

Aus dem Institut für Klinische Molekularbiologie  
(Direktoren: Prof. Dr. Stefan Schreiber, Prof. Dr. Philip Rosenstiel, Prof. Dr. Andre Franke)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Identifikation Parodontitis spezifischer  
microRNAs**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von  
Denis Bajric  
aus Sarajevo

Kiel 2021

1. Berichtersteller: Priv.-Doz. Dr. Arne Schäfer, Charité-Universitätsmedizin Berlin Parodontologie, Oralmedizin und Oralchirurgie
2. Berichtersteller: Prof. Dr. Hans-Jürgen Wenz, Klinik für Zahnärztliche Prothetik, Propädeutik und Werkstoffkunde

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 04.11.2021

gez.: Prof. Dr. rer. nat. David Ellinghaus  
Vorsitzender der Prüfungskommission

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>3. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
3.1. Parodontitis .....	1
3.1.1. Gingivitis .....	1
3.1.2. Ätiologie .....	2
3.1.3. Klassifikation.....	2
3.1.4. Klinische Zeichen.....	4
3.1.5. Inzidenz .....	5
3.2. microRNA.....	6
3.2.1. Entstehung.....	6
3.2.2. Wirkung.....	8
3.3. Ziel .....	8
<b>4. Methoden .....</b>	<b>9</b>
4.1. Probanden.....	9
4.2. Microarray-Screening .....	11
4.3. Auswahlkriterien von microRNAs für Folgeexperimente .....	11
4.4. Zellkultur.....	12
4.5. Transfektion .....	12
4.6. Genexpressionsanalyse.....	13
4.7. Identifikation von Bindestellen der identifizierten microRNA in den 3'UTRs proteincodierender Gene.....	14
4.8. Klonierung der UHMK1 3'UTR in das Reporterplasmid pGL4.24 .....	14
4.9. Quantitative RT-PCR.....	15
4.10. Luciferase Reportergen.....	15
<b>5. Ergebnisse .....</b>	<b>16</b>
5.1. Identifizierung von microRNAs, die in Blut und Gingiva von Parodontitispatienten erhöht sind .....	16
5.2. Wirkung von hsa-miR-374b-5p auf primäre humane gingivale Fibroblasten .....	16

5.3. Validierung der Wirkung von hsa-miR-374b-5p auf die Expression von UHM-K1 .....	17
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>20</b>
6.1. hsa-miR-374b-5p und UHMK1 im Zusammenhang mit Parodontitis .....	20
6.2. microRNAs im Blut als Biomarkern .....	21
6.3. Regulation von UHMK1 .....	23
6.4. Relevanz von UHMK1 als Biomarker anderer Krankheiten .....	24
<b>7. Zusammenfassung .....</b>	<b>25</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>27</b>
<b>9. Anhang .....</b>	<b>33</b>
9.1. Ethikkommission .....	34
9.2. Patienten-Einwilligungserklärung für die Studie .....	35
<b>10. Danksagung .....</b>	<b>39</b>
<b>11. Veröffentlichung .....</b>	<b>40</b>

## Abkürzungsverzeichnis

BOP - (Bleeding on Probing) Blutung beim Sondieren  
bp - Basenpaare  
cDNA - komplementäre DNA  
DMEM - Dulbecco Modified Eagle Medium  
DNA - Desoxyribonukleinsäure  
FC - Fold Change  
FCS - Fetal Calf Serum  
gDNA - Genomische DNA  
GWAS - Genome-wide association study  
kb - Kilobase  
LUC - Luciferase Reporter-Gen  
MEM - Minimum Essential Medium  
miRNA - microRNA  
ml - Milliliter  
mm - Millimeter  
mM - Millimol  
mRNA - messenger RNA  
ng - Nanogram  
PBS - Phosphat gepufferte Salzlösung  
PCR - Polymerase e-Kettenreaktion  
pGF - primäre gingivale Fibroblasten  
pGL - Luciferase Reporter Vector  
PMN - Polymorphkernige Granulozyten  
PTK9 - Protein Tyrosin Kinase 9  
RNA - Ribonukleinsäure  
RT-PCR - Reverse- Transkriptase- Polymerase- Kettenreaktion  
TPP - Techno Plastic Products  
UHMK1 - U2AF Homologiekinase 1  
UTR - untranslatierte Region

## **3. Einleitung**

### **3.1. Parodontitis**

Parodontitis, umgangssprachlich auch als Parodontose bezeichnet, ist eine chronische durch einen dysbiotischen Biofilm verursachte Entzündung des Zahnhalteapparates (Parodontium). Unter dem Begriff Zahnhalteapparat sind verschiedene anatomische Strukturen wie Zahnfleisch, Knochen, Wurzelzement und Fasern zusammengefasst. Das Wechselspiel zwischen bakteriellem Angriff und Abwehrreaktion des Organismus hat eine irreversible Gewebeerstörung des Zahnhalteapparates zur Folge. Unbehandelt kann die Parodontitis zu Zahnverlust führen.

Eine Parodontitis verläuft häufig ohne Schmerzen und wird daher meist erst spät erkannt. Eine frühzeitige Erkennung ist allerdings sehr wichtig, weil sich die potentiell pathogene Keime im Körper auf unterschiedliche Weise verteilen und an anderen Organen verschiedene Krankheiten verursachen können. Wenn zum Beispiel diese Keime über die Atemwege in die Lunge gelangen, dann können diese dort eine Lungenentzündung auslösen oder über die Speiseröhre zu Gastritiden führen. Von diesen direkten pathogenen Mechanismen lassen sich weitere, indirekte Mechanismen unterscheiden, bei denen Entzündungsreaktionen im Parodont entweder durch in die Blutbahn verschleppte Mikroorganismen oder deren Nebenprodukte indirekte, systemische Effekte haben. Folglich stellt die Parodontitis eine Ursache chronischer Entzündungen dar, die ein ausschlaggebender Faktor in der Pathogenese von anderen Erkrankungen, wie zum Beispiel Diabetes Typ 2 oder rheumatoiden Arthritiden sein könnte (Lewis W. & Gerard J.L. 2015).

#### **3.1.1. Gingivitis**

Eine Parodontitis beginnt immer mit Gingivitis, einer komplexen Entzündungsreaktion des Bindegewebes. Bei einer Gingivitis gilt das Zahnfleischbluten als Leitsymptom (Mausberg, 2006). Dabei können auch Symptome wie Rötung, Schwellung des Zahnfleisches, empfindlichere Zähne und Mundgeruch vorkommen. Schmerzen sind hierbei recht selten (Mausberg, 2006). Das Gewebe um den Zahn wird dabei nicht

zerstört. Je nach befallenen Zahnflächen kann die Erkrankung lokal oder generalisiert ablaufen.

### **3.1.2. Ätiologie**

Auf der Zahnoberfläche im Sulkusbereich bildet sich ein dysbiotischer Biofilm in dem sich die Bakterien vermehren und reifen. Dieser Biofilm ist die Ursache einer Entzündung des Zahnhalteapparates.

Die Parodontitis beginnt mit einer Initialläsion und danach folgt eine Frühläsion. In dieser Phase ist die Entzündungsreaktion reversibel. Dabei kommt es zur Auflockerung des Saumepithels am Sulkusboden und die ersten Entzündungszeichen sind vorhanden. Die Gefäßpermeabilität steigt, neutrophile Granulozyten und Serumflüssigkeit treten aus, was zu einer Ödembildung führt. Es folgt eine etablierte Läsion, bei der sich die Sulkusepithel und Saumepithel entzünden. Beim Fortschreiten der Entzündungsprozesse entsteht aus der etablierten eine fortgeschrittene Läsion. In dieser Phase breitet sich die Entzündungsreaktion auf das Parodontium aus, was zu einer Gewebedestruktion führt. Diese Phase wird als Parodontitis bezeichnet (Tonetti et al., 2018).

Viele Faktoren, wie systemische Erkrankungen, die genetisch bedingte unspezifische und spezifische Immunabwehr, die individuelle Mundpflege, das soziale Umfeld, sowie psychische Faktoren des Patienten haben Einfluss auf Entstehung und Ablauf dieser Erkrankung. Dabei lassen sich die Risikofaktoren in modifizierbare und nicht modifizierbare Risikofaktoren unterteilen. Zu den modifizierbaren Faktoren zählen beispielsweise der Konsum von Tabak, ein erhöhtes Blutzuckerspiegel sowie nicht adäquate Mundhygiene. Nicht modifizierbar sind exemplarisch Alter, hormonelle Veränderungen wie z.B. in der Schwangerschaft und genetisch bedingte Erkrankungen des Patienten.

### **3.1.3. Klassifikation**

Das verbesserte Verständnis der Parodontitis und deren Ursachen führte 2018 zu einer neuen Klassifikation der parodontalen und periimplantären Erkrankungen (Papapanou et al., 2018; Tonetti et al., 2018). Diese Klassifikation charakterisiert die

Parodontitis als multidimensionale Krankheit und berücksichtigt Schwere, Umfang und Progression, indem sie ein Staging- und Grading-System nutzt (Abbildung 1). Anders als bisherige Klassifikationen rückt diese die Entstehung, Früherkennung und Prävention der Parodontitis mehr in den Focus.

Das Staging (Stadien) erfasst Aufschluss über den Schweregrad der Erkrankung sowie die Komplexität ihrer Behandlung und wird durch klinische und röntgenologische Befunde bestimmt. Berücksichtigt werden klinischer Attachmentverlust, röntgenologischer Knochenabbau, Sondierungstiefen, vertikale Defekte, Furkationsbeteiligung, Zahnbeweglichkeit und Zahnverluste (Papapanou et al., 2018)

### Neue Klassifikation

		Staging			
		Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
Schweregrad	Interdentaler CAL an der Stelle mit größtem Verlust	1–2 mm	3–4 mm	≥ 5 mm	≥ 5 mm
	Röntgenologischer Knochenabbau	Koronales Drittel (< 15 %)	Koronales Drittel (15–30 %)	Mittleres bis apikales Drittel	Mittleres bis apikales Drittel
	Zahnverlust	Kein Zahnverlust durch Parodontitis		Zahnverlust durch Parodontitis ≤ 4 Zähne	Zahnverlust durch Parodontitis ≥ 5 Zähne
Komplexität	Lokal	Max. Sondierungstiefe ≤ 4 mm  Vorwiegend horizontaler Knochenverlust	Max. Sondierungstiefe 4–5 mm  Vorwiegend horizontaler Knochenverlust	Zusätzlich zu Komplexizität aus II:  Sondierungstiefen ≥ 6 mm  Vertikaler Knochenabbau ≥ 3mm  Furkationsbefall Grad II oder III  Moderater Kammdefekt	Zusätzlich zu Komplexizität aus III:  Notwendigkeit einer komplexen, interdisziplinären Rehabilitation aufgrund von: mastikatorischer Dysfunktion; sekundärem okklusalem Trauma (Zahnbeweglichkeit ≥ Grad 2)  Ausgeprägtem Kammdefekt; Verlust der Bisshöhe, Zahnwanderung, Auffächerung der Front  Weniger als 20 Restzähne mit 10 okkludierenden Paaren
Ausdehnung und Verteilung	Wird zur genauen Beschreibung des Stagings verwendet	Für jedes Stadium Ausdehnung als lokalisiert (< 30 % der Zähne), generalisiert oder als Molaren/Inzisiven-Muster beschrieben			



Grading					
Stadium I			Grad A: langsame Progressionsrate	Grad B: moderate Progressionsrate	Grad C: rasche Progressionsrate
Primäre Kriterien	Direkte Evidenz	Longitudinale Daten (röntgenologischer Knochenabbau oder Parodontalstatus mit Angabe des CAL)	Kein Verlust	< 2 mm über 5 Jahre	≥ 2 mm über 5 Jahre
	Indirekte Evidenz	Knochenabbau (%)/Alter	< 0,25	0,25–1,00	> 1,00
		Phänotyp	Erheblicher Biofilm	Zerstörung proportional zum Biofilm	Größere Zerstörung durch vorhandenen Biofilm zu erwarten; klinisches Bild lässt Episoden rascher Zerstörung und/oder frühen Beginn vermuten (z.B. Molaren/Inzisiven Muster oder behandlungsresistente Erkrankung)
Modifikatoren	Risikofaktoren	Rauchen	Nichtraucher	Raucher, < 10 Zig./Tag	Raucher, ≥ 10 Zig./Tag
		Diabetes	Kein Diabetiker, normoglykämisch	HbA <sub>1c</sub> < 7,0 % bei Patienten mit Diabetes	HbA <sub>1c</sub> ≥ 7,0 % bei Patienten mit Diabetes

**Abbildung 1:** Die neue Klassifikation der Parodontitis - Staging und Grading nach Papapanou et al., 2018; Tonetti et al., 2018.

Das Grading (Grade) erfasst Aufschluss über die Progression der Erkrankung und berücksichtigt dabei individuelle Risikofaktoren.

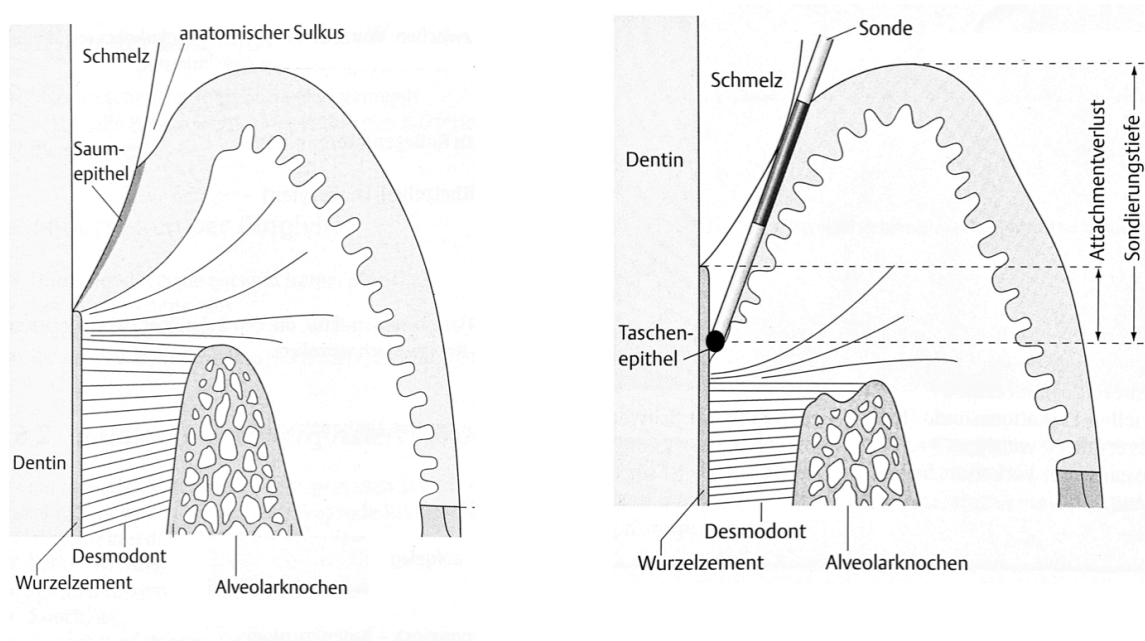
### 3.1.4. Klinische Zeichen

Zu den klinischen Zeichen der Parodontitis, die bei dieser Studie berücksichtigt wurden, gehören:

- Klinischer Attachmentverlust - klinischer Verlust an bindegewebigem Attachment
- Abbau des Alveolarknochens - dieser wird anhand von Röntgenbildern identifiziert
- BOP (Bleeding on Probing) - stellt ein Untersuchungsverfahren dar, bei dem eine Sonde in den Zahnfleischsulkus eingeführt wird. Bei vorhandener Entzündung (Parodontitis) entsteht eine Blutung.

Diese Parameter dienen in der klinischen Zahnmedizin bislang als wichtige Hilfsmittel bei der Diagnostik und Prognostik von Parodontalerkrankungen (Abbildung 2).

## Anatomie des Parodontiums



**Abbildung 2:** Anatomie des gesunden und Parodontitis befallenem Parodontiums

### 3.1.5. Inzidenz

In den industrialisierten Ländern beträgt die Prävalenz der destruktiven Parodontitiden in der Bevölkerung zwischen 10% und 25% (Plagmann, 1998), deren Behandlungen führen zu beachtlichen Kosten für Patienten und Krankenkassen. Es wird geschätzt, dass in Deutschland ca. 20 Millionen Menschen an Parodontalerkrankungen leiden und dass davon ca. 8 Millionen schwere Fälle sind (Holtfreter et al., 2010). Bei der Parodontitis nehmen die Morbidität und der Schweregrad mit dem Alter zu. Bei den Menschen in der Altersgruppe der 35-bis 40-jährigen kommt die Parodontitis häufig vor. In dieser Altersgruppe haben 43,4% eine mittelschwere und 8,2% eine schwere Parodontitis. Am häufigsten ist die Parodontitis bei den Senioren anzutreffen. In der Altersgruppe der 65-bis 74-jährigen findet man bei 44,8% eine mittelschwere und bei 19,8% eine schwere Form der Parodontitis (Cholmakow-Bodechtel, 2016). Da die Lebenserwartung der Bevölkerung immer weiter steigt, sind die Anforderungen an die Prävention dieser Krankheiten immer größer geworden.

Weil sich Parodontalerkrankungen oft schleichend und ohne nennenswerte Schmerzen entwickeln, dauert es häufig mehrere Jahre oder gar Jahrzehnte, bis eine Par-

odontitis diagnostiziert und behandelt wird. Bei einem zu späten Behandlungsbeginn kann möglicherweise selbst durch eine adäquate Therapie der Zahnverlust nicht mehr verhindert werden (Rädel et al., 2019).

Die Fokussierung der Forschung auf die Entstehungsmechanismen von Parodontitiden gewinnt rasant an Bedeutung, weil zum Beispiel eine rechtzeitige Erkennung der Parodontitis durch den Nachweis von bestimmten microRNAs eine irreversible Gewebeerstörung verhindern könnte. Die Entwicklung neuer frühzeitiger und minimal invasiver Parodontitisdiagnosemethoden ist deshalb von hoher Relevanz für die zukünftige Zahnmedizin. Die entsprechenden Möglichkeiten und die Methoden der frühzeitigen Therapie müssten noch entwickelt, beziehungsweise bereits bekannte Methoden sollten angepasst werden.

### **3.2. microRNA**

Die microRNAs sind kurze nichtkodierende RNAs (Ribonukleinsäure) mit einer durchschnittlichen Länge von 22 Nukleotiden. Die erste microRNA wurde vor ca. 30 Jahren im Nematoden *Caenorhabditis* als wichtiger Entwicklungsregulator *lin-4* entdeckt. Ursprünglich glaubte man, dieser sei ein konventionelles, Protein kodierendes Gen. Erst die Forschungsarbeiten von Ruvkun und Ambros machten die überraschende Entdeckung, dass *lin-4* nicht für ein Protein kodierte, sondern für regulatorische RNA (Lee RC. et al.1993; Wightman B.et al.1993).

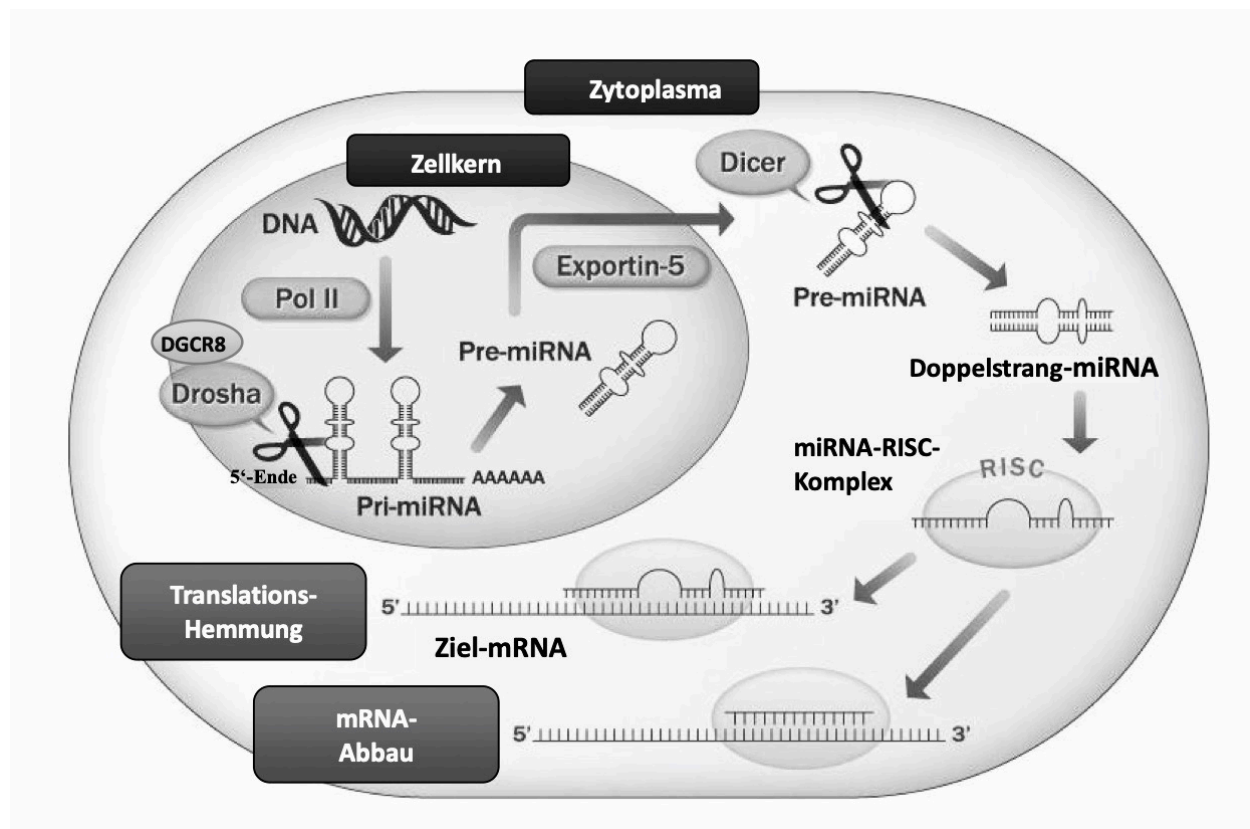
Obwohl sie bis vor relativ kurzer Zeit unbemerkt geblieben sind, machen microRNAs bis zu 5% der tierischen Gene aus (Bentwich et al. 2005), was sie zu den am häufigsten vorkommenden Regulatormolekülen macht. Deswegen ist es nicht überraschend, dass eine genetische Deletion eines Schlüsselenzyms der microRNA-Prozessierung zum Tod von Mäusen schon während der Embryonalentwicklung führt (Yang et al.2005).

#### **3.2.1. Entstehung**

Reife microRNAs werden in einem mehrstufigen Prozess erzeugt (Winter et al.2009). Zuerst entstehen primäre microRNA-Transkripte (Pri-miRNA) durch Transkription mit-

tels RNA- Polymerase II oder III. Diese enthalten eine oder mehrere Haarnadel-Strukturen. Die Endonuklease DROSHA schneidet den doppelsträngigen „Stamm“ der Haarnadelstruktur auf ca. 11 Basen, erzeugt so die Vorläufer- microRNA (Pre-miRNA), die anschließend aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert wird. Dort wird die Schleife der Pre-miRNA geschnitten und entsteht ein microRNA-Duplex, bestehend aus einem 5p- und einem 3p-Strang. Einer der beiden Stränge bildet die reife microRNA, der die regulatorische Aktivität der microRNA vermittelt. Der komplementäre Strang wird dagegen abgebaut (Abbildung 3). Allerdings ist inzwischen eine Vielzahl von Ausnahmen von dem hier dargestellten kanonischen microRNA-Biosyntheseweg bekannt, die oft nur für einzelne microRNAs gelten (Winter et al.2009). Insbesondere wird auch zunehmend klarer, dass in vielen Fällen beide Stränge des microRNA-Duplex funktionell aktiv sein können und nicht zwangsläufig einer von beiden abgebaut wird.

### Synthese der microRNA



**Abbildung 3:** Synthese der microRNA, modifiziert nach Nohata et al. 2012

### **3.2.2. Wirkung**

Die microRNAs interagieren mit den 3'-untranslatierten Regionen (3'-UTRs) von Messenger-RNAs (mRNAs). Die Regulation der Genexpression erfolgt durch mRNA-Abbau oder durch eine translationale Repression (Ha und Kim 2014; Nilsen 2007). Einzelne microRNAs können mehrere mRNA-Ziele modulieren. Auf der anderen Seite kann eine einzelne mRNA durch verschiedene microRNAs reguliert werden (Lim et al. 2005). microRNAs wirken in komplexen Netzwerken und steuern viele Zielgene (Selbach et al. 2008), ihre Expression ist spezifisch für Zellen (Gewebe) und zeitlich reguliert. microRNAs sind an vielen Prozessen im Körper beteiligt und die Expression von microRNAs ist mit diversen Krankheiten verbunden (Paul et al. 2018).

In einigen Studien aus den letzten Jahren wurde über unterschiedliche microRNA-Expressionen bei oralen Erkrankungen berichtet. Dabei unterschieden sich gesunde und entzündete Gewebe hinsichtlich ihrer microRNA-Expressionen in der Mundschleimhaut (Amaral et al. 2019; Lee et al. 2011; Perri et al. 2012; Stoecklin-Wasmer et al. 2012; Xie et al. 2011), im Speichel (Nisha et al. 2019; Fujimori et al. 2019), in der Zahnfleischflüssigkeit (Saito et al. 2017) und im peripheren Blut (Zhu et al. 2017).

### **3.3. Ziel**

Das Ziel unserer Studie war es, diese microRNAs im Blut von Parodontitispatienten und gesunden, parodontitisfreien Kontrollgruppen zu identifizieren. Im Gegensatz zu Proteinen oder mRNA (messenger RNA) haben sich microRNAs in biologischen Proben als hochgradig stabil erwiesen und können somit als Biomarker verhältnismäßig einfach aus Geweben oder biologischen Flüssigkeiten, wie z.B. Blut, isoliert werden. Da Blut deutlich zugänglicher ist als Gewebe, könnte die Identifizierung von höheren Konzentrationen der microRNAs, die ins Blut sekretiert werden, möglicherweise zu Biomarkern für die Diagnose vor den klinischen Symptomen beitragen.

## 4. Methoden

### 4.1. Probanden

Für diese Studie wurde Blut bei insgesamt 88 Personen untersucht.

Wir haben insgesamt 18 Patienten mit Parodontitis als Fallgruppe genommen, von denen 5 weiblich und 13 männlich waren (Tabelle 1). Diese Patienten wurden an den Universitätskliniken Kiel, Bonn, Dresden (Deutschland) und Amsterdam (Niederlande) rekrutiert. Hier handelt es sich um unbehandelte Parodontitispatienten deutscher oder niederländischer Ethnizität. Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung jünger als 58 Jahre.

Einschlusskriterien, neben der Diagnose Parodontitis, waren mindestens sieben Zähne mit einem Knochenverlust von mindestens 1/3 der Wurzellänge, oder einem Attachmentverlust von  $\geq 5$  mm in Verbindung mit Blutung bei Sondierung (BoP  $\geq 50\%$ ). Zur Zeit der Untersuchung waren bei den Patienten mindestens 20 Zähne vorhanden, davon waren 7-28 Zähne erkrankt.

Ausschlusskriterien waren akute oder chronische Erkrankungen sowie Allergien. Die Patienten hatten 6 Monate vor Blutabnahme keine Antibiotika zu sich genommen. Unter den Teilnehmern waren 5 Raucher. Am Tag der Blutabnahme rauchten sie nicht.

Die Kontrollgruppe bestand aus 70 deutschen Blutspendern, deren Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Aufnahme 44 Jahre betrug. Das Verhältnis von Frauen zu Männern betrug 2:1. Die Teilnehmer der Kontrollgruppe wurden am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg sowie an den Universitäten Homburg, Kiel und Würzburg rekrutiert. Alle Teilnehmer gaben in einem Fragebogen an, frei von Parodontitis und anderen systemischen Erkrankungen zu sein.

Die venöse Blutabnahme erfolgte aus der Ellenbeuge. Pro Proband wurden 2 PAX-gene-Blut-RNA Röhrchen (BD, Franklin Lakes, New Jersey USA) verwendet. Jedes

Röhrchen enthält 6,9ml RNA-Stabilisierungslösung und ist für die Probenahme von 2,5ml Blut pro Röhrchen geeignet. Durch die Stabilisierungslösung wurden die Blutzellen lysiert und die RNA gleichzeitig stabilisiert. Die gesamten RNA inklusive microRNAs wurde mit dem miRNeasy-Kit nach Herstellerangaben isoliert (Qiagen GmbH, Hilden).

Die Eigenschaften der Fälle und Kontrollen wurden in Keller et al. 2011 beschrieben. Alle Teilnehmer gaben vor der Teilnahme eine schriftliche Einverständniserklärung ab. Die Genehmigung für das Projekt wurde von der Ethikkommission jeder teilnehmenden Institution erhalten.

**Tabelle 1: Struktur der untersuchten Probanden**

Patienten	Alter (zum Zeitpunkt der Untersuchung)	Geschlecht (m-männlich w-weiblich)	Anzahl betroffener Zähne	Universitätsklinikum
1	49	m	14	Kiel
2	43	w	25	Kiel
3	58	m	21	Kiel
4	30	m	28	Kiel
5	53	w	10	Bonn
6	50	m	11	Bonn
7	50	m	8	Bonn
8	48	m	9	Bonn
9	40	w	9	Bonn
10	54	m	>10	Dresden
11	54	w	>10	Dresden
12	50	m	>10	Dresden
13	53	m	>10	Dresden
14	39	m	>10	Dresden
15	40	m	7	Dresden
16	50	m	10	Bonn
17	36	m	7	Amsterdam
18	35	w	8	Amsterdam

## **4.2. Microarray-Screening**

Die gesamten microRNAs wurden mit dem Geniom Biochip-Array „miRNA Homo sapiens“ unter Verwendung von Geniom Realtime Analyzer (GRTA, febit gmbh, Heidelberg, Deutschland) analysiert (ElSharawy et al. 2012). Die Analyse des Microarrays wurden nach dem beschriebenen Mikroarray-Basierten Screenings-Ansatzes durchgeführt (Keller et al. 2009a; Keller et al. 2009b). Diese Microarray-Daten wurden in der öffentlich verfügbaren Datenbank Gene Expression Omnibus hinterlegt (GEO; Zugangs-ID GSE27905; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo>).

Um die microRNA-Expressionsunterschiede zwischen Fällen und Kontrollen zu bewerten, wurden mit Hilfe des R-Testpakets (<http://www.r-project.org/>) verschiedene statistische Messungen durchgeführt. Dazu gehörten der parametrische t-Test (ungepaart, zweiseitig), der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (ungepaart, zweiseitig), ein lineares Modell mit P-Werten, die nach einem empirischen Bayes-Ansatz berechnet wurden, AUC-Werte und Faltquotienten. Da die microRNAs-Ergebnisse ungefähr normal verteilt waren (P-Werte berechnet durch Shapiro Wilk-Test), wurden die Werte des parametrischen t-Tests angegeben. Für alle Hypothesentests bei der Analyse der Geniom Biochip-Array-Daten wurden die resultierenden P-Werte für Mehrfachtests durch Benjamini-Hochberg-Korrektur angepasst.

## **4.3. Auswahlkriterien von microRNAs für Folgeexperimente**

Um die Zielgene zu nennen wurden microRNAs gewählt, die im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine höhere Expression im Blut von Parodontitispatienten aufweisen und die in früheren Studien an Parodontitispatienten vorgekommen sind.

Folgende Kriterien wurden dabei berücksichtigt :

- (1) unterschiedliche Expression in Biopsien von Gingiva von Parodontitisfällen im Vergleich zu Biopsien von gesunden Kontrollen
- (2) die differentielle Expression wurde in mindestens zwei dieser unabhängigen Array-basierten microRNA-Expressionsprofilstudien veröffentlicht
- (3)  $\geq 2$ -fache Erhöhung in beiden Studien



Bei der PubMed-Literatursuche wurde gezielt nach Microarray-Studien recherchiert, die microRNA-Expression in der Gingiva analysiert haben. Dabei wurden die Begriffe microRNA, Microarray, Parodontitis, orale Entzündung, Gingiva und Mundschleimhaut verwendet.

#### **4.4. Zellkultur**

Primärzellkulturen für diese Studie wurden erzeugt und kultiviert (Freitag-Wolf et al. 2019).

Primäre gingivale Fibroblasten (pGFs) wurden in einem Zellwachstumsmedium (DMEM, 10% FCS, 1% Amphotericin B, 1% Pen / Strep, 1% nicht essentielle Aminosäuren) kultiviert. Einen Tag vor der Transfektion wurden die pGFs (Passage 3-4) in Gewebekulturplatten mit 6 Vertiefungen (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz) ( $1,8 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung) ausgesät.

HeLa-Zellen wurden in Zellwachstumsmedium (Earles MEM, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 1% nicht essentielle Aminosäuren, 1% Pen./Strep.) kultiviert. Einen Tag vor der Transfektion wurden diese in Gewebekulturplatten mit 6 Vertiefungen (TPP -  $7 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung) ausgesät.

#### **4.5. Transfektion**

Die gewonnenen Zellkulturen wurden weiter verarbeitet. Jeweils drei unabhängige pGFs-Kulturen wurden in drei technischen Replikaten ( $N = 9$ ) mit drei mirVana-Mimetika (ThermoFisher Scientific) transfiziert: mirVana miRNA Mimetik miR374b-5p wurde verwendet um miRNA hsa-miR-374b-5p nachzuahmen. Die mirVana miRNA Mimetik Negative Control # 1 wurde zur Normalisierung zwischen den Proben verwendet. Als positive Kontrolle wurde das mirVana miRNA-Mimetikum miR-1 verwendet. Dieses vermindert die Expression des Gens Protein Tyrosine Kinase 9 (PTK9). Die microRNAs wurden unter Verwendung von Lipofectamin-RNAiMAX-Reagenz gemäß den Anweisungen des Herstellers transfiziert und nach 24 Stunden zweimal mit PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen. Der anschließende Zellzerfall

und die vollständige RNA-Extraktion wurden unter Verwendung des RNeasy Mini Kit (Qiagen) durchgeführt.

HeLa-Zellen wurden in drei biologischen Replikaten mit dem Reportergenplasmid pGL4.24 einschließlich der UHMK1 3' UTR und pRL-SV40 als Renilla Luciferase Kontroll-Reportervektor (Promega) im Verhältnis 1:10 unter Verwendung eines jet-PEI-Transfektionsreagens (Polyplus-Transfektion) transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion des Reportergenplasmids pGL4.24 und pRL-SV40 wurden die Zellen mit der mirVana-miRNA Mimetikum miR374b-5p, der mirVana-miRNA Mimetikum Negative Control # 1 und der mirVana Mimetikum miR-1 transfiziert. Die Transfektion wurde unter Verwendung von Lipofectamin-RNAiMAX-Reagenz durchgeführt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die HeLa-Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nachfolgender Zellaufschluss mit passivem Lysepuffer und Luciferase-Messung wurde unter Verwendung des Dual-Luciferase-Reporter-Assay-Systems (Promega) durchgeführt. HeLa-Zellen wurden auch in drei biologischen Replikaten mit dem Reportergen-Plasmid pGL4.24 unter Verwendung von jetPEI-Transfektionsreagenz (Polyplus-Transfektion) transfiziert. Nach 24 Stunden folgte transfektion mit mirVana-miRNA-Mimetikum, nach weiteren 16 Stunden wurden die HeLa-Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die vollständige RNA wurde unter Verwendung des RNeasy Mini Kit (Qiagen) extrahiert.

#### **4.6. Genexpressionsanalyse**

Die im vorherigen Schritt aus pGFs gewonnene Gesamt-RNA wurde für die Analyse verwendet.

Drei biologisch unabhängige Replikate von Zellkulturen von jeweils drei verschiedenen Spendern wurden dreifach mit mirVana-Mimetikum miR374b-5p, miRNA-Mimetikum Negativkontrolle Nr. 1 und mirVana-Mimetikum miR-1 transfiziert. Aus imitierten miR374b-5p- und Negativkontroll # 1-transfizierten Zellen isolierte RNA wurde in biologischen Triplikaten mit dem Human Clariom D Expression Array (Affymetrix) hybridisiert (Hubberten et al. 2019). Das Array-Design deckte das transkribierte menschliche Genom mit > 540.000 Transkripten aller bekannten kodierenden und nicht kodierenden Spleißvarianten ab. Die Expressionsdaten wurden unter Verwendung der Partek Genomics Suite-Software (Partek) analysiert. Zusätzlich wurde Gesamt-RNA

aus der Positivkontrolle, mit mirVana imitierten miR-1-transfizierten Zellen isoliert, um die Verminderung von PTK9 durch qRT-PCR zu validieren.

#### **4.7. Identifikation von Bindestellen der identifizierten microRNA in den 3'UTRs proteincodierender Gene**

Im nächsten Schritt sollten die biologischen Ziele von microRNAs vorhergesagt werden. Dafür wurden die 3'UTR von mRNA-Sequenzen mit dem Online-Tool Target-ScanHuman untersucht (Version 7.1). Analysiert wurden diese auf das Vorhandensein von konservierten 8mer- und 7mer-Stellen die mit der Samenregion von miRNA hsa-miR-374b-5p übereinstimmen (Agarwal et al. 2015).

#### **4.8. Klonierung der UHMK1 3'UTR in das Reporterplasmid pGL4.24**

Genomische DNA (gDNA) wurde aus pGFs unter Verwendung des AllPrep DNA / RNA / miRNA Universal Kits (Qiagen) extrahiert.

2.055 bp der 3'UTR von UHMK1 enthalten Bindungsstellen der miRNA hsa-miR-374b-5p. Aus der extrahierten und aufgereinigten gDNA wurde unter Verwendung passender Vorwärts- und Rückwärtsprimer, welche zusätzlich eine XbaI-Restriktionsstelle enthielten, diese 3'UTR mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) spezifisch amplifiziert. Die PCR wurde mit der Phusion High-Fidelity PCR Polymerase (NEB) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Primersequenzen waren: fwd-Primer 5'-AAT TGG CCT CTA GAT GCC TGG AAA TAG CCT TGG T-3' und rev-Primer 5'-AAT TGG CCT CTA GAT CTG CTG GAA AAG ATA GGG C-3'. Das PCR-Produkt wurde unter Verwendung des QIAquick-Gelextraktionskits (QIAGEN) aufgereinigt und mit dem XbaI-verdauten Plasmid pGL4.24 (Promega) gebunden. Das modifizierte Plasmid wurde unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kit gereinigt. Die Sequenz wurde unter Verwendung der Sanger-Sequenzierung (LGC Genomics) auf Genauigkeit analysiert.

#### 4.9. Quantitative RT-PCR

Anschließend wurden die Auswirkungen von mirVana-miRNA-Mimetika auf die pGF-Genexpression und HeLa-Zellen bemessen. Dafür wurden 500 ng der Gesamt-RNA der miRNA-Mimetika-transfizierten pGFs unter Verwendung des cDNA-Reverse-Transcription-Kits mit hoher Kapazität (Applied Biosystems) in cDNA transkribiert. qRT-PCR wurde unter Verwendung von SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Expression des Gens GAPDH (FWD-Primer 5'-GCA TCT TCT TTT GCG TCG; Rev-Primer 5'-TGT AAA CCA TGT AGT TGA GGT) und PTK9 (FWD-Primer 5'-AGC TCA ACT ATG TGC AGT TGG AAA-3', rev-Primer 5'-ACG AGC TGA ATC CTT GGG AA) wurde unter Verwendung der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode wie in (Schmittgen und Livak 2008) beschrieben für hoch- und herunterregulierte Gene quantifiziert.

Von den transfizierten HeLa-Zellen wurden 500 ng der Gesamt-RNA wie oben beschrieben in cDNA transkribiert. Die Gesamt-RNA wurde mit DNase I (Roche) behandelt. Es folgte eine RNA-Fällung bis keine rückverfolgbare Bande durch PCR unter Verwendung von pGL4.24-Plasmidgerüst spezifischen Primern mehr nachgewiesen werden konnte (fwd-Primer: 5'-TTC AAC CCA GTC AGC TCC TT-3', rev-Primer 5'-CAA GAA CTC TGT AGC ACC GC-3'). Die differentielle Expression des Luciferase Reporter-Gens (LUC) dass durch das Plasmid pGL4.24 kodiert wurde, wurde durch qRT-PCR mit Primern quantifiziert und an LUC angefügt (fwd-Primer 5'-ACG-TGC-AAA-AGA-AGC-TAC-CG-3', Rev-Primer 5'-GGC AAA TGG GAA GTC ACG AA-3').

#### 4.10. Luciferase Reportergen

HeLa-Zellen wurden mit den Luciferase Reportergen Plasmiden pGL4.24 und pRL-SV40 (Promega) in einem Verhältnis von 1:10 transfiziert. 24 Stunden später wurden die microRNA-Mimetika transfiziert und weitere 24 Stunden später wurde die Luciferase Proteinaktivität mit einem Orion Microplate Luminometer (Berthold, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers gemessen.

## **5. Ergebnisse**

### **5.1. Identifizierung von microRNAs, die in Blut und Gingiva von Parodontitispatienten erhöht sind**

Mit dem Geniom Biochip-Array, das wir für diese Studie angewandt haben, wurden insgesamt 863 verschiedene microRNAs analysiert (Keller et al. 2011). Davon waren 29 microRNAs auffällig (Tabelle 2) und von diesen 29 microRNAs zeigten drei besondere Unterschiede in der Expression im Blut von Parodontitis-Fällen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Diese microRNAs waren hsa-miR-421 ( $P = 2 \times 10^{-7}$ ), hsa-miR-374b-5p ( $P = 2 \times 10^{-6}$ ) und hsa-miR-363-3p ( $P = 0,0032$ ).

Die Literaturrecherche nach einer Verbindung dieser microRNAs mit Parodontitis ergab folgendes. Es wurden zwei Studien gefunden, die über eine Erhöhung von microRNA hsa-miR-374b-5p berichteten (Lee et al. 2011; Xie et al. 2011) und zwei Studien, in denen eine Erhöhung von hsa-miR-363-3p dokumentiert war (Stoecklin-Wasmer et al. 2012; Xie et al. 2011). In diesen Studien zeigte microRNA hsa-miR-374b-5p eine mehr als 2-fache Erhöhung. Analysiert wurden microRNAs aus den Zahnfleischgeweben der Parodontitispatienten im Vergleich zu den Zahnfleischgeweben gesunder Kontrollen. Aus diesem Grund wurde hsa-miR-374b-5p für Folgeanalysen ausgewählt.

### **5.2. Wirkung von hsa-miR-374b-5p auf primäre humane gingivale Fibroblasten**

Drei Kulturen pGFs von nicht verwandten gesunden Spendern wurden mit dem hsa-miR-374b-5p-Mimetikum transfiziert und mit Clariom D Expression Array dargestellt. Dadurch konnten die Gene identifiziert werden, welche durch hsa-miR-374b-5p in Zellen der oralen Mukosa reguliert werden. Insgesamt wurden 21.448 einzelne Transkripte in pGFs nachgewiesen und die Expression mit der Negativkontrolle (mit microRNA transfizierten pGF-Zellen) verglichen.

Um das Risiko falsch positiver Befunde zu verringern, wurde sowohl eine gepoolte Analyse der microRNA transfizierten Zellen, als auch die als Kontrollen mit einer bio-

logisch nicht aktiven microRNA transfizierten Zellen, durchgeführt. Im Allgemeinen interagieren microRNAs mit den 3'-untranslatierten Regionen (3'-UTRs) von Ziel-mRNAs und unterdrücken die Genexpression durch mRNA-Abbau. Deshalb haben wir in ihrer Aktivität nach verminderten Genen gesucht und diese untersucht. Das Gen UHMK1 (U2AF-Homologiemotiv (UHM -Kinase 1) zeigte den kleinsten p-Wert in der gepoolten Analyse mit  $P = 2,5 \times 10^{-4}$ . Es zeigte die drittgrößte Verminderung der Fold Change mit  $FC = -1,77$ .

### **5.3. Validierung der Wirkung von hsa-miR-374b-5p auf die Expression von UHMK1**

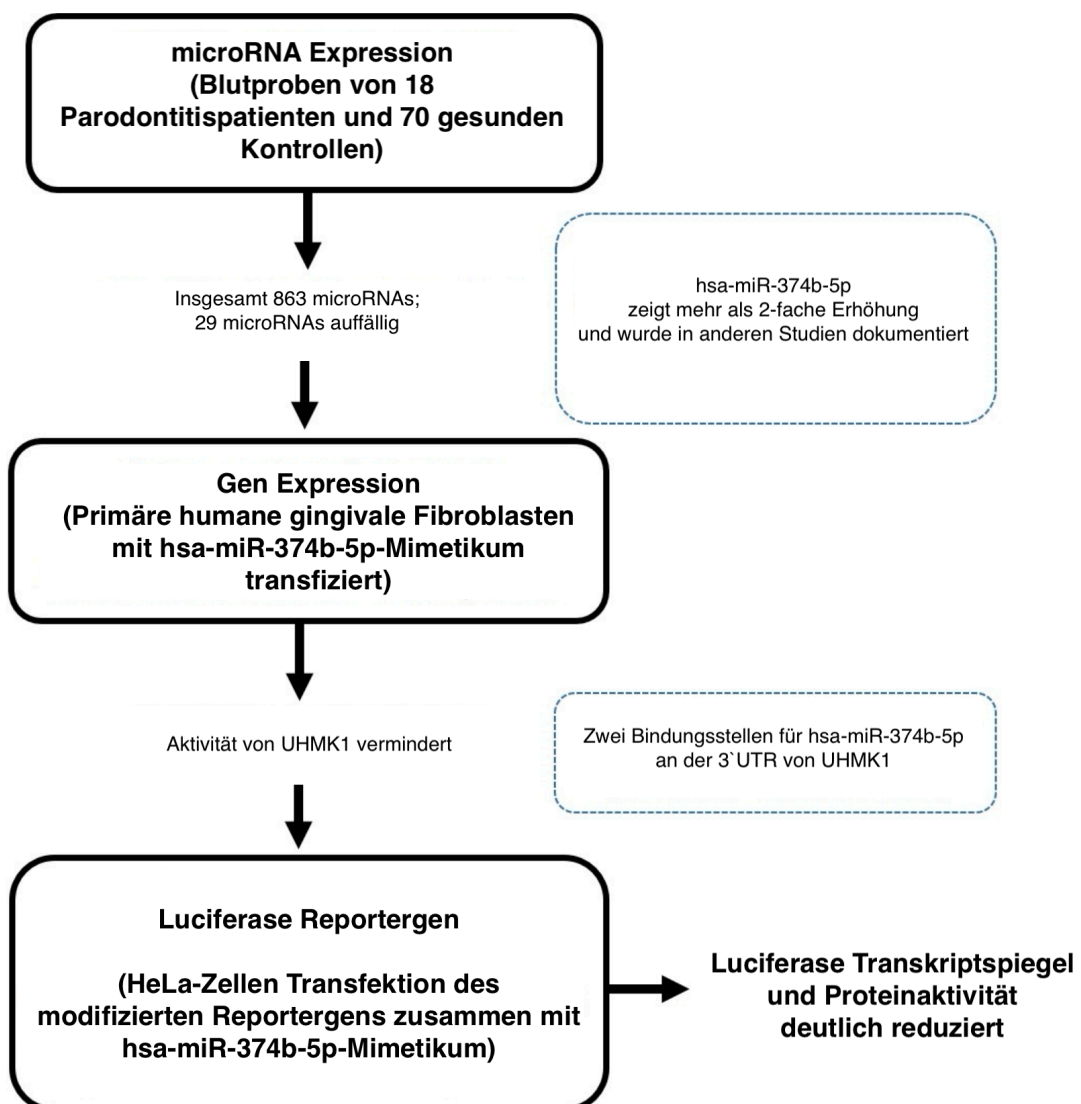
Die beobachteten statistischen Assoziationen auf molekularbiologischer Ebene bedürfen einer Validierung, weil die Auswirkungen einer microRNA auf einzelne Gene gering sind und die umfangreichen Tests in einer genomweiten Expressionsanalyse eine Wahrscheinlichkeit falsch positiver Befunde erhöhen.

Neben der aufgeführten, statistisch signifikanten Assoziation in der Expressionsanalyse, wurde für UHMK1 eine GWAS-Assoziation mit der Knochenmineraldichte und eine charakterisierte Rolle als Regulator der Osteozyten-Differenzierung nachgewiesen (Choi et al. 2016). Deshalb wurde die regulatorische Rolle von hsa-miR-374b-5p auf UHMK1 validiert. Zunächst wurden in der DNA-Sequenz des 3'UTR von UHMK1 nach konservierten 8mer- und 7mer-Stellen untersucht, die mit der Samenregion von hsa-miR-374b-5p übereinstimmten. Es wurde eine stark konservierte 8mer-Stelle in der 3'UTR von UHMK1 identifiziert. Diese Stelle liegt 961 Nukleotiden upstream vor dem Ende der 3'UTR (Supplementary Materials). Eine zweite konservierte 8mer-Stelle befindet sich 2.859 Nukleotide upstream vor dem Ende der 3'UTR.

Als nächstes fügten wir eine 2.055-Nukleotidsequenz der 3'UTR, welche beide 8mer-Stellen enthielt, in die Polyadenylierungsstelle des Luciferase-Gens in den Reportervektor pGL4.24 ein. MicroRNAs interagieren normalerweise mit den 3'-UTRs der Ziel-mRNA, um die Genexpression durch mRNA-Abbau zu unterdrücken. Um nachzuweisen, dass hsa-miR-374b-5p die Ziel-mRNA unterdrückt, quantifizierten wir die Expression des Reportergens nach microRNA Transfektion mittels qRT-PCR. 16 Stunden nach der microRNA Transfektion zeigte die Luciferase-mRNA Expression

eine -1.5-FC Unterdrückung in HeLa-Zellen mit  $P=0.02$ . Um diesen Effekt auf Proteinebene zu demonstrieren, quantifizierten wir die Luciferase Aktivität des Reportergens 24 Stunden nach microRNA Transfektion in HeLa-Zellen. In diesem Experiment zeigte die Luciferase Aktivität eine -1,3-fache Änderung mit  $P=0.013$ .

### Übersicht des Studienablaufs



**Tabelle 2: Liste der microRNAs, die im Blut von Parodontitispatienten erhöht sind**

microRNAs	P-Wert
hsa-miR-744-5p	1.30E-12
hsa-miR-1228-3p	2.53E-11
hsa-miR-758-3p	1.56E-10
hsa-let-7d-5p	2.30E-10
hsa-miR-567	2.54E-09
hsa-miR-1281	2.54E-09
hsa-miR-361-5p	4.12E-09
hsa-miR-1182	2.45E-08
hsa-miR-1181	2.45E-08
hsa-miR-765	3.73E-08
hsa-miR-548h-5p	1.28E-07
hsa-miR-146b-5p	1.28E-07
hsa-miR-199b-5p	1.69E-07
hsa-miR-384	1.69E-07
hsa-miR-9-3p	2.26E-07
hsa-miR-421	2.52E-07
hsa-miR-653-5p	3.52E-07
hsa-miR-637	3.92E-07
hsa-miR-187-5p	3.92E-07
hsa-miR-125a-3p	4.40E-07
hsa-let-7b-3p	6.62E-07
hsa-miR-522-3p	9.56E-07
hsa-miR-490-3p	1.33E-06
hsa-miR-1256	1.33E-06
hsa-miR-551b-5p	1.67E-06
hsa-miR-634	1.67E-06
<b>hsa-miR-374b-5p</b>	<b>2.06E-06</b>
hsa-let-7f-2-3p	2.31E-06
hsa-miR-191-5p	3.87E-06



## 6. Diskussion

Parodontitis gehört sowohl in Deutschland als auch weltweit zu einer der häufigsten chronischen Erkrankung des Menschen und verursacht gleichzeitig extrem hohe Kosten bei Patienten und Krankenkassen. Es ist also von einer immensen Bedeutung Verfahren zu entwickeln, welche frühzeitig eine zuverlässige Parodontitisdiagnose ermöglichen und somit schlimme Krankheitsverläufe durch gezielte Behandlungen verhindern konnten. Eine Chance bietet hierbei die Verwendung moderner Techniken zur Identifikation von Biomarkern. Ein vielversprechender Ansatz stellt die Analyse und Identifikation von micro-RNAs dar. Diese Moleküle haben eine enorme Bedeutung in der Genregulation, was schon vielfach im Zusammenhang mit einigen Krankheiten gezeigt wurde. Aus diesem Grund wurden in dieser Studie differentiell exprimierte RNAs im Blut zwischen Parodontitiskranken und gesunden verglichen. Es wurden drei microRNAs gefunden (hsa-miR-421, hsa-miR-374b-5p und hsa-miR-363-3p), von denen hsa-miR-374b-5p aufgrund vorangehender Studien für weitere Analysen ausgewählt wurde.

Nach meinem Kenntnisstand ist diese Studie die erste in der Dentalforschung, welche mittels Microarray-Daten vorgeschlagenen Zielgene der regulatorischen Wirkung von microRNA zusätzlich durch molekularbiologische Experimente validiert.

### 6.1. hsa-miR-374b-5p und UHMK1 im Zusammenhang mit Parodontitis

Zusätzlich zu anderen Studien, die über eine Erhöhung von hsa-miR-374b-5p in der entzündeten Mundschleimhaut berichteten, zeigte diese Studie eine Erhöhung von microRNA hsa-miR-374b-5p im peripheren Blut von Parodontitispatienten. Darüber hinaus liefert diese Studie Beweise dafür, dass hsa-miR-374b-5p als Transkriptionsrepressor von UHMK1 agiert und die Beweise wurden geliefert dafür, dass eine Überexpression von hsa-miR-374b-5p zu einer Verringerung von UHMK1 führt. Ferner wurde gezeigt, dass dieser Effekt unabhängig von einem bestimmten Zelltyp ist. Demnach liefert diese Studie mit hsa-miR-374b-5p nicht nur einen potentiellen Biomarker, welcher durch eine erhöhte Expression in sowohl der Mundschleimhaut, als auch im Blut von Patienten nachgewiesen werden kann, sondern identifiziert darüber

hinaus direkt auch ein Zielgen, welcher zumindest in Zellkultur von dieser microRNA reguliert wird.

Diese Ergebnisse liefern die ersten Hinweise um den komplexen genetischen und molekularen Prozess der Parodontitis-erkrankung besser zu verstehen und zu behandeln. In zukünftigen Studien könnten weitere Zielgene von hsa-miR-374b-5p identifiziert und getestet, sowie deren Bedeutung im Krankheitsverlauf analysiert werden. Auch könnten zukünftig die Identifikation der konservierten 8mer- und 7mer-Stellen als Ziel von hsa-miR-374b-5p sowie deren Mutationen in der 3'UTR von Genen im menschlichen Genom weitere Hinweise liefern, welche Gene bei Parodontitis eine Rolle spielen und gezielte frühzeitige Behandlungsmethoden ermöglichen.

Das hier identifizierte Zielgen UHMK1 ist aufgrund mehrerer wissenschaftlichen Erkenntnisse im Zusammenhang mit Parodontitis überaus interessant. Es wurde eine Assoziation von UHMK1 mit der Knochenmineraldichte in einer Metaanalyse einer Assoziationsstudie identifiziert (Choi et al. 2016). Dort konnte nachgewiesen werden, dass UHMK1-Knockdown die Osteoblastendifferenzierung verringert und gleichzeitig die Osteoklastendifferenzierung erhöht, sowie dass eine UHMK1-Expression die Differenzierung der Osteoklasten verringert, während eine Überexpression die Differenzierung der Osteoblasten erhöhte. Die Wechselbeziehung zeigt, dass UHMK1 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Osteozytenhomöostase spielt. Dieser Nachweis erklärt den vermehrten Knochenabbau von Alveolarknochen bei Parodontitispatienten.

## **6.2. microRNAs im Blut als Biomarkern**

Der Nachweis von krankheitsspezifischen microRNAs im Blut, das vom erkrankten Gewebe sekretiert wurde, eröffnet eine neue Möglichkeit der Diagnostik bei der Parodontitis. Er eröffnet also eine Methode für die Früherkennung der Parodontitis und zwar schon vor Eintritt der klinischen Zeichen der Erkrankung. Bereits in einer Routineuntersuchung beim Hausarzt wäre es zukünftig denkbar bei Patienten ab 40 Jahren nach dem Biomarker im Blut zu schauen, um rechtzeitig eine Behandlung beim Zahnarzt beginnen zu können.

Aus dem gleichen Grund untersuchten zahlreiche Microarray Studien verschiedene orale Gewebe wie Speichel (Nisha et al. 2019; Fujimori et al. 2019), Sulkusflüssigkeit (Saito et al. 2017) und peripheres Blut (Keller et al. 2011; Yoneda et al. 2019) auf microRNAs und deren Zusammenhang mit oralen Entzündungen. Andere Studien suchten nach differentiell exprimierten microRNAs in entzündeter und gesunder Mundschleimhaut als tatsächlichem Entzündungsort (Amaral et al. 2019; Lee et al. 2011; Perri et al. 2012; Stoecklin-Wasmer et al. 2012; Xie et al. 2011). Diese Studien berichteten über verschiedene microRNAs, die bei Gesunden und Kranken-Probanden unterschiedlich exprimiert wurden. Einige Studien zeigten potenzielle Zielgene und Signalwege unter Verwendung von bioinformatischen Tools. Listen differentiell exprimierter microRNAs und ihrer vorhergesagten Zielgene müssen jedoch sorgfältig interpretiert werden. Eine durchschnittliche microRNA kann Hunderte von Genen regulieren (Krek et al. 2005; Xie et al. 2005). Die meisten Zielgene enthalten nur einzelne Stellen, die möglicherweise nicht ausreichen, um eine starke Repression zu initiieren und eine schalterartige Beziehung unwahrscheinlich machen. Kleine Änderungen von microRNA-Expressionsniveaus können zu Änderungen der physiologischen Zustände führen. Diese Komplexe Regulierung und die geringen Auswirkungen einer einzelnen microRNA auf ein einzelnes Gen, zusammen mit einer hohen biologischen Variation zwischen einzelnen Patienten, Geweben und Krankheitszuständen sind eine große Herausforderung für die Differenzierung zwischen transkriptionellen und statistischen Beobachtungen, sowie pathologischen Prozessen. Aus diesem Grund steht die Entdeckung spezifischer microRNA-Gen-Regulationskreise auch nach einem Jahrzehnt zahnmedizinischer Forschung noch am Anfang.

Die kleinen microRNA-spezifischen Effekte werden durch zufällige biologische Variationen noch weiter verwischt, was Vergleiche von p-Wert-Rankings aus einzelnen Experimenten ausschließt. Daher wurde eine kombinierte Analyse genomweiter Expressionsprofile durchgeführt, die aus drei biologischen Replikaten von pGF-Zellen nach hsa-miR-374b-5p-Transfektion erzeugt wurden. In dieser kombinierten Analyse zeigte UHMK1 die signifikanteste Verminderung aller in pGFs exprimierten mRNAs. Zusätzlich wurden die Effekte, die in den einzelnen Experimenten beobachtet wurden, in der kombinierten Analyse kollektiv addiert.

Dies veranschaulicht die Robustheit des Befundes. Im Rahmen mehrerer unabhängiger Tests beweist die beobachtete Verminderung von UHMK1 jedoch keine biologische Kausalität für die Hemmwirkung von miR-374b-5p. Es blieb allerdings unklar ob das verminderte Transkript ein reales physiologisches Ziel darstellt, dass für eine neue Rolle verallgemeinerbar ist.

Interessant wäre es in weiterführenden Studien zu zeigen ob miR-374b-5p auch schon bei milden Parodontitisverläufen im Blut vorkommt und ob bei solchen Patienten UHMK1 im Blut vorkommt. In anderen Studien wiederum könnte man in menschlichen Genomen nach Mutationen der microRNA und UHMK1 suchen und beobachten ob diese Menschen ein erhöhtes Risiko für Parodontitis haben.

### **6.3. Regulation von UHMK1**

Die microRNA-vermittelte posttranskriptionelle Genregulation wird über sequenzspezifische Bindung der microRNA an die Hauptbinderegion gesteuert. Im Falle von UHMK1 konnten entsprechende Bindungsstellen mit der miR-374b-5p-Samensequenz in der 3'-untranslatierten Region (UTR) identifiziert und dieser Bereich einschließlich der beiden konservierten 8mer Regionen an ein Reportergen kloniert werden.

Dies ermöglichte es zu beweisen, dass die beobachtete Verringerung des Transkriptionsniveaus des Reportergens spezifisch für das Vorhandensein von hsa-miR-374b-5p war. Die Stärke des beobachteten regulatorischen Effekts in pGFs und HeLa-Zellen im Expressionsprofil bzw. im Reportergen-Assay war schwach. Ähnliche Situation wurde bei anderen microRNAs-Zielgenen beobachtet (Khandelwal et al. 2019). Es wurde festgestellt, dass die 3'UTR von UHMK1 7.200 kb umfasst, was die durchschnittliche Länge der menschlichen 3'UTR von 800 Nukleotiden ~ 10-fach überschreitet (Mignone et al. 2002). 3'UTRs sind wahrscheinlich unter Selektion evolviert um microRNA-Zielstellen zu erwerben oder zu eliminieren (Stark et al. 2005). Dementsprechend unterscheidet sich die durchschnittliche 3'UTR-Länge erheblich in Korrelation mit der Gewebespezifität der Genexpression. Die lange 3'UTR-Sequenz von UHMK1 weist auf eine kontrollierte Regulierung hin, die mögliche Schäden durch Fehlregulierung widerspiegeln könnte.

Die meisten identifizierten genetischen Ziele enthalten mehrere Stellen für die spezifische microRNA, während 95% der Gene mit konservierten Zielstellen nur eine Stelle für eine einzelne microRNA aufweisen (Abrahante et al. 2003; Brennecke et al. 2005). Für hsa-miR-374b-5p wurden zwei konservierte 8mer-Stellen in der 3'UTR von UHMK1 identifiziert. Diese Beobachtungen unterstützen die spezifische regulatorische Rolle von hsa-miR-374b-5p für die UHMK1-Expression und tragen zu den Ergebnissen dieser Experimente bei.

Die Kombination von Microarray-Daten und biologischen Experimenten in dieser Studie hat gezeigt, dass dieser Ansatz notwendig ist, um die microRNAs, die für pathologische Prozesse relevant sind zu identifizieren.

Die diagnostischen Biomarker spielen in der Medizin eine immer größere Rolle. Bei einigen Krankheiten sind diese schon bekannt und werden bei der Diagnosenstellung kontrolliert. Zum Beispiel ist es schon seit ein paar Jahren bekannt dass bei akuten Herzinfarkt als Biomarker microRNA-21 im Blut nachweisbar ist (Zhang Y. et al. 2016). MicroRNAs haben sich nicht nur als Biomaker nützlich gezeigt, in einigen Bereichen der Medizin dienen die microRNAs als Ansätze für neue Therapiearten wie zum Beispiel bei der Krebstherapie (Hayes J. et al. 2014). Ob sich ähnliche Möglichkeiten auch bei der Parodontitistherapie mit microRNAs zeigen werden, ist nach dem heutigem Kenntnisstand schwer zu sagen.

#### **6.4. Relevanz von UHMK1 als Biomarker anderer Krankheiten**

UHMK1 ist als Protein und Biomarker auch im Zusammenhang mit anderen bedeutenden Krankheiten wie Krebs (Feng X. et al. 2020) und Schizophrenie (Puri V. et al. 2007) bekannt. An diesem Gebiet wird seit Jahren geforscht. Es wurde gezeigt, dass UHMK1 wichtigen Einfluss auf Prozesse wie der Zellzyklus hat. Das bedeutet, dass UHMK1 auf einige verschiedene Prozesse in menschlichem Körper Einfluss hat. Es ist zu erwarten, dass weitere Forschung an Parodontitisfällen einige neue Kenntnisse auch bei anderen Krankheiten bringen kann.

## 7. Zusammenfassung

Parodontitis ist eine Entzündung des Zahnhalteapparates. Dabei bewirkt das Wechselspiel zwischen entzündungsverursachenden Bakterien und Abwehrreaktionen des Organismus eine irreversible Gewebedestruktion. Einige Studien zeigten eine Beteiligung von microRNAs an den pathologischen Prozessen bei oralen Erkrankungen. Ein Ziel dieser Studie war es, microRNAs zu identifizieren, die bei der Parodontitis vermehrt ins Blut gelangen und die Zielgene der regulatorischen Effekte einer ausgewählten microRNA zu identifizieren, die ebenfalls im Zahnfleisch von Parodontitis Patienten angereichert ist.

Die Auswirkungen einer einzelnen microRNA auf ein einzelnes Gen sind gering, so dass die Ergebnisse schwer greifbar sind. Unter diesen Umständen wurden die Alphafehler-Kumulierungen durch eine Vielzahl unabhängiger Einzelvergleiche durch die Anwendung der Methode der Bonferroni-Korrektur neutralisiert, um die Unterscheidung eines echten positiven Befundes von Typ I-Fehlern in den einzelnen Experiment zu ermöglichen.

Das Blut von 18 Parodontitispatienten und 70 gesunden Kontrollen wurde unter Verwendung des Geniom Biochip-Arrays untersucht und dabei wurden 863 microRNAs quantifiziert. Einige von diesen microRNAs wurden in anderen Studien beschrieben, die die Mundschleimhaut bei Parodontitispatienten untersucht haben. Um Zielgene der microRNA-Regulation zu identifizieren, wurden mirVana-miRNA-Mimetika in primären gingivalen Fibroblasten (pGFs) von drei unabhängigen Spendern überexprimiert. Das genomweite Expressionsprofil wurde in drei biologischen Replikaten unter Verwendung des Clariom D Expression Array (Affymetrix) durchgeführt.

Die Spezifität der microRNA-abhängigen Regulation wurde unter Verwendung eines Reporter-gen-Assays und Luciferase-Aktivität in HeLa-Zellen validiert. Drei microRNAs zeigten eine unterschiedliche Expression in Blut von Parodontitis-Fällen im Vergleich zu dem Blut von gesunden Kontrollen (hsa-miR-421, hsa-miR-374b-5p, hsa-miR-363-3p). hsa-miR-374b-5p hat in zwei unabhängigen microRNA-Expressionsstudien eine mehr als 2-fache Erhöhung in Zahnfleisch bei Parodontitis-Fällen gezeigt. Expressionsprofile in gingivalen Fibroblasten, die mit microRNA-Mimetikum

miR-374b-5p transfiziert wurden, haben das Gen UHMK1 als Zielgen der hsa-miR-374b-5p-Regulation nachgewiesen ( $P = 2,5 \times 10^{-04}$ , Fold Change = -1,8). Dieses Gen spielt eine Rolle bei der Regulation der Homöostase von Osteoblasten und Osteoklasten.

Ich schließe daraus, dass die bei Parodontitis vermehrt im Blut nachzuweisende microRNA hsa-miR-374b-5p an der Regulation von UHMK1 beteiligt ist. Dieses Gen ist an der Differenzierung von Osteozyten beteiligt. Diese Schlussfolgerung erklärt den Knochenverlust bei der Parodontitis.

## 8. Literaturverzeichnis

Abrahante JE, Daul AL, Li M, Volk ML, Tennessen JM, Miller EA, Rougvie AE. 2003. The *caenorhabditis elegans* hunchback-like gene *lin-57/hbl-1* controls developmental time and is regulated by microRNAs. *Dev Cell*. 4(5):625-637.

Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. 2015. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*. 4.

Amaral SA, Pereira TSF, Brito JAR, Cortelli SC, Cortelli JR, Gomez RS, Costa FO, Miranda Cota LO. 2019. Comparison of mirna expression profiles in individuals with chronic or aggressive periodontitis. *Oral Dis*. 25(2):561-568.

Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E et al. 2005. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet*. 37(7):766-770.

Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. 2005. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*. 3(3):e85.

Choi HJ, Park H, Zhang L, Kim JH, Kim YA, Yang JY, Pei YF, Tian Q, Shen H, Hwang JY et al. 2016. Genome-wide association study in east asians suggests UHMK1 as a novel bone mineral density susceptibility gene. *Bone*. 91:113-121.

Cholmakow-Bodechtel C, Füss-Grünig E, Geyer S, Hertrampf K, Hoffmann T, Holtfreter B, Jordan R, Kocher T, Micheelis W, Nitschke I, Noffz S, Scharf L, Schiffner U, Schützhold S, Stark H, Zimmer S. 2016. Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie - Kurzfassung, Berlin/Köln. IDZ ( Institut der Deutschen Zahnärzte ), 1. Auflage, August 2016.



ElSharawy A, Keller A, Flachsbarth F, Wendschlag A, Jacobs G, Kefer N, Brefort T, Leidinger P, Backes C, Meese E et al. 2012. Genome-wide mirna signatures of human longevity. *Aging Cell*. 11(4):607-616.

Feng X, Ma D, Zhao J, Song Y, Zhu Y, Zhou Q, Ma F, Liu X, Zhong M, Liu Y, Xiong Y, Qiu X, Zhang Z, Zhang H, Zhao Y, Zhang K. 2020. UHMK1 promotes gastric cancer progression through reprogramming nucleotide metabolism. *The Embo Journal*. 2020

Freitag-Wolf S, Munz M, Wiehe R, Junge O, Graetz C, Jockel-Schneider Y, Staufenbiel I, Bruckmann C, Lieb W, Franke A et al. 2019. Smoking modifies the genetic risk for early-onset periodontitis. *J Dent Res*. 98(12):1332-1339.

Fujimori K, Yoneda T, Tomofuji T, Ekuni D, Azuma T, Maruyama T, Mizuno H, Sugiura Y, Morita M. 2019. Detection of salivary mirnas reflecting chronic periodontitis: A pilot study. *Molecules*. 24(6).

Ha M, Kim VN. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15(8):509-524.

Hayes J, Peruzzi P.P., Lawler S, 2014. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy

Holtfreter B, Kocher T, Hoffmann T, Desvarieux M & Micheelis W 2010. Prevalence of periodontal disease and treatment demands based on a German dental survey. *J Clin Periodontol*, 37,211-9.

Hubberten M, Bochenek G, Chen H, Hasler R, Wiehe R, Rosenstiel P, Jepsen S, Dommisch H, Schaefer AS. 2019. Linear isoforms of the long noncoding rna cdkn2b-as1 regulate the c-myc-enhancer binding factor rbms1. *Eur J Hum Genet*. 27(1):80-89.

Keller A, Leidinger P, Bauer A, Elsharawy A, Haas J, Backes C, Wendschlag A, Giese N, Tjaden C, Ott K et al. 2011. Toward the blood-borne mirnome of human diseases. *Nat Methods*. 8(10):841-843.

Keller A, Leidinger P, Borries A, Wendschlag A, Wucherpennig F, Scheffler M, Huwer H, Lenhof HP, Meese E. 2009a. Mirnas in lung cancer - studying complex fingerprints in patient's blood cells by microarray experiments. *BMC Cancer*. 9:353.

Keller A, Leidinger P, Lange J, Borries A, Schroers H, Scheffler M, Lenhof HP, Ruprecht K, Meese E. 2009b. Multiple sclerosis: MicroRNA expression profiles accurately differentiate patients with relapsing-remitting disease from healthy controls. *PLoS One*. 4(10):e7440.

Khandelwal N, Dey SK, Chakravarty S, Kumar A. 2019. Mir-30 family mirnas mediate the effect of chronic social defeat stress on hippocampal neurogenesis in mouse depression model. *Front Mol Neurosci*. 12:188.

Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M et al. 2005. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*. 37(5):495-500.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, The C. Elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to Lin-14. *Cell*. 1993; 75:843-854

Lee YH, Na HS, Jeong SY, Jeong SH, Park HR, Chung J. 2011. Comparison of inflammatory microRNA expression in healthy and periodontitis tissues. *Biocell*. 35(2):43-49.

Lewis Winning & Gerard J. Linden, 2015. Periodontitis and systemic disease (Published: 27. November 2015)

Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 433(7027):769-773.

Mausberg R. F. 2006. Parodontopathien. In: Schauder O. Ernährungsmedizin, Prävention und Therapie. Urban & Fischer Elsevier.

Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G. 2002. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol*. 3(3):REVIEWS0004.

Nilsen TW. 2007. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet*. 23(5):243-249.

Nisha KJ, Janam P, Harshakumar K. 2019. Identification of a novel salivary biomarker mir-143-3p for periodontal diagnosis: A proof of concept study. *J Periodontol*. 90(10):1149-1159.

Nohata N, Hanazawa T, Enokida H, Seki N. 2012. microRNA-1/133a and microRNA-206/133b clusters: dysregulation and functional roles in human cancers. *Oncotarget* (2012) 3 (1), S. 9-21.

Papapanou Panos N, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine D. H., Flemmig T.F., Garcia R, Giannobile W. V., Graziani F, Greenwell H, Herrera D, Kao R. T., Kebschull M, Kinane D. F., Kirkwood K. L., Kocher T, Kornman K. S., Kumar P. S., ... Tonetti M. S. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45 Suppl 20, S162–S170.

Paul P, Chakraborty A, Sarkar D, Langthasa M, Rahman M, Bari M, Singha RS, Malakar AK, Chakraborty S. 2018. Interplay between miRNAs and human diseases. *J Cell Physiol*. 233(3):2007-2018.

Perri R, Nares S, Zhang S, Barros SP, Offenbacher S. 2012. MicroRNA modulation in obesity and periodontitis. *J Dent Res.* 91(1):33-38.

Plagmann H-C. 1998 . *Lehrbuch der Parodontologie* S. 86 ; S.167. Hanser, Kiel

Puri V, McQuilin A, Chowdhury K, Datta S, Pimm J, Thirumalai S, Krasucki R, Lawrence J, Quested D, Bass N, Moorey H, Morgan J, Punukollu B, Kandasami G, Curtis D, Gurling H. 2007. Fine Mapping by Genetic Association Implicates the Chromosome 1q23.3 Gene UHMK1, Encoding a Serine/Threonine Protein Kinase, as a Novel Schizophrenia Susceptibility Gene. *Biological Psychiatry.* 2007. S.873-879

Rädel M,Bohm S,Priess H.-W.,Reinacher U & Walter M (2019). *BARMER Zahnreport, 2019: Schriftenreihe zur Gesundheitsanalyse* (1st ed.). Barmer.

Saito A, Horie M, Ejiri K, Aoki A, Katagiri S, Maekawa S, Suzuki S, Kong S, Yamauchi T, Yamaguchi Y et al. 2017. MicroRNA profiling in gingival crevicular fluid of periodontitis-a pilot study. *FEBS Open Bio.* 7(7):981-994.

Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time pcr data by the comparative c(t) method. *Nat Protoc.* 3(6):1101-1108.

Selbach M, Schwanhauser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature.* 455(7209):58-63.

Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM. 2005. Animal microRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'utr evolution. *Cell.* 123(6):1133-1146.

Stoecklin-Wasmer C, Guarnieri P, Celenti R, Demmer RT, Kebschull M, Papapanou PN. 2012. MicroRNAs and their target genes in gingival tissues. *J Dent Res.* 91(10):934-940.

Tonetti M. S., Greenwell H & Kornman K. S., 2018. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Periodontology*, 89 Suppl 1, S159-S172.

Wightman B, Ha I, Ruvkum G, Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75:855-862

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: micro-RNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009;11:228–34.

Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, Lander ES, Kellis M. 2005. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' utrs by comparison of several mammals. *Nature*. 434(7031):338-345.

Xie YF, Shu R, Jiang SY, Liu DL, Zhang XL. 2011. Comparison of microRNA profiles of human periodontal diseased and healthy gingival tissues. *Int J Oral Sci*. 3(3):125-134.

Yang WJ, Yang DD, Na S, Sandusky GE, Zhang Q, Zhao G. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem*. 2005;280:9330–5.

Yoneda T, Tomofuji T, Ekuni D, Azuma T, Maruyama T, Fujimori K, Sugiura Y, Morita M. 2019. Serum microRNAs and chronic periodontitis: A case-control study. *Arch Oral Biol*. 101:57-63.

Zhu JJ, Liu YF, Zhang YP, Zhao CR, Yao WJ, Li YS, Wang KC, Huang TS, Pang W, Wang XF et al. 2017. Vamp3 and snap23 mediate the disturbed flow-induced endothelial microRNA secretion and smooth muscle hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114(31):8271-8276.

Zhang Y, Liu Y.-J, Liu T, Zhang H, Yang S.-J. 2016. Plasma microRNA-21 is a potential diagnostic biomarker of acute myocardial infarction. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2016; 20:323-329.

## **9. Anhang**

- Ethikkommission
- Patienten-Einwilligungserklärung für die Studie

## 9.1. Ethikkommission

27/02/2008 11:09 04315975333  
25/02/2007 11:40 04315971434

ETHIKKOMMISSION KIEL  
WOLF SCHWERIN

S. 01/01  
S. 01/06

# UK SH

UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein  
Institut für Klinische Molekularbiologie, Schillingstr. 12, 24105 Kiel  
Direktor: Prof. Dr. med. S. Schreiber

An die Ethikkommission  
-Prof. Dr. J. Schaub-  
Universitätskinderklinik  
Schwanenweg 20  
24105 Kiel

UNIVERSITÄTSKLINIKUM  
Schleswig-Holstein



Campus Kiel  
Institut für Klinische Molekularbiologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Schreiber  
Klinik für Allgemeine Innere Medizin  
Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich R. Fölsch  
Sektionsleiter: Prof. Dr. med. Stefan Schreiber

Ansprechpartner: Prof. Dr. med. S. Schreiber  
Tel: 0431 / 697-2350  
Fax: 0431 / 697-1434  
E-Mail: s.schreiber@mucosa.de  
Internet: www.kmb.uni-kiel.de

Datum: 27.02.2008

AZ: B231/98

Genetische Assoziationsstudie bei den chronisch-entzündlichen  
Darmkrankungen (Morbus Crohn und Colitis ulcerosa) -  
Zusatzkohorte "Karies und Parodontitis"

hier: Einrichtung einer Klinischen Forschergruppe (Deutsche Forschungsgemeinschaft):  
Ursachen und Folgen von Parodontopathien -  
genetische, zellbiologische und biomechanische Aspekte  
TP 3: Genetische Risikofaktoren parodontaler Entzündungskrankheiten

Sehr geehrter Herr Schaub,

Im Rahmen unserer genehmigten Studie zur Genetik der chronisch-entzündlichen Darmkrankungen (AZ: B231/98) planen wir die ebenfalls genehmigte Zusatzkohorte „Karies und Parodontitis“ (unser Schreiben vom 17.4.2000/5.5.2000; Ihr Schreiben vom 23.05.2000) in ein anderes Drittmittel-Verbundvorhaben einzubringen.

Durch Einrichtung einer Klinischen Forschergruppe mit Kollegen des Universitätsklinikums in Bonn hoffen wir, eine große Kohorte zusammenstellen zu können, um so unser Ziel, Risikogene für die Parodontitis zu finden, schneller zu erreichen. Der Aufbau der Kohorte wird in Ablauf und Datenmanagement über die Infrastruktur von popgen abgewickelt werden. Dabei werden die Prozeduren des geprüften Studienplanes von popgen verwendet (AZ: A 159/03, Votum erteilt am 26.11.2003).

Bitte finden Sie anlegend die geänderten Unterlagen (Merkblatt zur Patientenaufklärung mit Einverständniserklärung) für diese geplante Modifizierung der bestehenden Sammlung. Die Unterlagen basieren auf den entsprechenden, mit der Ethik-Kommission abgestimmten Formularen.

Falls von Ihrer Seite keine Einwände bestehen, würden wir Sie bitten, den Erhalt dieses Schreibens kurz zu bestätigen (gern auch als Fax).

Mit freundlichen Grüßen

*i. V. Dr. Wolf Schwerin*

Universitätsklinikum  
Schleswig-Holstein  
Anstalt des  
öffentlichen Rechts

Vorsitzende/r:  
Prof. Dr. Bernd Kremer, Prof. Dr. Dieter  
Jochem, Dipl.-Kfm. Günter Zwilling,  
Dipl.-Kff. (FH) Barbara Schulte

Ethik-Kommission  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

Zur Kenntnis genommen  
Keine Bedenken

27.2.2008

*J. Schaub*

Prof. Dr. Jürgen Schaub



## 9.2. Patienten-Einwilligungserklärung für die Studie

### UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein

#### Campus Kiel

Klinik für Allgemeine Innere Medizin

Biobank **popgen**

Niemannsweg 13 - 17  
24105 Kiel

#### Studienzentrale

Tel: 0431 / 597-3710 E-Mail: [info@popgen.de](mailto:info@popgen.de)  
Fax: 0431 / 597-3730

#### **BITTE in Druckschrift ausfüllen!**

Vorname:

Nachname:

Straße:

PLZ Ort:

### **POPGEN- STUDIE: GENETISCHE URSACHEN DER PARODONTITIS**

#### **EINWILLIGUNGSERKLÄRUNG (Kopie zum Verbleib bei Ihnen)**

*Lesen Sie den folgenden Text aufmerksam durch und unterschreiben Sie bitte anschließend am Ende der Seite.*

*Sollten einzelne Passagen nicht zu treffen, streichen Sie diese bitte.*



- Ich willige in die Entnahme von 30 ml Blut und die Speicherung der in diesem Zusammenhang gewonnenen Daten ein. Das Eigentum an diesem Material geht damit an das Universitätsklinikum Schleswig-Holstein über.
  
- Ich erteile die Genehmigung zur Einsicht in vorhandene Patientenunterlagen in der Zahnklinik UK S-H Kiel durch den/die verantwortliche/n Studienarzt/-ärztin.

Ich hatte ausreichend Zeit und Gelegenheit zur Entscheidung. Mir ist bekannt, dass durch eine Nicht-Teilnahme keinerlei Nachteile in der weiteren Diagnostik oder Therapie für mich entstehen können.

Darüber hinaus ist mir bekannt, dass ich meine Zustimmung jederzeit widerrufen kann, ohne dass mir daraus Nachteile entstehen.

Mir ist auch bekannt, dass ich zusätzliche Fragen in einem persönlichen Gespräch mit dem/der verantwortlichen Studienarzt/-ärztin klären kann.

....., den .....  
 2010

Unterschrift: .....  
 .....

**Merkblatt zur Einwilligungserklärung siehe Rückseite**

## **Merkblatt zur Einwilligungserklärung**

Wir führen an dem Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel ein Forschungsvorhaben zur genetischen Veranlagung von weit verbreiteten Krankheiten durch. Untersucht werden dabei u.a. *entzündliche Erkrankungen des Zahnfleisches und des Zahnhalteapparates, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Reizdarm, Darmkrebs, Gallensteine, Erkrankungen der Herzkranzgefäße (KHK) und einige neurologische Erkrankungen wie Krampfleiden und Morbus Parkinson (Schüttellähmung)*. Auf der Internetseite [www.popgen.de](http://www.popgen.de) können Sie weitere Informationen zu der Biobank **popgen** finden. An dem Teilprojekt zur Entstehung der Parodontitis beteiligen sich weitere Zahnkliniken und Zahnarztpraxen in Deutschland, Österreich, den Niederlanden und der Schweiz.

Um unsere Forschungserkenntnisse überprüfen zu können, bitten wir Sie um die Einwilligung, Ihnen

### **30 ml peripher venöses Blut**

entnehmen zu dürfen und die daran gewonnen genetischen Daten ebenso wie Ihre zusätzlichen Angaben auf dem beiliegenden Fragebogen ausschließlich zu den oben genannten Forschungszwecken zu speichern. Wir beabsichtigen, aus Ihrem Blut DNA (Erbsubstanz) zu gewinnen, um die genetische Veranlagung zu einer der oben genannten Erkrankungen zu überprüfen. Die dafür verantwortlichen Gene können sich überall im gesamten Erbgut befinden. Es werden jedoch nur die jeweils als relevant bekannten Gene untersucht.

#### Risiken der Blutentnahme:

Wie zu einer Routineblutentnahme werden Ihnen unter sterilen Bedingungen 30 ml Blut aus einer peripheren Vene entnommen. Dazu ist die Punktion einer Vene notwendig. Die Risiken einer Blutentnahme sind: Lokale Infektion ("bakterielle Entzündung, Vereiterung"), Fehlpunktion der Vene und anschließende Ausbildung eines Blutergusses (Hämatom), sehr selten Fehlpunktion einer Schlagader, Schädigung eines Hautnervs mit der möglichen Folge dauerhafter Schmerzen und/oder bleibenden Funktionseinschränkungen. Alle oben genannten Risiken sind bei sachgemäßer Durchführung extrem selten.

#### Speicherung von Daten:

Ihre persönlichen Daten (Name, Vorname, Adresse, Geburtsdatum) werden getrennt von den Probanden gespeichert. Die Proben werden durch eine Strichkodierung pseudonymisiert. Die mit der Probe verbundenen Informationen (d.h. Angaben aus dem Fragebogen, Genotypen) sind nur über diese Kodierung abrufbar. Zur Qualitätskontrolle unserer Daten bitten wir Sie um die Genehmigung, vorhandene Patientenunterlagen einsehen zu dürfen. Für diese spezielle Situation entbinden Sie den behandelnden Arzt von der Schweigepflicht gegenüber verantwortlichen ärztlichen Mitarbeitern des Forschungsvorhabens.

Auf die Daten haben nur autorisierte Mitarbeiter des Forschungsprojektes Zugriff. Da das Projekt unter ärztlicher Leitung steht, unterliegen alle Mitarbeiter der ärztlichen Schweigepflicht. Eine Weitergabe Ihrer Daten an unberechtigte Dritte (insbesondere Arbeitgeber, Versicherungen) ist ausgeschlossen. Die Weitergabe von Proben und Informationen an wissenschaftliche Kooperationspartner erfolgt ohne Angaben zu Ihrer Person. Bei Beendigung der Forschungsaktivitäten (frühestens nach 20 Jahren) werden die Proben und die dazu gehörenden Daten vernichtet. Das Konzept zur Sammlung und Speicherung aller Daten wurde vom Unabhängigen Landeszentrum für Datenschutz Schleswig-Holstein (AZ LD4-16.1/03.001) und der Medizinischen Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (AZ A 156/03) geprüft und positiv bewertet.

Die Herausgabe einzelner persönlicher Untersuchungsergebnisse ist aus forschungsmethodischen Gründen nicht möglich. Durch diese Untersuchungen wird eine Vielzahl von genetischen Merkmalen getestet werden. Es ist der Zweck der Untersuchung, eine Risikoabschätzung für bestimmte genetische Erkrankungen in der „Durchschnittsbevölkerung“ zu erstellen. Dieses schließt eine persönliche Risikobewertung nicht ein. Es ist daher nicht zu erwarten, dass sich durch die Untersuchungen persönlichkeitsrelevante Erkenntnisse ergeben. Auf Ihren Wunsch informieren wir Sie gerne über den allgemeinen Fortgang des Forschungsprojektes. In diesem Fall würden wir Ihren Namen, Ihren Vornamen und Ihre Adresse gemäß den datenschutzrechtlichen Bestimmungen des Landes Schleswig Holstein in einer gesonderten Adressdatei speichern, um Ihnen einen Projektbericht zusenden zu können.

#### Patentrechte

Es kann sein, dass im Rahmen zukünftiger Forschungsergebnisse Patente entstehen, die auf Erkenntnissen basieren, die aus Ihren Proben gewonnen wurden. Solche Patente sind die Voraussetzung für die Entwicklung neuer Medikamente. In diesem Fall besteht kein individueller Patentanspruch, basierend auf Ihrem individuellen biologischen oder genetischen Material.

#### Widerruf

Die Teilnahme an diesen wissenschaftlichen Untersuchungen ist absolut freiwillig. Solange Ihre persönlichen Daten nicht gelöscht sind, kann Ihre Zustimmung jederzeit widerrufen werden. Daraus entstehen Ihnen keinerlei Nachteile. Gegebenenfalls bereits entnommene Proben werden dann unverzüglich vernichtet, und Ihre Daten werden umgehend gelöscht. Einen etwaigen Widerruf Ihrer Zustimmung richten Sie bitte schriftlich an die administrative Leitung popgen, 1. Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Kiel, Niemannsweg 13-17, D- 24105 Kiel.

#### Weitere Fragen

Wünschen Sie ein weitergehendes, ausführliches Arztgespräch, so vereinbaren Sie bitte einen Termin unter 0431/597-3710.

## **10. Danksagung**

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen beteiligten die an diesem Projekt mitgewirkt haben.

Ganz besonders möchte ich mich für die umfassende Betreuung und intensive Unterstützung, sowie für interessante Anregungen bei Herrn Univ.Prof. Dr.rer.nat. Arne Schäfer bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die in jeder Lebenssituation liebevoll an meiner Seite waren. Ihnen widme ich diese Arbeit.

## 11. Veröffentlichung

Englischsprachige wissenschaftliche Veröffentlichung:

**Wiley - Journal of Periodontal Research**

Ricarda Mueller, **Denis Bajric**, Huseyin G. Keceli, Andreas Keller, Henrik Dommisch, Abdou El Sharawy, Arne S. Schaefer

**hsa-miR-374b-5p regulates expression of the gene U2AF homology motif (UHM) kinase 1**

First published: 23 June 2021 <https://doi.org/10.1111/jre.12913>