jurianz  
Geburtsdatum 10.04.1990  
Geburtsort Greifswald  
Familienstand ledig

## **Schulbildung**

1996-1998 Grundschule am Griebnitzsee, Potsdam  
1998-2002 Grundschule Wilhelmshorst  
2002-2009 Wolkenberg-Gymnasium, Michendorf  
Abschluss: Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife

## **Berufsausbildung/ Studium**

09/2009-06/2011 Ausbildung zur ZFA in der Zahnarztpraxis  
Herberg, Potsdamer Str. 7-9, 14513 Teltow  
10/2011-11/2016 Studium der Zahnmedizin an der Martin-  
Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Abschluss: Staatsexamen

## **Berufserfahrung**

seit 01/2017 Zahnärztin in der Praxis Dr. Kerstin Schäfer  
und Dr. Kirsten Bettac, 14552 Michendorf  
seit 02/2019 parallel Honorarärztin im Philipp-Pfaff-  
Institut

## **Berufliches und soziales Engagement**

seit 2018 Kampagne „Junge Zahnärzte“ LZAEK BRB

## **Fremdsprachen**

Englisch 9 Jahre  
Latein 3 Jahre (Latinum)

## **Hobbies**

Tennis seit 2003 im Verein

Potsdam, 30. September 2019

Elisa Jurianz

---

# Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht und unter Angabe der Quelle aufgelistet.

Potsdam, den 11.03. 2019

Elisa Jurianz

---

# Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich an keiner anderen Hochschule eine Promotion begonnen oder mich einem Promotionsverfahren unterzogen habe.

Potsdam, den 11.03.2019

Elisa Jurianz

---

# Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn apl. Prof. Dr. med. dent. Stefan Reichert widmen. Seine fortlaufende Unterstützung sowie seine Bemühungen haben mich stets motiviert diese Arbeit zu erstellen.

Des Weiteren danke ich Frau PD Dr. rer. nat. Susanne Schulz für Ihren Beistand bei den molekularbiologischen Verfahren.

Danken möchte ich außerdem meinen Eltern Ramona und Michael Jurianz, die mich auf meinem Weg durch das Studium immer begleitet und bei der Durchführung dieser Arbeit wohlwollend unterstützt haben.

---