

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. R. Hickel

**Assoziation von funktionell wirksamen Polymorphismen  
im Gen des Osteopontins mit der Pathogenese der  
chronischen Parodontitis**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde  
an der medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Michaela Zattler

aus  
Landshut

2010

mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr.med.dent. M. Folwaczny

Mitberichterstatter: Prof. Dr.med U. Welsch

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Dipl.-Biol. J. Glas

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M.Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2010

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. DIE CHRONISCHE PARODONTITIS</b>	<b>2</b>
2.1. KLASSIFIKATION DER PARODONTALERKRANKUNGEN	2
2.2. EPIDEMIOLOGIE DER PARODONTITIS	4
2.3. ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE DER CHRONISCHEN PARODONTITIS	5
2.4. DIE PATHOGENETISCHE ROLLE VON BAKTERIEN	7
2.4.1. Entwicklung von einer kommensalen zu einer pathogenen Flora	7
2.4.2. Parodontopathogene Bakterien	8
2.4.3. Aufbau und Funktion des subgingivalen Biofilms	9
2.5. DIE ROLLE DES IMMUNSYSTEMS BEI DER PARODONTITIS	10
2.5.1. Phase der akuten bakteriellen Besiedlung	10
2.5.2. Phase der akuten Immunantwort	11
2.5.3. Immunologische Phase	14
2.5.4. Gewebe- und Knochendestruktion	16
2.6. EINFLUSS DES UMWELTFAKTORS RAUCHEN AUF DIE PARODONTITIS	19
2.7. GENETISCHE BASIS DER CHRONISCHEN PARODONTITIS	21
2.7.1. Die chronische Parodontitis als komplexe genetische Erkrankung	22
2.7.2. Genetische Polymorphismen	23
2.7.3. Methoden der genetischen Analyse bei der chronischen Parodontitis	25
2.7.3.1. Direkte Assoziationsstudien	25
2.7.3.2. Kopplungsgleichgewicht	26
<b>3. OSTEOPONTIN</b>	<b>28</b>
3.1. PHYSIOLOGISCHE EINORDNUNG	28
3.2. MOLEKÜLSTRUKTUR	28
3.2.1. Spaltung durch Thrombin	29
3.2.2. Bindungsmotive von OPN	29
3.2.2.1. Integrine	29
3.2.2.2. Die RGD-Sequenz	29
3.2.2.3. Die SLVVGLR-Sequenz	30
3.2.2.4. Die kryptische Bindungsstelle	30
3.2.2.5. Der CD44-Rezeptor	30
3.2.3. Formen von OPN	31
3.3. OPN FUNKTIONEN BEI ENTZÜNDUNGEN UND DER IMMUNANTWORT	32
3.3.1. Auswirkungen von OPN auf Makrophagen	33

3.3.2.	Auswirkungen von OPN auf Lymphozyten _____	33
3.3.3.	Auswirkungen von OPN auf neutrophile Granulozyten _____	34
3.3.4.	Polarisation der Th1-Antwort durch OPN _____	34
3.4.	OPN FUNKTIONEN IM EPITHEL _____	35
3.5.	OPN FUNKTIONEN BEI DER WUNDHEILUNG _____	36
3.6.	DIE ROLLE DES OSTEOPONTIN BEI DER CHRONISCHEN PARODONTITIS _____	37
3.7.	OSTEOPONTIN-POLYMORPHISMEN IM HUMANEN OPN-GEN _____	38
3.7.1.	Typisierung der Osteopontin-Polymorphismen _____	38
3.7.2.	Polymorphismen innerhalb des Promotorabschnittes _____	38
3.7.2.1.	OPN A-1748G: rs2728127 _____	38
3.7.2.2.	OPN T-616G: rs2853744 _____	39
3.7.2.3.	OPN T-443C: rs11730582 _____	39
3.7.2.4.	OPN delG-156: rs11439060 _____	39
3.7.2.5.	OPN T-66G: rs28357094 _____	40
3.7.3.	Polymorphismen innerhalb eines Exons _____	40
3.7.3.1.	OPN T+282C: rs4754 _____	40
3.7.3.2.	OPN T+750C: rs1126616 _____	40
3.7.4.	Polymorphismen innerhalb eines untranslatierten Genbereichs _____	40
3.7.4.1.	OPN A+1083G: rs1126772 _____	41
3.7.4.2.	OPN A+1239C: rs9138 _____	41
3.8.	GENOTYPISIERUNG DER OPN-POLYMORPHISMEN DURCH REAL-TIME PCR _____	42
<b>4.</b>	<b>ZIELE DER ARBEIT _____</b>	<b>46</b>
<b>5.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN _____</b>	<b>47</b>
5.1.	STUDIENPOPULATION _____	47
5.1.1.	Kohorte mit chronischer Parodontitis _____	47
5.1.2.	Kohorte ohne Parodontitis _____	48
5.1.3.	Blutentnahme _____	48
5.1.4.	Aufarbeitung der Blutproben _____	48
5.1.5.	Isolierung genomischer DNA _____	49
5.1.5.1.	DNA-Isolierung mit Hilfe des QIAamp® Blood Midi Kit _____	49
5.1.5.2.	DNA-Isolierung nach der Aussalzmethode (MILLER 1988) _____	50
5.1.6.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren _____	50
5.1.7.	Real-Time PCR auf dem LightCycler ® System _____	51
5.1.7.1.	Auswahl der Sonden _____	51
5.1.7.2.	Auswahl der Primer _____	51
5.1.7.3.	Testdurchführung _____	52
5.1.7.4.	Testauswertung _____	53
5.1.8.	Effizienz der PCR _____	54
5.1.8.1.	PCR mittels ThermoCycler _____	54
5.1.8.2.	Agarosegelelektrophorese _____	55
5.1.9.	Reinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung _____	56
5.1.10.	Nachweis der Basenvariationen in den OPN- Polymorphismen _____	56
5.1.10.1.	Nachweis der Basenvariation für OPN A-1748G:rs2728127 _____	56

5.1.10.2.	Nachweis der Basenvariation für OPN T-616G:rs2853744	57
5.1.10.3.	Nachweis der Basenvariation für OPN T-443C:rs11730582	58
5.1.10.4.	Nachweis der Basenvariation für OPN delG-156:rs11439060	58
5.1.10.5.	Nachweis der Basenvariation für OPN T-66G: rs28357094	59
5.1.10.6.	Nachweis der Basenvariationen für OPN T+282C:rs4754	59
5.1.10.7.	Nachweis der Basenvariation für OPN T+750C: rs1126616	60
5.1.10.8.	Nachweis der Basenvariation für OPN A+1083G:rs11226772	60
5.1.10.9.	Nachweis der Basenvariation für OPN A+1239C:rs9138	61
5.2.	STATISTISCHE ANALYSE	61
<b>6.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>62</b>
6.1.	VORBEMERKUNG	62
6.2.	CHARAKTERISTIKA DER STUDIENPOPULATION	62
6.3.	AUSGESCHLOSSENE PROBEN	63
6.4.	POLYMORPHISMEN DES OSTEOPONTINGENS IN DER STUDIENPOPULATION	64
6.4.1.	Der Polymorphismus OPN A-1748G: rs2728127	64
6.4.2.	Der Polymorphismus OPN T-616G: rs2853744	65
6.4.3.	Der Polymorphismus OPN T-443C: rs11730582	66
6.4.4.	Der Polymorphismus OPN delG-156: rs11439060	66
6.4.5.	Der Polymorphismus OPN T-66G: rs28357094	67
6.4.6.	Der Polymorphismus OPN T+282C: rs4754	67
6.4.7.	Der Polymorphismus OPN T+750C: rs1126616	68
6.4.8.	Der Polymorphismus OPN A+1083G: 1126772	68
6.4.9.	Der Polymorphismus OPN A+1239C: rs9138	69
6.5.	KOPPLUNGSGLEICHGEWICHTE	69
6.6.	GESCHLECHTSABHÄNGIGE VERTEILUNG DER POLYMORPHISMEN	69
6.6.1.	OPN A-1748G: rs2728127	69
6.6.2.	OPN T-616G: rs2853744	70
6.6.3.	OPN T- 443C: rs11730582	70
6.6.4.	OPN delG-156: rs11439060	71
6.6.5.	OPN T-66G: rs28357094	72
6.6.6.	OPN T+282C: rs4754	72
6.6.7.	OPN T+750C: rs1126616	73
6.6.8.	OPN A+1083G: rs1126772	74
6.6.9.	OPN A+1239C: rs9138	74
6.7.	RISIKOFAKTOR RAUCHEN	75
6.7.1.	Verteilung in der Studienpopulation	75
6.7.2.	Vergleich des Risikofaktors Rauchen mit den untersuchten Polymorphismen	75
6.7.2.1.	OPN A-1748G: rs2728127	75
6.7.2.2.	OPN T-616G: rs2853744	76
6.7.2.3.	OPN T-443C: rs11730582	76
6.7.2.4.	OPN delG-156: rs11439060	76

6.7.2.5.	OPN T-66G: rs28357094	77
6.7.2.6.	OPN T+282C: 4754	77
6.7.2.7.	OPN T+750C: rs1126616	78
6.7.2.8.	OPN A+1083G: rs1126772	78
6.7.2.9.	OPN A+1239C: rs9138	78
6.8.	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	79
<b>7.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>81</b>
7.1.	STUDIENDESIGN	81
7.2.	AUSWAHL DER STUDIENPOPULATION	83
7.3.	VALIDITÄT DER VERWENDETEN METHODEN	84
7.3.1.	Polymerase-Ketten-Reaktion	85
7.3.2.	Primer und Sonden	87
7.3.3.	Genotypisierung	88
7.4.	VERGLEICH DER FREQUENZEN DER UNTERSUCHTEN POLYMORPHISMEN MIT ANDEREN STUDIEN	89
7.4.1.	OPN A-1748G: rs2728127	89
7.4.2.	OPN T-616G: rs2853744	90
7.4.3.	OPN T-443C: rs11730582	91
7.4.4.	OPN delG-156: rs11439060	91
7.4.5.	OPN T-66G: rs28357094	92
7.4.6.	OPN T+282C: rs4754	93
7.4.7.	OPNT+750C: rs1126616	94
7.4.8.	OPN A+1083G: rs1126772	95
7.4.9.	OPN A+1239C: rs9138	96
7.5.	BEWERTUNG DER ERGEBNISSE AUS FUNKTIONELLER SICHT	97
7.6.	OSTEOPONTIN IM BEZUG AUF DIE CHRONISCHE PARODONTITIS	97
7.7.	STUDIEN UND UNTERSUCHUNGEN ZU OSTEOPONTIN IN BEZUG AUF VERSCHIEDENE KRANKHEITEN	99
7.8.	ASSOZIATIONSSTUDIEN ZWISCHEN POLYMORPHISMEN ANDERER MEDIATOREN UND DER CHRONISCHEN PARODONTITIS	100
7.9.	SCHLUSSFOLGERUNG	102
<b>8.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>103</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>104</b>
	<b>ANHANG</b>	<b>122</b>
1.	DATEN DER PARODONTITISGRUPPE	122
2.	DATEN DER KONTROLLGRUPPE	131

## 1. EINLEITUNG

Entzündliche Erkrankungen des Zahnhalteapparates sind, zusammen mit der Zahnkaries, die am weitesten verbreiteten Erkrankungen der Welt. Nach dem 40. Lebensjahr gehen in der Bundesrepublik Deutschland mehr Zähne durch Parodontalerkrankungen als durch Zahnkaries verloren (*SCHWENZER, EHRENFELD 2000*).

Die chronische Parodontitis stellt eine bakterielle Entzündung des parodontalen Gewebes dar, durch die es zu einem irreversiblen Verlust des Zahnhalteapparates (*Parodontium*) kommen kann. Durch diesen Substanzverlust, den sogenannten Attachmentverlust, wird die Haltefunktion des Parodonts beeinträchtigt, wodurch der Erhalt des betroffenen Zahnes gefährdet und eine Resorption des Alveolarknochens möglich ist (*KORNMAN, 2008*).

Bei der parodontalen Destruktion spielen, neben der mikrobiellen Flora, auch immunologische Mechanismen eine bedeutende Rolle. Zusätzlich wird das individuelle Erkrankungsrisiko durch Umweltfaktoren und genetische Einflüsse modifiziert (*KORNMAN, 2008*). Dabei reagiert jeder Mensch auf vergleichbare pathogenetische Einflüsse unterschiedlich. Dies ist nicht zuletzt auf das individuelle genetische Profil zurückzuführen. *Michalowicz et al. (1991)* wiesen in verschiedenen Zwillingsstudien die Beteiligung genetischer Faktoren an der Entstehung der chronischen Parodontitis nach.

In den letzten Jahren wurden durch verbesserte analytische Methoden, vor allem im molekularbiologischen Bereich, große Fortschritte in der Forschung zur Parodontitis gemacht (*PAGE et al., 1997*). Besonderes Augenmerk wurde dabei auf genetische Assoziationen gelegt, um das individuelle Erkrankungsrisiko der Patienten besser einschätzen zu können (*CRAANDIJK et al., 2002*). Vor allem genetische Polymorphismen von Zytokinen, die an der zellulären Immunantwort beteiligt sind, spielen eine große Rolle.

Die vorliegende Arbeit soll Aufschluss über den Zusammenhang zwischen funktionell wirksamen Polymorphismen des Osteopontingens und der chronischen Parodontitis geben.

## **2. DIE CHRONISCHE PARODONTITIS**

### **2.1. KLASSIFIKATION DER PARODONTALERKRANKUNGEN**

Die aktuelle Einteilung der Parodontalerkrankungen gründet auf den Entscheidungen des „*International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Condition (1999)*“, die die Deutsche Gesellschaft für Parodontologie auch für Deutschland als verbindliche Nomenklatur übernommen hat (*DGP, 2002*).

Innerhalb dieser Klassifikation ist das Auftreten zweier verschiedener Entitäten auffällig. Die erste Entität stellen die Gingivopathien dar. Unter Gingivopathien sind alle Erkrankungen der Gingiva zu verstehen, die entweder Plaque oder nicht Plaque induziert sind. Die zweite Entität wird durch die Parodontopathien gebildet. Darunter fallen alle Erkrankungen, die das Parodontium betreffen und durch Gewebeverlust charakterisiert sind (*MÜLLER, 2001*). Die Parodontitiden werden unterteilt in die chronische Parodontitis und in die aggressive Parodontitis. Weiter unterscheidet man die Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen. Darunter werden hämatologische Erkrankungen wie erworbene Neutropenien und Leukämie verstanden, sowie genetische Erkrankungen, wie das Down-Syndrom und das Leukozyten-Adhäsions-Defizit-Syndrom. Unter nekrotisierenden parodontalen Erkrankungen werden nekrotisierende ulzerierende Formen der Gingivitis und der Parodontitis beschrieben. Dieses Krankheitsbild zeichnet sich durch hochakute, extrem schmerzhaft Entzündungen des marginalen Parodonts, fibrinbedeckte interdentale Nekrosen und spontane Blutungen aus. Allgemeine Symptome sind Abgeschlagenheit, Mundgeruch, Fieber und Schwellung der regionären Lymphknoten (*ERPENSTEIN & DIETRICH, 2004*). Unter Abszessen des Parodonts werden gingivale, parodontale und perikoronale Abszesse zusammengefasst. Die entscheidenden Symptome sind Rötung, Schwellung und die durch die abgeschlossene Eiteransammlung bedingte Fluktuation (*ERPENSTEIN & DIETRICH, 2004*). Unter Paro-Endoläsionen versteht man anatomische oder nicht physiologische Verbindungen zwischen endodontalem und parodontalem Gewebe. Durch diese Verbindungen kann eine Entzündung vom Endodont auf das Parodont oder umgekehrt übergreifen (*BEER et al., 2004*). Der letzte Punkt der Klassifikation beschreibt entwicklungsbedingte oder erworbene Deformitäten und Zustände. Darunter werden Faktoren, die Gingivo- und Parodontopathien modifizieren oder

fördern können verstanden. Dazu zählen die Zahnanatomie, zahnärztliche Restaurationen/Geräte, Wurzelfrakturen, Resorptionen, Rezessionen, verminderte Tiefe des Vestibulum oris, das Fehlen von keratinisierter Gingiva, Gingivaüberschuss, vertikaler/horizontaler Verlust des Alveolarkamms und das okklusale Trauma (MÜLLER, 2001).

I. Gingivopathien	A) Plaque induziert B) nicht Plaque induziert
II. chronische Parodontitis	A) lokalisiert B) generalisiert
III. aggressive Parodontitis	A) lokalisiert B) generalisiert
IV. Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen	A) hämatologische Erkrankungen B) genetische Erkrankungen C) anderweitig nicht spezifiziert
V. nekrotisierende parodontale Erkrankungen	A) nekrotisierende ulzerierende Gingivitis B) nekrotisierende ulzerierende Parodontitis
VI. Abszesse des Parodonts	A) gingivaler Abszess B) parodontaler Abszess C) perikoronaler Abszess
VII. Paro-Endoläsionen	
VIII. entwicklungsbedingte oder erworbene Deformitäten und Zustände	A) lokalisierte, zahnbezogene Faktoren B) mukogingivale Deformitäten und Zustände im Bereich von Zähnen C) mukogingivale Deformitäten und Zustände am zahnlosen Alveolarkamm D) okklusales Trauma

**Tab .2.1.:** Klassifikation der Parodontitiden nach der Einteilung des "International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Condition 1999".

Quelle: MÜLLER, 2001

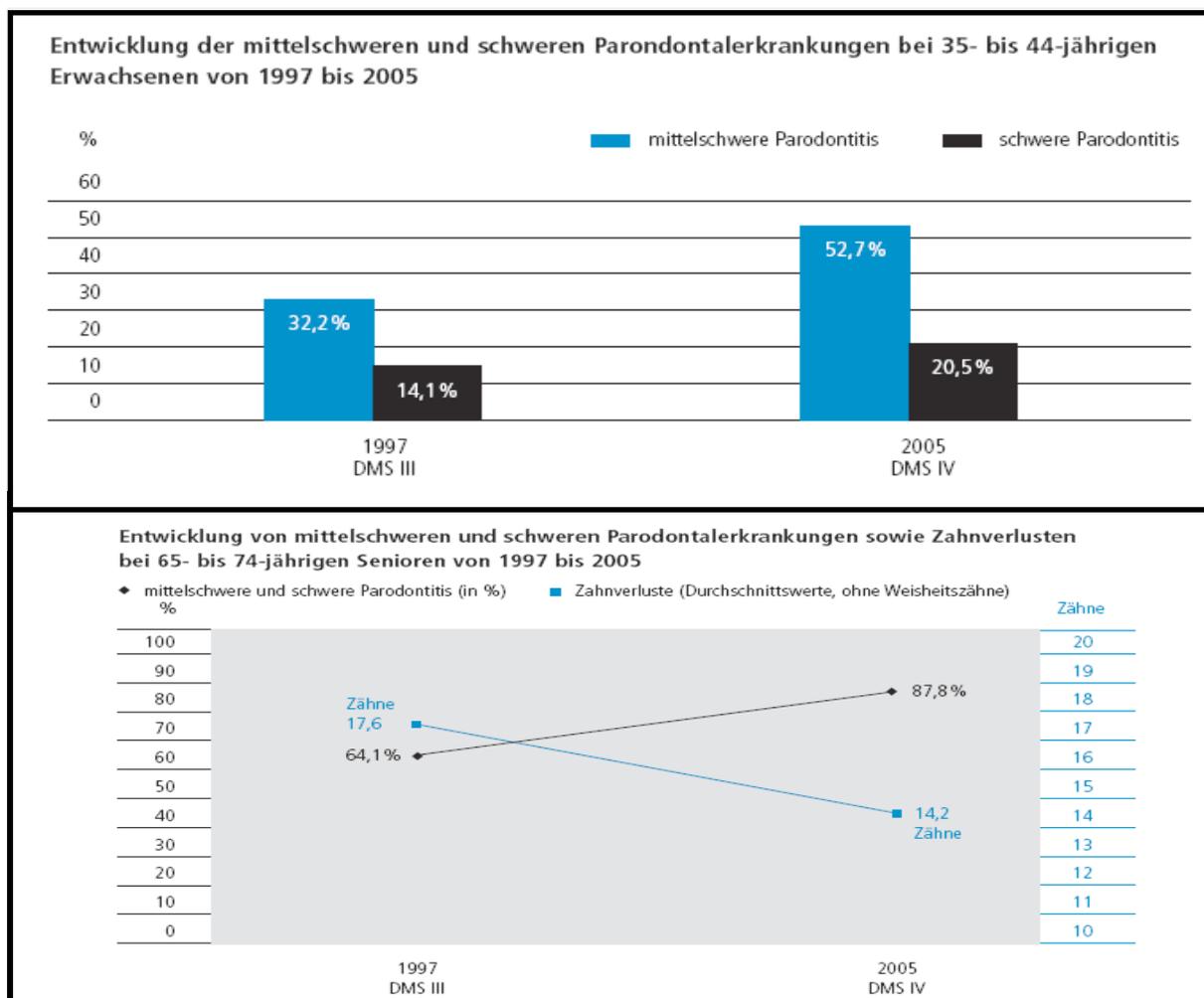
## 2.2. EPIDEMIOLOGIE DER PARODONTITIS

In der Bundesrepublik Deutschland dürfte die „Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie“ (DMS-IV) (Institut der deutschen Zahnärzte, IDZ) von 2006 für das Auftreten und die Entwicklung der Parodontitis als repräsentativ gelten.

Unter den 35- bis 44-jährigen ist die Parodontitis bereits weit verbreitet. 52,7% der Altersgruppe leiden unter einer mittelschweren und 20,5% unter einer schweren Form. Im Vergleich zur dritten deutschen Mundgesundheitsstudie von 1997 zeigt sich eine deutliche Zunahme der Parodontitis um 26,9%.

Innerhalb der Gruppe der Senioren ist die Parodontitis am weitesten verbreitet. 48% sind von einer mittelschweren und 39,8% von einer schweren Ausprägung des Krankheitsbildes betroffen. Das entspricht einer Zunahme von 23,7% in Vergleich zu der Erhebung von 1997. In dieser Gruppe zeigt sich am deutlichsten der Zusammenhang zwischen dem Rückgang der Zahnverluste und der Zunahme der Parodontalerkrankungen.

**Abb. 2.1.:** Entwicklung der Parodontitis von 1997 bis 2005; Vergleich der DMS-III und der DMS



### 2.3. ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE DER CHRONISCHEN PARODONTITIS

Die chronische Parodontitis ist eine entzündliche, primär durch bakterielle Beläge verursachte Erkrankung aller Anteile des Parodonts, d.h. der Gingiva, des Desmodonts, des Wurzelzements und des Alveolarknochens, mit fortschreitendem Verlust an Stützgewebe (*HELLWIG et al., 2003*).

Ätiologisch stellt die chronische Parodontitis ein multifaktorielles Krankheitsbild mit einer Prävalenz von bis zu 30% dar (*MÜLLER, 2001; RATEISCHAK, 2004*).

Die bei einer Parodontitis ablaufenden charakteristischen gewebezerstörenden Immunprozesse sind bis jetzt nur unvollständig verstanden. Es ist eine komplexe Interaktion zwischen der Wirtsantwort und einer Infektion mit parodontopathogenen Bakterien gegeben, die durch genetische und umweltbedingte Faktoren modifiziert werden kann. Dadurch kann die Intensität einer parodontalen Erkrankung von Patient zu Patient variieren (*MUTSCHELKNAUSS 2000*).

Die „*unspezifische Plaquehypothese*“ (*LOESCHE, 1976*) stellt lange die Grundlage zur Entstehung der Parodontitis dar. In diesem Modell führt die Menge an Belägen und Bakterien, als primärer direkter Faktor, zur Parodontitis. Jedes im Sulkus vorkommende Bakterium wäre also durch bestimmte Pathogenitätsfaktoren in der Lage eine Parodontitis auszulösen. Allerdings bleiben in diesem einfachen Konzept einige wichtige Aspekte, wie zum Beispiel die Gewebedestruktion aufgrund bestimmter bakterieller Produkte, die Art der Bakterien und die Immunreaktion unberücksichtigt (*KORNMAN, 2008*).

Bei der „*spezifischen Plaquehypothese*“ werden spezifische gramnegative anaerobe oder mikroaerophile Bakterien als Verursacher der Parodontitis angesehen. Außerdem spielt bei diesem Modell der Aspekt der protektiven und destruktiven Immunantwort aufgrund der Kolonisation der Bakterien für die Krankheitsentstehung bereits eine wichtige Rolle (*PAGE & SCHROEDER, 1976, NISENGARD, 1977; SEYMOUR et al., 1979; PAGE & SCHROEDER, 1981; VAN DYKE, 1985; SEYMOUR, 1987; RANNEY, 1991; KORNMAN, 2008*). Die Gewebe- und Knochendestruktion resultiert vor allem auf aktivierten Gewebemechanismen, wie Matrix-Metallo-Proteinasen, Interleukin-1 und Prostaglandinen. Weiterhin wird die Rolle der neutrophilen Granulozyten in Bezug auf die parodontale Schädigung erkannt (*KORNMAN, 2008*). Zusätzlich besteht das Verständnis, dass einigen klinischen Verläufen der Parodontitis jeweils charakteristische Bakterien und Immunreaktionen des Wirts zugrunde liegen. Der wichtigste Punkt der „*spezifischen*

*Plaqueshypothese*“ beinhaltet die Unterscheidung in mikrobielle Besiedlung und in immunologisch inflammatorische Prozesse in der Pathogenese von parodontalen Erkrankungen (*KORNMAN, 2008*).

Zwischen 1985 und 1995 wird die einfache Beziehung zwischen mikrobieller Besiedlung und resultierender Immunreaktion überdacht. Deutlich wird in verschiedenen Studien, dass bestimmte genetische Varianten, die Entwicklung und die Schwere der Parodontitis beeinflussen (*COREY et al., 1993; MICHALOWICZ et al., 1991; KORNMAN, 2008*). Insbesondere scheinen bestimmte Gene die Immunantwort des Wirt zu verändern (*KORNMAN et al., 1997*). Dadurch wird deutlich, dass die chronische Parodontitis nicht einfach nur eine durch Bakterien ausgelöste Entzündung darstellt (*KORNMAN, 2008*). Risikofaktoren, wie genetische Varianten, aber auch Rauchen, beeinflussen offenbar die Schwere der Erkrankung durch Alteration von protektiven und destruktiven inflammatorischen Mechanismen (*PREBER & BERGSTROM, 1985; PREBER & BERGSTROM, 1986; HABER et al., 1993*). Die Mikroorganismen stellen den primären Auslöser der Parodontitis dar, aber es sind Faktoren vorhanden, die selber zu keiner Parodontitis führen, diese aber stark modifizieren können. Weiter wird dieser Ansatz dadurch unterstützt, dass der Wirt in Abwesenheit von krankheitsmodifizierenden Faktoren in der Lage ist, sich auf die bakterielle Besiedlung mit einer adäquaten Immunantwort vor Mikroorganismen zu schützen (*KORNMAN, 2008*). Dies verdeutlicht auch die *„ökologische Plaqueshypothese“*: In der Mundhöhle besteht ein funktionierendes Ökosystem, wenn zwischen Bakterien und Wirt ein symbiotisches Gleichgewicht besteht (*JOHNSON & CURTIS, 1994; MARSH, 1994; VAN STEENBERGEN et al., 1996*). Modifizierende Faktoren und die bakterielle Besiedlung an Zähnen sind in der Lage, die inflammatorischen Mechanismen über die normalen Grenzen der Immunantwort zu lenken. Zusätzlich kommt es zu einer Beeinträchtigung der Wundheilung. Dadurch wird eine verstärkt destruktive Parodontitis unterhalten (*KORNMAN, 2008*).

Ab 1997 konzentriert man sich vermehrt auf die Rolle der modifizierenden Faktoren, einschließlich der Genetik und deren Auswirkungen auf das Immunsystem. Hierbei zeigt sich, dass eine Reihe von Immunreaktionen und Phänotypen der Parodontitis vorhanden sind, die vor allem durch genetische und umweltbedingte Faktoren, die die inflammatorischen Mechanismen ändern, bestimmt werden (*KORNMAN, 2008*). Jede Kombination aus einer genetischen Alteration und der Beeinflussung von Umweltfaktoren führt zu einer charakteristischen klinischen Ausprägung der Erkrankung (*OFFENBACHER et al., 2007*).

## **2.4. DIE PATHOGENETISCHE ROLLE VON BAKTERIEN**

### **2.4.1. Entwicklung von einer kommensalen zu einer pathogenen Flora**

Der Übergang von der Zahnhartsubstanz zum Weichgewebe des Parodonts, der dentogingivale Übergang, bildet durch seine spezielle Anatomie eine ideale Voraussetzung für die Etablierung einer mikrobiellen Infektion (*BARTOLD et al., 2000*).

Auf gereinigten Zahnoberflächen bildet sich nach wenigen Minuten eine Pellikelschicht, die überwiegend aus Speichelproteinen und Immunglobulinen besteht (*GIBBSON et al., 1991, 1998; HELLWIG et al., 2003*). An dieser Membran haften sich innerhalb kürzester Zeit, über Rezeptorstrukturen und Adhäsine, grampositive Kokken, vor allem Streptokokken und Aktinomyzeten an (*MARSH, 1994; GIBBSON et al., 1998*). Diese Bakterien zählen zur residenten Flora (*DUAN et al., 1994; HSU et al., 1994*). Vermutlich versucht das Immunsystem über die Pellikelschicht die Besiedlung mit kommensalen Bakterien zu fördern (*PAPAPANOU, 2002*).

Durch den primären Ursachenkomplex, basierend auf einer unzureichenden Mundhygiene, kommt es zur Ausbildung von supra- und subgingivalen harten (Zahnstein/Konkrementen) und weichen Belägen (Plaque). Besteht für die Plaque über einen längeren Zeitraum die Möglichkeit einer ungestörten Entwicklung, verändert sich ihrer Zusammensetzung (*MÜLLER, 2001*). Die Bakterienadhäsion innerhalb der Gemeinschaft steigt zwischen zweiten und vierten Tag stark an. Die Flora der Mikroorganismen wird komplexer. Dies führt durch Änderung des Redoxpotentials und durch das Fehlen von Sauerstoff zur Bildung eines anaeroben Milieus in der Tiefe der Plaque, in der sich supplementäre gramnegative anaerobe Bakterienspezies zusammen mit Spirochäten, spindel- und fadenförmigen Bakterien etablieren und vermehren können (*LINDHE, 2002*). Die kommensalen Bakterien dienen den pathogenen Mikroorganismen als eine Verankerung auf der Zahnoberfläche (*FOLWACZNY & HICKEL, 2003*).

Durch Umwandlung einer kommensalen zu einer pathogenen Bakterienflora im subgingivalen Kompartiment des Zahnes (*PAPAPANOU, 2002*), werden immunologische Abwehrmechanismen initiiert, die zunächst zu einer klinischen Manifestation einer Gingivitis führen (*SALVI et al., 2000*). Nach aktuellen pathogenetischen Modellen bildet die Gingivitis eine regelmäßige Vorstufe aller parodontalen Erkrankungen (*BERNIMOULIN, 2003*).

Durch eine bestehende Gingivitis wird die Kolonisierung der Wurzeloberfläche mit fadenförmigen und stäbchenförmigen Bakterien ermöglicht. Beginnend mit dieser Kolonisierung breiten sich die Bakterien in die Tiefe aus. In dieser sehr sauerstoffarmen Umwelt entwickeln sich aggressive Bakterien, die eine Parodontitis initiieren können (ALLAIS, 2007). Die Anzahl der Bakterien nimmt zu und im Zuge der parodontalen Taschenbildung etabliert sich eine subgingivale Plaque (MÜLLER, 2001). Auch die Zusammensetzung der Keimflora ändert sich. Während die Streptokokkenpopulation abnimmt, vermehren sich anaerobe Aktinomyzeten und gramnegative Kokken bzw. Stäbchen. Eine länger andauernde Entzündung führt meist zur Umwandlung des Saumepithels in das so genannte Taschenepithel. Durch eine vermehrte Proliferationsrate im basalen Bereich migriert das Saumepithel progredient nach apikal (MÜLLER, 2001).

#### **2.4.2. Parodontopathogene Bakterien**

Der primär ätiologische Faktor, der zur Ausbildung einer chronischen Parodontitis führt, stellt die pathogene orale mikrobielle Flora dar. Ihr Vorhandensein ist eine obligate Voraussetzung zur Entstehung dieses Krankheitsbildes (PAPAPANOU, 2002).

Bei pathogenen Infektionen lassen sich überwiegend gramnegative anaerobe Keimspezies isolieren (MÜLLER, 2001).

Gramnegative anaerobe Bakterien sind typische supplementäre parodontopathogene Bakterien. Ein sehr hohes krankheitsauslösendes Potential und eine hohe Assoziation mit Parodontalerkrankungen werden *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Tannerella forsythia* zugeordnet (AAP, 1996). In untersuchter subgingivaler Plaque zeigt sich für diese Bakterien eine auffällige Verbindung zu Taschensondierungstiefen und Sondierungsblutung (SOCRANSKY et al., 1998).

*Porphyromonas gingivalis* scheint eine besondere Rolle in der aktiven Abwehr gegen das Immunsystem zu spielen. Das Bakterium kann die Expression biochemischer Rezeptorstrukturen blockieren, die bei der Auslösung der zellulären Immunantwort von Bedeutung sind. Auf diese Weise zeigt die unspezifische Abwehr keine Reaktion auf die Vermehrung der Bakterien und es kommt zu einem ungehemmten Wachstum (ESKAN et al., 2007, DAVEY et al., 2008). Weiterhin ist *P. gingivalis* durch seine Fähigkeit zwischen verschiedenen Immunzellen zu vermitteln, und dadurch Abwehrmechanismen zu umgehen, in der Lage, innerhalb des Gewebes zu

überleben (LI *et al.*, 2008). Außerdem setzt dieser Keim das Enzym  $\alpha$ -Gingipain frei, wodurch komplexe Nährstoffe des Speichels und der Sulkusflüssigkeit gespalten werden. Diese Produkte stehen so auch anderen Bakterienarten zur Verfügung und können für den Energiebedarf genutzt werden. Weiterhin kommt es durch die Produktion dieser Protease zu einem signifikanten Gewebeabbau (ANDRIAN *et al.*, 2004; DIAS *et al.*, 2008). Dadurch können Bakterien das Parodontium leichter kolonisieren (GOULET *et al.*, 2004). Einige Studien zeigen, dass genetische Polymorphismen auf Seiten des Bakteriums, die Virulenz von *P. gingivalis* beeinflussen können (OZMERIÇ *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2006; YOSHINO *et al.*, 2007). In Varianten von *Porphyromonas gingivalis* wurden verschiedene extrazelluläre Arginin-spezifische Proteasen isoliert, die eine unterschiedliche Aggressivität des Bakterienstammes vermitteln (ALLAKER *et al.*, 1997).

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* zeigt klonale Varianten mit unterschiedlicher Virulenz (MACHELEIDT *et al.*, 1999). Aus diesem Bakterium wurde das Toxin *Cytolethal Distending toxin* (CDT) isoliert, welches den Zellzyklus von eukaryonten Zellen und somit auch der Gingiva inhibiert (FABRIS *et al.*, 2002; YAMANO *et al.*, 2003). Zusätzlich bewirkt es besonders eine Migration von Leukozyten und eine Resorption des Alveolarknochens (HENDERSON *et al.*, 2003). Dadurch ist der Gewebeabbau und der Knochenabbau verstärkt, der Heilungsprozess limitiert.

Die sauerstoffarmen Bedingungen, die in der parodontalen Tasche zu finden sind, begünstigen das Wachstum dieser anaeroben oder fakultativ anaeroben, gramnegativen, parodontopathogenen Bakterien und verdrängen die grampositiven Bakterien des gesunden subgingivalen Kompartiments (VAN DER VELDEN *et al.*, 1993; DAHLEN, 1993; XIMENEZ-FYVIE *et al.*, 2000; MÜLLER, 2001). Einige Studien weisen eine lineare Beziehung zwischen der Anzahl gramnegativer anaerober Bakterien und der Schwere der Parodontitis nach (VAN WINKELHOFF *et al.*, 1988; WOLFF *et al.*, 1988; XIMENEZ-FYVIE *et al.*, 2000).

### **2.4.3. Aufbau und Funktion des subgingivalen Biofilms**

Die parodontopathogenen gramnegativen Bakterien organisieren sich zu einem komplexen, äußerst widerstandsfähigen Biofilm.

Biofilme sind räumlich organisierte Komplexe von Mikroorganismen, welche mit der Wurzeloberfläche verbunden und in einer extrazellulären Matrix aus Polysacchariden eingebettet sind (SANDERINK *et al.*, 2004; CATE, 2006). Diese Komplexbildung hält

das biochemische Milieu aufrecht und bietet den Bakterien sowohl Schutz vor antibiotischen Wirkstoffen als auch vor immunologischen Abwehrmechanismen (*KHOURY et al., 1992; CATE, 2006*). Dadurch stellt dieser symbiotische Zusammenschluss die Möglichkeit einer besseren Überlebenschance dar (*ANAISSIE et al., 1995; COSTERTON, 1995; DARVEAU et al., 2000*). Außerdem wird die Pathogenität der Bakterien durch die subgingivale Lage des Biofilms, die ihn für Mundhygienemaßnahmen unzugänglich macht, gesteigert (*MÜLLER, 2001*).

Zusätzlich ermöglicht der Biofilm den Mikroorganismen metabolisch miteinander zu kommunizieren („*quorum sensing*“) (*WHITTAKER et al., 1996*). Dadurch kommt es zu einer Aktivierung und Steigerung der Zellteilung und des Zellwachstums (*CATE, 2006*).

## **2.5. DIE ROLLE DES IMMUNSYSTEMS BEI DER PARODONTITIS**

### **2.5.1. Phase der akuten bakteriellen Besiedlung**

Die intakte Barriere des oralen Sulkusepithels, des oralen Epithels und des Saumepithels stellt einen natürlichen Schutz des parodontalen Gewebes gegen eine Invasion von Bakterien, ihren Produkten und Komponenten dar (*HELLWIG, et al., 2003*). Außerdem spielt das Epithel eine wichtige Rolle innerhalb der intraepithelialen Rekrutierung von Phagozyten und Lymphozyten und kontrolliert auf diese Weise die Penetration der Bakterien durch das mukosale Integument (*SVANBORG et al., 1994; KORNMAN et al., 2000*)

Findet eine Penetration der äußeren Epithelbarrieren durch Bakterien, eine mikrobielle Kolonisierung des Parodonts und eine Vermehrung der Mikroorganismen statt, wird eine Immunreaktion im Bindegewebe induziert (*WARELL et al., 2004*). Immunzellen, vor allem neutrophile Granulozyten, treten aus dem Bindegewebe in den gingivalen Sulkus. Auf diese Weise besitzt das Saumepithel die Fähigkeit, Qualität und Quantität der Bakterienflora zu analysieren und diese zu bekämpfen (*GOLUB et al., 1981; CIMASONI, 1983; TONETTI et al., 1995; ZADEH et al., 2000*).

Die parodontopathogenen Mikroorganismen setzen eine große Menge an Metaboliten frei, die sich durch das Saumepithel hindurch in das Bindegewebe verbreiten (*GRENIER et al., 1991*). Dazu zählen Säuren, wie Butyrat und Propionat, die toxisch auf das Gewebe wirken (*KURITA-OCHIAL et al., 1997; KORNMAN et al., 2000*), Peptide, wie N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (FMLP), das chemoattraktiv auf Leukozyten wirkt, und Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien (*LOPPNOW et al., 1989*). Durch diese und weitere bakterielle

Komponenten kommt es zur Aktivierung der Saumepithelzellen. Diese produzieren und setzen daraufhin inflammatorische Mediatoren, in erster Linie Zytokine, Amine und Plasmaproteasen frei. Dazu gehören Histamin perivaskulärer Mastzellen, Prostaglandine, wie Prostaglandin E<sub>2</sub>, Interleukine, wie Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) und Interleukin-8 (IL-8), Interferon-1 $\beta$ , Matrix-Metalloproteinasen (MMP) gewebeständiger Makrophagen, Fibroblasten oder Keratinozyten und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (MEIKLE *et al.*, 1994; KORNMAN, 2000), sowie weitere Chemokine und Differenzierungsfaktoren (ECKAMN *et al.*, 1995; HEDGES *et al.*, 1994). Diese durchwandern das Saumepithel und gelangen in das umliegende Gewebe (ABE *et al.* 1991, KORNMAN *et al.*, 2000).

### **2.5.2. Phase der akuten Immunantwort**

Durch die Aktivierung der Endothelzellen durch Zytokine und inflammatorische Mediatoren kommt es zu einer Inflammation der Gefäße der Mikrozirkulation des Parodonts (BEVILACQUA *et al.*, 1985; KORNMAN *et al.*, 2000). Diese verlangsamt die Fließgeschwindigkeit und erhöht die Blutmenge in den Gefäßen. Die daraufhin resultierende Weitung der Endothelfenestrierung führt zu einer gesteigerten vaskulären Permeabilität. Dadurch tritt Plasma aus und akkumuliert in der extrazellulären Matrix des Bindegewebes (KINANE *et al.*, 1992; HEASMAN *et al.* 1993; KORNMAN *et al.*, 2000). Durch die Freisetzung und den Anstieg von Plasma im Gewebe werden das Komplement- und das Plasminsystem aktiviert. Außerdem bewirken die im Plasma enthaltenen Akut-Phase-Proteine, die auch in der Sulkusflüssigkeit enthalten sind, eine Amplifizierung der Immunreaktion und eine weitere Endothelzell-Aktivierung (KINANE *et al.*, 1991; ADONOGIANAKI *et al.*, 1994; KORNMAN *et al.*, 2000).

Die Diffusion von inflammatorischen Mediatoren durch das subepitheliale Bindegewebe führt zur Expressierung von spezifischen Oberflächenrezeptoren an den Endothelzellen. Diese sogenannten Selektine reagieren in einem zweistufigen Prozess mit speziellen Zellmembranrezeptoren, den Integrinen, der im Blutstrom befindlichen Leukozyten (GEMMELL *et al.*, 1994). Zunächst kommt es zu einer Reaktion des E-Selektins aus der Endothelzellmembran mit dem Lewis-Antigen, einem Molekül, das auf der Oberfläche aller Blutzellen zu finden ist. Dadurch heften sich Leukozyten, vor allem neutrophilen Granulozyten, an die Gefäßwand (DARVEAU *et al.*, 1995). Durch die Expression von ELAM-1 (endothelial-leucocyte-adhesion-molecule-1) wird die Konzentration des Integrins ICAM-1 (intercellular-

attachment-molecule-1) auf der Oberfläche der vaskulären endothelialen Zellen erhöht. Dieses bindet an den Integrin-Rezeptor LFA-1, einem Adhäsion, auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten (*GENCO, 1992*). Dies veranlasst eine Extravasation von Leukozyten, vor allem neutrophilen Granulozyten, aus den Gefäßen entlang eines chemoattraktiven Gradienten durch das Bindegewebe und das Saumepithel in Richtung gingivalen Sulkus mittels Integrin-Rezeptor-Vermittlung (LFA-1, Mac-1) (*SODEK et al., 2006*). Dort bilden sie eine Barriere zwischen mikrobieller Plaque und parodontalem Gewebe, um durch spezifische und unspezifische Phagozytose die Bakterien abzutöten und eine apikale und laterale Ausbreitung der Beläge zu verhindern.

Die Diapedese der Leukozyten ist durch verschiedene Typen von Adhäsionsmolekülen reguliert, die von Endothelzellen und Leukozyten selbst exprimiert werden (*OSBORN, 1990, ZIMMERMANN et al., 1992; KORNMAN et al., 2000*). Die Spezifität dieser Moleküle bestimmt welcher Zellsubtyp ins Gewebe migriert. Dadurch stellt der Leukozyteneintritt ins Gewebe einen streng regulierten Prozess dar, der für eine primäre bakterielle Abwehr sorgt und eine unnötige Gewebeschädigung vermeidet (*PAGE et al. 1987; HEMMERLE & FRANK, 1991; KORNMAN et al., 2000*).

Die Migration der Leukozyten Richtung gingivalen Sulkus wird von zwei Mechanismen reguliert: Durch Expression von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen, wie das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1, und die Freisetzung einer niedrig molekularen Zytokinfamilie, der Chemokine, und des neutrophil-selektiven Interleukin-8 (IL-8), wird die Wanderung gesteuert (*MUKAIDA et al., 1992; NAGATA et al., 1992; BICKEL, 1993; KORNMAN et al., 2000*). Diese stellen Schlüsselpunkte in der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in parodontalen Infektionen dar (*CRAWFORD, 1992; MOUGHAL et al., 1992; TONETTI et al., 1994; KORNMAN et al., 2000*). Abhängig von der IL-8 Konzentration kommt es zur Stimulation der Zellmigration oder zur Aktivierung von antibakteriellen Prozessen der Leukozyten (*BAGGIOLINI et al., 1989; KORNMAN et al., 2000*). Die Migrationsrichtung der Leukozyten wird durch einen Konzentrationsgradienten der beteiligten Chemokine, beziehungsweise Oberflächenrezeptoren, vorgegeben. So nehmen sowohl die Konzentration des IL-8, wie auch die von ICAM-1, von der Oberfläche des Saumepithels zu den basalen Zellschichten hin ab (*GENCO 1992*). Die neutrophilen Granulozyten wandern also Richtung zunehmender Konzentration der Mediatoren der Epithelzellen. Neben IL-8 und den Integrinrezeptoren gibt es zahlreiche

zusätzlich chemotaktisch wirksame Verbindungen, wie die Komplementfaktoren C3a und C5a, NCF (neutrophil-chemotactic-factor) der Makrophagen und die Leukotriene B<sub>4</sub>, die ebenfalls durch einen intraepithelialen Konzentrationsgradienten die Wanderung der Leukozyten unterstützen. Man spricht von „*Chemotaxis*“.

Auffällig ist außerdem eine selektive Anreicherung verschiedener Phänotypen von Leukozyten, nach der Diapedese, in spezifisch topographischen Lokalisationen (TONETTI *et al.*, 1995). Polymorphkernige Granulozyten (PMNS) stellen die Mehrheit der Abwehrzellen im gingivalen Sulkus dar. Mononukleäre Zellen, wie Makrophagen, befinden sich überwiegend im perivaskulären Bindegewebe und bilden das entzündliche Infiltrat. Diese Zellen sind in der Lage durch PRRs („*pattern recognition receptors*“) PAMPs („*pathogen molecular patterns*“) der Bakterien zu erkennen. Durch Phagozytoseprozesse kann als pathogen erkanntes Material zerstört werden (MALE, 2004). Hierfür tragen Makrophagen und neutrophile Granulozyten Rezeptoren, die Bakterien aufgrund von Oberflächenmolekülen erkennen können (GORDON, 2002). Binden bakterielle Moleküle an diese Strukturen, findet die Phagozytose statt. Durch Lysosomen, die verschiedene Enzyme und antibakterielle Substanzen enthalten, werden die bakteriellen Substanzen abgetötet und verdaut. Oxidierende Enzymsysteme zerstören die bakterielle Zelle durch Bereitstellung von radikalen Verbindungen, wie das Superoxidanion oder Hydroxylradikale, die hauptsächlich aus dem NADP-Oxydase-System stammen (DENNISON *et al.* 2000). Zu den nicht-oxidierenden Enzymsystemen gehören das Lysozym, Calprotectin und Kathepsin G. Diese greifen die Bakterienzellwand direkt an und sorgen durch die Störung der morphologischen Integrität der Zelle für deren Untergang (MIYASAKI *et al.* 1993).

Die Aufnahme wird durch Opcionierung, Markierung der pathogenen Mikroorganismen mit Antikörpern und Komplementteilchen, erleichtert (MALE, 2004). Auf diese Weise werden die Pathogene durch Komplementfragmente, wie C3b oder C4b oder auch durch Immunglobuline der Klasse IgG markiert. Die Wirkung dieser Oponine beruht auf der Expression von Zelloberflächenrezeptoren auf Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten. Die Komplementfragmente binden an die Komplementrezeptoren CR1-5 aus der  $\beta$ -Integrin-Familie (DENNISON *et al.*, 2000). Auf diese Weise erhalten lokale Zellen am Infektionsort Unterstützung zur Beseitigung und Phagozytose der Bakterien.

Die unspezifische oder auch angeborene Immunität ermöglicht dem Körper eine schnellgreifende, allerdings nicht-antigenspezifische Abwehr (WARELL *et al.*, 2004).

Für den weiteren Verlauf der Erkrankung ist die Effektivität der ersten Phase der Immunantwort entscheidend. Gelingt es, die Bakterien abzuwehren und eine Invasion und Vermehrung zu verhindern, bleibt das Entzündungsgeschehen auf die marginale Gingiva begrenzt. Man bezeichnet dies als Gingivitis (*KORNMAN et al., 2000*). Es ist kein irreversibler Verlust des Parodonts zu beobachten. Nach erfolgreicher Elimination der Mikroorganismen und Abheilung der Entzündung kann es zur *restitutio ad integrum* kommen. Kann die Entzündung allerdings nicht gestoppt werden, kommt es zunehmend zu einer Aktivierung der immunologischen Prozesse der zweiten Phase der Immunantwort. Diese können zu einem Abbau des Parodonts führen.

### **2.5.3. Immunologische Phase**

Die wichtigsten und vielseitigsten Vertreter der zweiten Phase der immunologischen Abwehr stellen Makrophagen dar. Diese unterstützen die neutrophilen Granulozyten infiltrierte Pathogene zu phagozytieren (*GRBIC et al. 1995; EBERSOLE et al., 1993*) und beseitigen apoptotische Granulozyten (*SODEK et al., 2006*). Dadurch entsteht eine effektivere, verstärkte Entzündungsreaktion (*SODEK et al., 2006*). Außerdem steuern Makrophagen die wesentlichen spezifischen Vorgänge der Immunreaktion, die vor allem durch Lymphozyten und Plasmazellen zustande kommen (*KORNMAN et al., 2000*). Diese Zellen sind in der Lage, die akut inflammatorischen Mechanismen durch Sezernierung von Zytokinen zu erhöhen oder die immunologische Phase zu initiieren. Dadurch stellen Makrophagen wichtige Effektorzellen sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Immunantwort dar.

Neben den Zytokinen, wie beispielsweise den TLR4-Rezeptor, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  und PGE<sub>2</sub>, schütten Makrophagen, nach der CD14-Rezeptor-vermittelten Aktivierung, weitere gewebeabbauende Enzyme aus, insbesondere hydrolytische Enzyme und Matrix-Metalloproteinasen (*TEMELSEN et al. 1993; VAN HEECKEREN et al. 1993; REYNOLDS et al. 2000*). Dies führt schließlich zu einem massiven Abbau kollagener Strukturen und der extrazellulären Matrix des parodontalen Gewebes. Somit kommt es erstmals zur irreversiblen Zerstörung des Zahnhalteapparats.

Dabei werden bestimmte Oberflächenrezeptoren auf Antigen-präsentierenden-Zellen (APC) ausgebildet, die die Antigen-spezifische Immunantwort durch Präsentation von bakteriellen Pathogenen beeinflusst. Diese Zellen überprüfen ständig den Antigenstatus des Extrazellularraums. Nehmen diese einer Infektion über ihre PRRs

wahr, wird die Mikropinozytose eingestellt und die PRR-Molekül-Synthese minimiert. Es führt zu einer Konservierung der bakteriellen Antigenstruktur im Inneren phagozytierenden Zellen. Diese wandern durch Lymphgefäße zu den Lymphknoten. Auf ihrem Weg kommt es zur Antigen-Prozessierung über MHC-II auf ihrer Oberfläche (MALE, 2004). Die nun differenzierten APC, wie Makrophagen und dendritische Zellen, nehmen in den T-Zell-Zonen Kontakt mit naiven CD4-Zellen auf und präsentieren diesen das Antigen. Es erfolgt die Antigenerkennung durch T-Zell-Rezeptoren. Dadurch werden die T-Zellen aktiviert und es kommt zur Teilung und Klonierung in CD4<sup>+</sup>-Zellen und CD8<sup>+</sup>-Zellen (HASLETT *et al.*, 1994; SODEK *et al.*, 2006).

CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, sogenannte T-Helferzellen, erkennen Antigenpeptide im Komplex mit MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Oberfläche von Makrophagen und Monozyten. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen reagieren auf Antigenpeptide im Komplex mit MHC-Klasse-I-Molekülen (MALE, 2004). Die Aktivierung der T-Zellen erfolgt nach der Bindung des Antigen/MHC-Komplexes an den T-Zellrezeptor mit Hilfe des CD-3-Molekülkomplexes. Zur vollständigen Aktivierung sind weitere kostimulierende Signale notwendig (ISHIKAWA *et al.* 2000).

Die Unterteilung der CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen in die Untergruppen Th1 und Th2, basiert auf der jeweiligen Zytokin-Produktion. Th1-Zellen produzieren IL-2 und IFN- $\gamma$  und spielen eine Rolle bei der zellvermittelten Immunantwort. Sie erhöhen die Fähigkeit der Makrophagen, intra- und extrazelluläre Pathogene zu eliminieren (MOSMAN *et al.* 1996). Th2-Zellen sezernieren IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10. Außerdem sind diese an der Bereitstellung von IgG, IgE und IgA durch B-Lymphozyten beteiligt und spielen somit eine wichtige in der Vermittlung der Immunantwort des adaptiven Immunsystems (PALIARD *et al.* 1988; HAANEN *et al.* 1991). Die Differenzierung von B-Lymphozyten zu Antikörper produzierenden Plasmazellen wird angeregt, sowie eine entzündliche Makrophagenaktivierung unterdrückt. Die von den Plasmazellen freigesetzten Immunglobuline schützen den Wirt unter anderem durch Hemmung der bakteriellen Adhärenz, Inaktivierung der bakteriellen Toxine und Opsionierung der Antigene (Offenbacher *et al.* 1994). Zusätzlich ist eine dritte Gruppe der T-Helferzellen identifiziert, die IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 und IL-5 produziert (FIRESTEIN *et al.* 1989; STREET *et al.* 1990). Auch die CD8<sup>+</sup>-Zellen können in zwei Gruppen unterteilt werden: Die zytotoxischen Zellen, die IL-10 und IFN- $\gamma$  produzieren und die T-Suppressorzellen, die hauptsächlich IL-4 freisetzen (SALGAME *et al.* 1991). Die Freisetzung von Interleukin-4 (IL-4) aus T-Zellen veranlasst die Proliferation und

Differenzierung von Antikörper produzierenden B-Zellen (*SOZEK et al., 2006*). Zusätzlich stimuliert eine steigende Sekretion von TGF-1 $\beta$  aus Fibroblasten die vermehrte Proliferation von T- und B-Zellen. Dies führt zu einer größeren Zahl von Lymphozyten, T-Zellen und B-Zellen im Gewebeeinfiltrat, die durch die Anwesenheit von Antigenen und Zytokinen proliferieren. B-Lymphozyten ermöglichen die Bereitstellung von spezifisch wirkenden Antikörpern und sezernieren IL-1, das ein kostimulierendes Signal für Th2-Zellen darstellt.

Die Dominanz von Th1- oder Th2-Zellen und das damit jeweils vorherrschende Zytokinprofil scheint für den Verlauf der parodontalen Erkrankung, insbesondere für die Progression und die Gewebeerstörung, entscheidend zu sein (*GEMMELL et al. 2000*). Auch das ungünstige Verhältnis zwischen immunantwortvermittelnden Effektor-T-Zellen, die durch die intensive Ausschüttung von Zytokinen gewebsdestruierend wirken, und der Mangel an Suppressorzellen, die die zellvermittelte Immunantwort unterdrücken, könnte relevant für die Pathogenese der Parodontitis sein (*KORNMAN et al., 2000*). Bei Patienten, die an einer Parodontitis leiden, finden sich mehr CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten als CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (*NAGASAWA et al. 1995*).

Eine steigende Zahl an Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen sorgt für eine Reduktion der Kollagensynthese innerhalb des Fibroblasten-Metabolismus und für die Aktivierung der lokalen und systemischen Immunantwort mit Produktion von Antikörpern gegen hoch immunogene Bakterienepitope (*POLAK et al., 1995; KORNMAN et al., 2000*). Somit sind sie an der Destruktion des parodontalen Gewebes beteiligt (*GEMMELL et al. 2000*).

#### **2.5.4. Gewebe- und Knochendestruktion**

Die Charakteristika des jetzt erreichten Stadiums der Parodontitis sind fortschreitender Attachmentverlust und Knochenabbau (*JANSON, 2006*). Die klinische Manifestation einer Gewebedestruktion zeigt sich in der Vertiefung des gingivalen Sulkus und der Entstehung einer parodontalen Tasche (*LINDHE et al., 2002*). In dieser bieten sich den anaeroben parodontopathogenen Bakterien bessere Überlebensvoraussetzungen. Sie sind besser vor Sauerstoffzutritt geschützt und, durch die gesteigerte Sekretion von Sulkusflüssigkeit, bietet sich ein besseres Nährstoffangebot (*LINDHE et al., 2002*). Durch diese Möglichkeit kann es zu einem verstärkten bakteriellen Angriff und Exazerbation des Entzündungsgeschehens kommen.

Die Abwehrlage des menschlichen Körpers spielt bei der Entstehung einer chronischen Parodontitis eine entscheidende Rolle (MARSH, 1994; VAN STEENBERGEN et al., 1996; LOESCHE, 1999; VAN DYKE et al., 2005; IRWIN et al., 2007). Die zelluläre und humorale Immunantwort scheint bei den meisten Individuen die Fähigkeit zu besitzen, die Mikroorganismen zu limitieren (KORNMAN et al., 2000). Hier besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen auf- und abbauenden Mechanismen des Gewebe- und Knochenmetabolismus, die durch eine Reihe von Enzymen, Aktivatoren, Inhibitoren und regulatorischen Mediatoren, wie Zytokinen und Wachstumsfaktoren, gesteuert werden (REYNOLDS et al., 2000). Ist das Immunsystem nicht in der Lage die bakterielle Infektion zu kontrollieren, kommt es zu steigenden Stützgewebeverlust und Knochenabbau (KORNMAN et al., 1997). Hierbei verschiebt sich das Gleichgewicht zu Gunsten der abbauenden Faktoren.

Parodontopathogenen Mikroorganismen können die Destruktion auf verschiedenen Wegen einleiten. Durch die Sezernierung von proteolytischen Enzymen durch Bakterien selbst, kann das Gewebe direkt angegriffen werden. Zum anderen können bakterielle Produkte, wie Toxine, LPS oder Enzyme, residente und eingewanderte Zellpopulationen zur Expression gewebeabbauender Enzyme stimulieren. Weiterhin können mikrobielle Zellfragmente eine Immunantwort auslösen, die zur Ausschüttung von Zytokinen aus Lymphozyten und Makrophagen führt und schließlich in der Aktivierung degenerativer Abbauewege endet (BIRKEDAL-HANSEN et al. 1993). Spezifische Bakterien in Biofilmen sind in der Lage, die Funktion von neutrophilen Granulozyten durch die Produktion von Säuren und Polyaminen, die toxisch wirken, und durch die Inhibition von E-Selectin zu stören (TSAI et al., 1981; NAKAO et al., 1992; DARVEAU et al., 1995, WALTERS et al., 1995; KORNMAN et al., 2000). Des Weiteren kann die T-Zell- und B-Zell-Reaktion von bestimmten Bakterien so gesteuert werden, dass weniger effektive Antikörper produziert werden. So ist eine bakteriell freigesetzte Protease fähig, die Fc-Region von IgG-Immunglobulin zu spalten oder die C3-Komponente des Komplementsystems zu erniedrigen, wodurch es zur Interferenz der Phagozytose und der Abtötung der Mikroorganismen kommt (SUNDQVIST et al., 1984; GREGORY et al., 1992; SCHENKEIN et al., 1995; KORNMAN et al., 2000). Durch diese Virulenzfaktoren der Bakterien sind Schlüsselkomponenten der Immunantwort behindert.

Zusätzlich kommt es durch die Makrophagenaktivierung zur Sezernierung von Zytokinen, die neben der Steuerung und Regulierung von Plasmazellen und

Lymphozyten, einen Knochen- und Bindegewebsverlust verursachen. Dies führt zu einem irreversiblen Verlust des Parodontiums.

Zytokine destruieren besonders bei Überschuss oder ungenügender Kontrolle das erkrankte Gewebe (*JAESCHKE & SMITH, 1997; HEINZELMANN et al., 1999; SODEK et al., 2006*). Vor allem die Freisetzung von Interleukin1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6), Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Prostaglandin E2 (PGE2) führt zu einem Abbau von Gewebe. IL1- $\beta$  steigert die Kollagenase-Produktion des parodontalen Ligaments und der gingivalen Fibroblasten, senkt die Kollagensynthese und fördert Fibroblasten-Zell-assoziierte Produkte, die für die Knochenresorption verantwortlich sind (*KORNMAN et al., 2000*).

Freigesetzte Produkte von Makrophagen verändern zusätzlich den Kollagenmetabolismus der lokalen Fibroblasten (*KORNMAN et al., 2000*). Das Ausmaß der Aktivierung der Makrophagen korreliert mit dem Ausmaß des Angriffs von parodontopathogenen Bakterien (*LINDHE et al., 2002*). Daraus resultiert eine verstärkte Gewebedestruktion mit zunehmender Anwesenheit von Bakterien und bakteriellen Produkten.

Bei den gewebeabbauenden Prozessen spielen vor allem die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) eine Schlüsselrolle. Diese werden von Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Keratinozyten und anderen Gewebszellen als Prometalloproteinasen gebildet. Zur Aktivierung zu Matrix-Metalloproteinasen bindet Plasminogenaktivator an seinen Rezeptor an der Zelloberfläche (*TEMELSEN et al. 1993; VAN HEECKEREN et al. 1993*). Zusätzlich können einige der durch die Makrophagen ausgeschütteten Zytokine, insbesondere IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , eine autokrine Verstärkung der Sekretion der Matrix-Metalloproteinasen herbeiführen (*REYNOLDS et al. 2000*). MMPs sind in der Lage, direkt die kollagenen Strukturen des Zahnhalteapparats abzubauen. Begleitend wird durch die freigesetzten Zytokine die Neusynthese von Kollagen durch Fibroblasten gehemmt (*DUFOR et al. 1993*). In Fibroblasten von Patienten mit Parodontitis ist eine große Menge an Matrix-Metalloproteinasen nachgewiesen worden (*GAPSKI et al., 2004; JENKINS et al., 2004*). Auch gibt es Hinweise, dass sie durch einen Promotorpolymorphismus verursacht werden können (*HOLLA et al., 2004; ITAGAKI et al., 2004*). Innerhalb des chronisch entzündlichen Stadiums der Parodontitis zeigen sich eine deutliche Abnahme der Zahl der Fibroblasten und ein Verlust der Kollagensynthese (*PAGE & SCHROEDER, 1976; SCHROEDER et al., 1973, 1975, 1990; KORNMAN et al., 2000*). Die Kollagen-Balance ist eine Funktion der Matrix-Metalloproteinase-Aktivität

und der Kollagensynthese. Beide werden durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Prostaglandine reguliert (MEIKLE *et al.*, 1994; KORNMAN *et al.*, 2000).

Vor allem Prostaglandin E<sub>2</sub> ist für die Destruktion des Alveolarknochens verantwortlich (OFFENBACHER, 1996). Prostaglandin E<sub>2</sub> wird von aktivierten Makrophagen direkt sezerniert oder von mesenchymalen Zellen und Osteoklasten, die im Rahmen der Immunreaktion über freigesetzte Zytokine zur Ausschüttung stimuliert werden (SCHWARTZ *et al.*, 2000). So zeigen Patienten mit Parodontitiden sowohl erhöhte Spiegel von PGE<sub>2</sub>, als auch von TNF- $\alpha$  und IL-1 im parodontalen Gewebe und in der Sulkusflüssigkeit (OFFENBACHER *et al.* 1981; CZUSZAK *et al.* 1996).

## **2.6. EINFLUSS DES UMWELTFAKTORS RAUCHEN AUF DIE PARODONTITIS**

Raucher leiden häufiger an Parodontalerkrankungen als Nichtraucher (SAXER *et al.*, 2007). Rauchen wird als der wichtigste vermeidbare einzelne Risikofaktor in der Progression und Entwicklung parodontaler Erkrankungen angesehen (HELLWIG *et al.*, 2003). Bezüglich der chronischen Parodontitis ist heute allgemein bestätigt, dass Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern folgende Charakteristika aufweisen: Höhere parodontale Sondierungswerte, eine größere Anzahl von Stellen mit Sondierungstiefen von mehr als 3mm (BERGSTROM *et al.* 2000, SAXER *et al.*, 2007), mehr Attachmentverlust, mehr gingivale Rezessionen (HAFFAJEE & SOCRANSKY, 2001), mehr Alveolarknochenverlust (BERGSTROM *et al.*, 2000), mehr Zahnverluste (SAXER *et al.*, 2007), weniger Anzeichen von Gingivitis, weniger Bluten auf Sondierung (DIETRICH *et al.*, 2004;HAFFAJEE & SOCRANSKY, 2001) und mehr furkationsbefallene Zähne (KERDVONGBUNDIT & WIKESJO, 2000). Das typische klinische Bild der Parodontitis eines Rauchers zeigt eine relativ blasse marginale Gingiva mit reduzierten Entzündungszeichen, sowie das Vorhandensein von parodontalen Sondierungstiefen mit mehr als 4mm gehäuft an interproximalen Stellen, die aber eine geringe Blutungsneigung auf parodontales Sondieren zeigen, das durch die suppressive Wirkung des Rauchens auf immunologische Mechanismen begründet ist (SAXER *et al.*, 2007).

Die biologische Plausibilität für eine Assoziation zwischen Rauchen und parodontalen Erkrankungen zeigen die Auswirkungen von Substanzen, wie Nikotin und Kohlenstoffmonoxid (LINDHE, 2002). Insgesamt agieren diese Substanzen als Vasokonstriktoren, wodurch eine Ischämie des Gewebes, eine eingeschränkte vaskuläre Immunantwort und behinderte zelluläre Reparaturmechanismen entstehen.

Zusätzlich scheinen diese eine direkte Auswirkung auf Makrophagen und Fibroblasten zu besitzen. Dadurch kommt es zu einer verzögerten Wundheilung (LINDHE, 2002). Nikotin wird an der Wurzeloberfläche gespeichert und ist im Serum, Speichel und im Sulkusfluid bei Rauchern erhöht (CHEN *et al.*, 2001; JARVIS *et al.*, 2003). Fibroblasten der Mundhöhle sind daher kontinuierlich Nikotin exponiert. Dies reduziert die Adhäsionsfähigkeit von Fibroblasten auf Dentinoberflächen (WALTER *et al.*, 2007). Fibroblasten aus gesundem gingivalen Gewebe weisen nach Kontakt mit Nikotin eine niedrigere Migrationsrate auf als unbehandelte Kontrollzellen (FANG & SVOBODA, 2005). Weiterhin wurde eine nikotininduzierte Vakuolenbildung, ein Zeichen degenerativer Vorgänge, in Fibroblasten und die gesteigerte Sezernierung von Kollagenasen beobachtet (WALTER *et al.*, 2007). Darüber hinaus inhibitiert Nikotin dosisabhängig die DNA- und Proteinsynthese von Fibroblasten (CHANG, 2002).

Nikotin beeinträchtigt außerdem die erste Linie der Infektabwehr. Dadurch wird die Chemotaxis und Phagozytose neutrophiler Granulozyten vermindert, es kommt zur eingeschränkten Antikörperbildung, die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wird stimuliert und obligat anaerobe Parodontopathogene wie *T. forsythia* und *P. gingivalis* nehmen zu (WALTER *et al.*, 2007).

Es gibt Hinweise, dass das subgingivale Milieu bei Rauchern verändert ist und damit möglicherweise günstigere Wachstumsbedingungen für verschiedene Pathogene vorliegen könnten. Der Sauerstoffdruck in den Parodontaltaschen von Rauchern ist signifikant niedriger als bei Nichtrauchern (HANIOKA *et al.*, 2000). Dies würde eine Selektion zugunsten von Anaerobiern begünstigen. Darüber hinaus kolonisieren potenzielle Pathogene, wie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* oder *Porphyromonas gingivalis*, besser auf durch Nikotin veränderten epithelialen Zellen (TEUGHELIS *et al.*, 2005).

Durch das Rauchen einer Zigarette werden freie Radikale, so genannte *Reactive Oxygene Species* (ROS), chemische Verbindungen mit ungepaarten Elektronen, durch den Wirtsorganismus freigesetzt. Beispielweise die Hydroxyd- ( $\text{HO}^-$ ) und Peroxylradikale ( $\text{HOO}^-$ ) sind, indem sie die Wirts-DNA zerstören, Lipidperoxidation der Zellmembran verursachen, endotheliale Zellen schädigen und das Wachstum der glatten Gefäßmuskulatur (VSMC) induzieren, für zahlreiche Gewebeveränderungen verantwortlich (TSAI *et al.*, 2005). ROS aktivieren darüber hinaus die Bildung von proinflammatorischen, für die Pathogenese parodontaler Erkrankungen bedeutsamer Mediatoren, wie IL-6, TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  (ZHANG *et al.*, 2002). Diese *oxygene*

*Species* werden durch Exogene, wie z. B. die Vitamine C oder E, und Endogene, wie z. B. die Enzyme Gluthationperoxydase und Superoxiddismutase und Antioxidantien (AOs), neutralisiert. Unter physiologischen Bedingungen herrscht im menschlichen Organismus ein Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Mechanismen (YOUNG, 2001). Dauernd erhöhte Nikotinausscheidung im Sulkusfluid führt allerdings zu einer ständigen Reduktion des antioxidativen Potenzials, wodurch eine Aktivitätssteigerung der ROS veranlasst wird und somit die Gewebeschädigung steigt.

Es besteht auch eine Wechselwirkung zwischen Rauchen und genetischen Faktoren. Bei Rauchern mit einem Interleukin-1 $\beta$ -Polymorphismus können deutlich größere Attachmentverluste und Sondierungstiefen als bei Nichtrauchern festgestellt werden (MCGUIRE & NUNN, 1999).

Epidemiologische Daten unterstützen die Bedeutung des Tabakkonsums als einen Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer Parodontitis. Das relative Risiko von Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern an einer Parodontitis zu erkranken, liegt zwischen 2,5 und 6. Mehr als 50% der Parodontitiden innerhalb der Altersklassen bis 45 Jahre gehen zu Lasten von Zigarettenkonsum (BERGSTROM *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2001; MÜLLER, 2001; LINDHE, 2002; RATEISCHAK, 2004; SAXER *et al.*, 2007). Parodontalbehandlungen führen zwar auch bei Rauchern zu einer Verminderung der Taschentiefe, allerdings liegen die Attachmentgewinne 25–60% unter denen der Nichtraucher. Die Parodontitisprävalenz könnte bei vollständiger Raucherentwöhnung um 30-60% reduziert werden, die Progressionsrate würde abnehmen und es würde zu einer verbesserten Wundheilung kommen (BERGSTROM *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2001; MÜLLER, 2001; LINDHE, 2002; RATEISCHAK, 2004; SAXER *et al.*, 2007).

## **2.7. GENETISCHE BASIS DER CHRONISCHEN PARODONTITIS**

Genetische Veränderungen stellen eine bedeutende Determinante für unterschiedliche Risiken in vielen humanen Krankheitsbildern, einschließlich der Parodontitis, dar (FRIEDRICH, 2000; COLLINS & MCKUSICK, 2001; KHOURY & MCCABE, 2003; KINANE *et al.*, 2005).

Während parodontopathogene Mikroorganismen und andere Umweltfaktoren die Parodontitis initiieren und modulieren, sind unterschiedliche Reaktionen der Betroffenen auf diese umweltbedingten Herausforderungen bekannt (KINANE *et al.*,

2005). Diese Unterschiede sind im individuellen genetischen Profil der Patienten mit Parodontitis begründet.

Gene spielen eine bedeutende Rolle für die Prädisposition und Progression von parodontalen Erkrankungen (SOFAER, 1990; MICHALOWICZ *et al.* 1991; MICHALOWICZ, 1994; HART, 1994; HASSELL & HARRIS, 1995; HART, 1996; MICHALOWICZ *et al.* 1999; HODGE & MICHALOWICZ, 2001; KINANE *et al.*, 2005; WALTER *et al.*, 2007). Genetische Alterationen können sowohl die Transkriptionsstärke eines Proteins und somit seine Menge verändern, als auch seine Nukleotidsequenz. Dadurch kann ein identisches Protein oder eine Isoform produziert werden. Dies kann zu vielen funktionalen Konsequenzen der Proteinfunktion führen (KINANE *et al.*, 2005). Die resultierenden Unterschiede der physiologischen Funktionen des veränderten Proteins können durch bestimmte Umweltfaktoren, wie z. B. Rauchen und die Art der bakteriellen Besiedlung, gesteigert werden. Ist das Protein in biologische Mechanismen, wie der Immunantwort, involviert, kann dies zu einer Änderung von immunologischen Prozessen führen und die Gewebedestruktion der Parodontitis fördern (KORNMAN *et al.*, 1998).

Somit sind genetische Alterationen in der Lage, das persönliche Risiko für einen parodontalen Phänotypen zu beeinflussen. Dies hängt von der Summe der Protein beeinflussten Prozesse ab, die zur Entwicklung der Parodontitis beitragen (KINANE *et al.*, 2003; KINANE *et al.* 2005).

### **2.7.1. Die chronische Parodontitis als komplexe genetische Erkrankung**

Die chronische Parodontitis wird als genetisch-komplexe Erkrankung bezeichnet (KINANE *et al.*, 2005), die keiner einfachen familiären Verteilung oder Transmission folgt. Vielmehr stellt diese das Ergebnis aus einer Interaktion von Allelen an vielen verschiedenen Genloci dar (KINANE *et al.*, 2005).

Die gängige Hypothese, nach dem „*multigene-environment interaction model of disease susceptibility to periodontitis*“ beschreibt, dass hierbei mehrere Gene additiv und unabhängig voneinander, sowie Umweltfaktoren zusammenwirken (FRASER *et al.*, 2003). Dieses Modell wird als komplexe Vererbung bezeichnet und beschreibt, dass genetische Faktoren, wie Gen-Gen-Interaktionen, das Risiko an einer Parodontitis zu erkranken, erhöhen. Es besteht somit ein additiver Effekt jedes einzelnen Gens, aber keine dominante oder rezessive Wirkung eines Gens gegenüber einem anderen. Jedes Gen liefert einen Beitrag zur

Merkmalsausprägung. Das entsprechende Merkmal kann bei zu kleiner Gendosis phänotypisch nicht sichtbar sein und bei weiterer Addition, abhängig von der steigenden Gendosis, in unterschiedlichen Schweregraden vorkommen. Das Merkmal tritt also erst bei der Überschreitung einer gewissen Schwelle in Erscheinung. Dies ist durch den Einfluss von Umweltfaktoren möglich. Man bezeichnet dies auch als additive Polygenie mit Schwellenwerteffekt oder als multifaktorielles genetisches System (*FRASER et al., 2003*). Zusätzlich kann die Genexpression in verschiedenen Geweben variieren und die Veränderung dieser Gene kann zu gewebespezifischen Bedingungen führen (*KINANE et al., 2005*).

Nahezu die Hälfte der Unterschiede innerhalb der chronischen Parodontitis ist auf genetische Veränderungen zurückzuführen, womit die Erbllichkeit, die bei der chronischen Parodontitis bei 50% liegt, rein biologisch begründet scheint (*MICHALOWICZ et al., 2000; KINANE et al., 2005*). Dadurch stehen bei der chronischen Parodontitis die komplizierten Interaktionen zwischen individuellem genetischen Risiko, Biofilm, der Immunantwort des Wirts und die folgende Alteration innerhalb der Kochen- und Bindegewebshomöostase im Vordergrund (*TATAKIS & KUMAR, 2005; OFFENBACHER et al., 2007; TAUBMAN et al., 2007; KORNMAN, 2008*).

### **2.7.2. Genetische Polymorphismen**

Die „*Common Disease/Common Variant hypothesis*“ besagt, dass die meisten Risiken für komplexe Erkrankungen, einschließlich der Parodontitis, auf Polymorphismen zurückzuführen sind (*REICH & LANDER, 2001*) und diese für die Krankheitsveranlagung die Grundlage bilden (*STONEKING, 2001; CHAKRAVARTI, 2001; WEINER & HUDSON, 2002*).

Polymorphismen treten in einer Population mit einer Mindestfrequenz von 1% auf und können grundsätzlich auch bei einem einzigen Individuum vorhanden sein. Allerdings sind krankheitsassoziierte Polymorphismen innerhalb der Bevölkerung weit verbreitet und zeigen eine Allelfrequenz von mehr als 20%-50% (*EICHNER et al., 2002*). Von Bedeutung ist, dass es keine eins-zu-eins Korrelation eines spezifischen Allels und dem Auftreten einer komplexen Erkrankung gibt, sondern vielmehr sind spezifische Allelfrequenzen häufiger bei erkrankten Personen, als bei gesunden zu finden (*KINANE et al., 2005*). Darüber hinaus erlauben Polymorphismen einen Einblick in die molekularen Abläufe einer Krankheit. Wenn bestimmte Varianten immer zusammen mit einer Störung beobachtet werden, liegt

der Schluss nahe, dass dieser Polymorphismus an der Krankheitsentstehung beteiligte Gene beeinflusst (KINANE, 2003).

Im Zentrum der genetischen Epidemiologie stehen die „*Single Nucleotide Polymorphisms*“, kurz *SNPs*. Hierbei handelt es sich um zufällig über das menschliche Genom verteilte Veränderungen von DNA-Bausteinen (*Nukleotiden*). Sie können an beliebigen Positionen innerhalb und außerhalb von Genen liegen und dem entsprechend sehr unterschiedliche Aufgaben besitzen (CALLADINE, 2006). Im menschlichen Genom sind bereits ca. 2-3 Millionen *SNPs* kartiert. Ob ein Polymorphismus zu einem Krankheitsphänotyp führt, hängt von der genetischen Veränderung und ihrem Einfluss auf die Genfunktion und dessen Proteinprodukt ab (KINANE et al., 2005).

Es handelt sich bei einem *SNP* um den häufigsten Typ (90%) genetischer Variation. Dieser wird stabil vererbt, tritt aber nicht gleichverteilt, sondern ungleichmäßig an bestimmten Regionen auf (STONEK, 2006). *SNPs* kommen in drei möglichen Genotypen vor. In einer von zwei möglichen homozygoten Formen, Wildtyp oder Mutation (Allel 1/Allel 1; oder Allel 2/Allel 2), oder aber in einer heterozygoten Mischform (Allel 1/Allel 2) (ARTAKAN & BÄHRING, 2007). Damit ist eine weitere Ebene der Modulation der phänotypischen Ausprägung möglich. Viele *SNPs* verhalten sich rezessiv, d.h. sie sind im heterozygoten Zustand neutral. Zum anderen bilden sie mit benachbarten *SNPs* so genannte Haplotypen. Für die Entstehung dieser Haplotypen ist das Kopplungsgleichgewicht verantwortlich (STONEK, 2006)

Einige genetische Polymorphismen stehen in engem Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der Parodontitis. Von großem Interesse sind genetische Alterationen, die die Immunantwort auf eine vorhandene mikrobielle Besiedlung beeinflussen. So ziehen vor allem proinflammatorische Zytokine, die die Wirtsantwort bei der Parodontitis lenken, Aufmerksamkeit auf sich (KINANE et al., 2005). Änderungen in Genen von Zytokinen sind mit der Empfänglichkeit, Schwere und Auftreten der Parodontitis assoziiert (HAVEMOSE-POULSEN et al., 2007). So zeigen IL-1 Genotypen mit dem Zytokin-Level von Parodontitis-Patienten eine Verbindung und ein Polymorphismus des IL-6 Gens zeigt einen möglich protektiven Charakter, der mit einer geringeren Empfänglichkeit für die chronische Parodontitis assoziiert ist (HOLLA et al., 2004). Ein Polymorphismus des IL-10 Gens zeigt eine Assoziation mit der chronisch generalisierten Parodontitis (SUMER et al., 2007). IL-10 ist in der Lage, die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen zu inhibieren und die Stimulation von Antikörpern zu veranlassen. Auch sind positive Assoziationen mit der

chronischen Parodontitis und TNF- $\alpha$  (SOGA *et al.*, 2003) und Fc- $\gamma$  auf Immunzellen gefunden worden (KOBAYASHI *et al.*, 1997, 2000, 2001; SUGITA *et al.*, 2001; KINANE *et al.*, 2005).

Aufgrund des technologischen Fortschrittes werden SNPs, die im Zusammenhang mit der Parodontitis stehen, immer häufiger in Assoziationsstudien betrachtet, um die genetische Suszeptibilität, also das individuelle Erkrankungsrisiko, aufgrund der genetischen Konstitution einer Person zu untersuchen. Dadurch versucht man ein besseres Verständnis der Pathogenese, Ätiologie und der Zusammenhänge der Parodontitis beeinflussenden Faktoren zu erlangen und dies möglicherweise für die Diagnostik oder Therapieplanung nutzbar zu machen (KINANE, *et al.*, 2005; KORNMAN *et al.*, 2000).

### **2.7.3. Methoden der genetischen Analyse bei der chronischen Parodontitis**

#### **2.7.3.1. Direkte Assoziationsstudien**

Mit Assoziationsstudien ist man in der Lage, Gene, die für ein Parodontiserkrankungsrisiko verantwortlich sind, zu lokalisieren und sogar schwächere Effekte von Genen zu detektieren (HODGE, 1994; KINANE *et al.*, 2005). Die populationsbasierte Assoziationsstudie nutzt ein *case-control-design*, bei welchem Marker-Allel-Frequenzen zwischen Parodontitispatienten und gesunden Individuen verglichen werden. Durch den Vergleich der Häufigkeiten bestimmter Markerallele lassen sich die relativen Erkrankungsrisiken abschätzen, die von diesen genetischen Einflussfaktoren ausgehen (KINANE *et al.*, 2005).

Grundsätzlich kann jede Art genetischer Marker für Assoziationsstudien eingesetzt werden. Allerdings sollte deren Mutationsrate möglichst gering und die Dichte der ausgewählten Marker möglichst hoch sein (HODGE, 1993). Idealerweise sollten die für Assoziationsstudien verwendeten Marker direkt aus dem Inneren von Genen stammen, die biologisch plausible Kandidaten für einen ätiologischen Zusammenhang mit der in Frage stehenden Erkrankung darstellen (HIRSCHHORN *et al.*, 2002). Die Wahrscheinlichkeit für den Nachweis einer Assoziation ließe sich dann noch weiter erhöhen, wenn die zu untersuchenden Markerallele selbst funktionell signifikant wären, indem sie z.B. das Proteinprodukt oder regulatorische Elemente eines Gens verändern (HODGE, 1993; 1994; HIRSCHHORN *et al.*, 2002). Dessen ungeachtet werden aber immer wieder Bedenken geäußert, dass genetische Unterschiede zwischen ethnischen, sozialen oder geographischen Schichten in der zu untersuchenden Population zu einer Verfälschung der Risikoschätzungen führen

könnten (*ENDO et al., 2001*). Wenn zum Beispiel Patienten und Kontrollpersonen systematisch aus unterschiedlichen Schichten rekrutiert würden, könnte dies zu genetischen Unterschieden zwischen den Stichproben führen, die dann aber nicht mit der Krankheit im Zusammenhang stünden, sondern mit der unterschiedlichen Grundpopulation (*HODGE, 1993; HIRSCHHORN et al., 2002*). Einer möglichen Verfälschung von Schätzungen relativer Risiken in genetischen Fall-Kontroll-Studien kann dadurch vorgebeugt werden, dass bei der Auswahl der Studienpopulation sorgfältig auf eine Vergleichbarkeit hinsichtlich der ethnischen, sozialen und geographischen Herkunft der Patienten geachtet wird (*ENDO et al., 2001; KINANE et al., 2005*). Zudem kann das Ausmaß an verbleibender Schichtung in einer konkreten Studie dadurch ermittelt werden, dass eine hinreichend große Anzahl zusätzlicher Markergene analysiert wird, die nicht selbst Teil der eigentlichen Assoziationsstudie sind (*KINANE et al., 2005*).

Bei einer positiven Assoziation eines Polymorphismus mit der Parodontitis sind mehrere Möglichkeiten der Interpretation möglich: Die Assoziation stellt ein Artefakt dar, die Assoziation besteht aufgrund der Populationsschichtung, das assoziierte Allel ist selbst für die Erkrankung verantwortlich oder es steht im Kopplungsgleichgewicht mit dem für die Parodontitis verantwortlichen Genlocus (*KINANE et al., 2005*).

### **2.7.3.2. Kopplungsgleichgewicht**

Das Kopplungsgleichgewicht bezeichnet die gemeinsame Vererbung von Allelen zweier Gene oder Genloci (*STONEKING, 2001*).

Auf biochemischer Ebene bemisst sich der Abstand zwischen zwei Genen durch die Anzahl der zwischen ihnen liegenden Nukleotide. Abstände von 1 Million Nukleotide gelten bei der Genkartierung als Untergrenze des Auflösungsvermögens, das mit familienbasierten Kopplungsanalysen erreichbar ist (*KINANE et al., 2005*).

Eine präzisere Lokalisation von Krankheitsgenen lässt sich nur durch populationsbasierte Assoziationsstudien erreichen, bei denen das Vorliegen eines sogenannten Kopplungsungleichgewichts (*linkage disequilibrium*, LD) zwischen Genen ausgenutzt wird (*ELSTON 1998*). Die gebräuchlichste Definition von LD besagt, dass sich zwei gekoppelte Genloci dann im Kopplungsungleichgewicht befinden, wenn einige ihrer Allele in den Keimzellen, die die Mitglieder einer bestimmten Population produzieren, überzufällig häufig gemeinsam auftreten (*KINANE et al., 2005*).

Wenn ein neues Allel zum ersten Mal in einer Population auftritt, entweder durch Mutation oder durch Zuwanderung, so geschieht dies im Allgemeinen in Form einer einzelnen Kopie. Diese Kopie ist auf dem sie tragenden Chromosom, zusammen mit den Allelen anderer Genloci, in einen bestimmten genetischen Hintergrund eingebettet (*STONEK, 2006*). In folgenden Generationen erhöht sich die Häufigkeit des Allels in der Population (z.B. durch Selektion), und es kommt wiederholt zu meiotischer Rekombination mit Chromosomen, die einen anderen genetischen Hintergrund aufweisen (*STONEK, 2006*). Dadurch verschwindet das ursprünglich starke LD, und der Verlust vollzieht sich umso langsamer, je enger die fraglichen Genloci gekoppelt sind, d.h. je seltener es zu meiotischer Rekombination zwischen ihnen kommt (*STONEKING, 2001*). Unter bestimmten Annahmen über die Mutationsrate der Gene sowie, das Wanderungs- und Paarungsverhalten der Population, gibt ein starkes LD einen Hinweis auf enge Kopplung. Diese Allele werden gemeinsam vererbt. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass ein mit der Parodontitis assoziiertes Allel allein nicht, aber zusammen mit dem im Kopplungsgleichgewicht befindlichen Genlocus für die Erkrankung verantwortlich ist.

### **3. OSTEOPONTIN**

#### **3.1. PHYSIOLOGISCHE EINORDNUNG**

Osteopontin ist ein phosphoryliertes Glykoprotein, das von einer großen Bandbreite an Zellen und Geweben produziert wird (*SODEK et al., 2000, 2002, 2006*). Es wird als Knochen-Matrix-Protein, T-Lymphozyten-Aktivierungs-Protein (Eta-1) (*PATARCA et al., 1993; SODEK et al., 2006*) und als ein Zell-Transformations-assoziiertes Protein (*CRAIG et al., 1988; SODEK et al., 2006*) charakterisiert. OPN stellt ein Matrix-zelluläres Protein mit sehr unterschiedlichen biologischen Aktivitäten dar, die durch viele Zell-Oberflächen-Rezeptoren vermittelt werden (*GIACHELLI & SEITZ, 2000; SODEK et al., 2006*). Basierend auf der Genstruktur und der chromosomalen Lage, zählt Osteopontin zu einem Mitglied der SIBLING-Protein-Familie (*small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein*), die strukturelle und funktionale Eigenschaften teilen (*FISHER & FEDARKO, 2003; SODEK et al., 2006*). Zu dieser Familie zählen unter anderem das Knochen Sialoprotein (BSP), das Dentin-Matrix-Protein 1(DMP1), das Dentin Sialophosphoprotein (DSPP), das Enamelum (ENAM)- und Matrix-extrazelluläre Phosphoglykoprotein.

Das Osteopontin Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 4 (4q21-q25) des Menschen. OPN wird als ~34 kDa schweres Protein synthetisiert, bevor es posttranslational durch Phosphorylierung, Glykosylierung und Sulfatisierung modifiziert wird und als langes, unstrukturiertes und 44-75 kDa schweres Protein freigesetzt wird (*SODEK et al., 2000, 2006*). Das ausgeschüttete Protein weist eine Heterogenität auf, die sich in den posttranslatorischen Modifikationen widerspiegelt. Dies führt zu unterschiedlichen funktionalen Aktivitäten des Proteins, die mit der Mineralisierung (*NAGATA et al., 1989; SODEK et al., 2000, 2006*), der Zellanheftung und der Zellsignalisierung assoziiert sind (*ASHKAR et al., 2000; ZHU et al., 2001; SUZUKI et al., 2002; WEBER et al., 2002; CHELLAIAH et al., 2003; SODEK et al., 2006*).

#### **3.2. MOLEKÜLSTRUKTUR**

Um die Bandbreite der biologischen Aktivitäten von OPN zu verstehen, bedarf es einer Beurteilung seiner Struktur und seiner funktionalen Motive.

### **3.2.1. Spaltung durch Thrombin**

Das Osteopontin-Molekül besitzt eine konservierte Stelle für seine Spaltung durch Thrombin (*DENHARDT et al., 2001*), wodurch Molekülfragmente mit unterschiedlichen biologischen Aktivitäten gebildet werden. Durch die Spaltung von OPN entstehen alternierende Bindungsseiten innerhalb des Moleküls und kryptische Bindungsstellen werden aufgedeckt (*DENHARDT et al., 2001*).

Jedoch können die funktionalen Aktivitäten von Osteopontin, die die Mineralbindung, die Oberflächenrezeptoren CD44 und die Integrin-Rezeptoren miteinbeziehen, in erster Linie den strukturalen Motiven des OPN-Moleküls zugerechnet werden (*SODEK et al., 2006*).

### **3.2.2. Bindungsmotive von OPN**

Die Funktionen von Osteopontin werden durch verschiedene Rezeptoren vermittelt. OPN interagiert in erster Linie mit Integrinen und dem Oberflächenrezeptor CD44 (*SODEK et al., 2006*). Beide Arten zählen zu den Adhäsionsmolekülen. Integrine sind in der Lage, an bestimmte Target-Sequenzen des OPN-Moleküls, wie die RGD und die SLVVGLR-Sequenz zu binden.

#### **3.2.2.1. Integrine**

Durch Integrin-Bindung kann OPN Zell-Matrix Interaktionen, aber auch verschiedene Zellaktivitäten, wie Zellproliferation, Zellüberleben, Zellbewegung und die Phagozytose-Eigenschaften modulieren. Diese haben Einfluss auf das Verhalten von Makrophagen im Entzündungsgeschehen und auf die Aktivität von Fibroblasten (*SODEK et al., 2006*).

Integrine stellen Adhäsionsmoleküle dar, die aus einer  $\alpha$ -Kette und einer  $\beta$ -Kette bestehen. Beide besitzen einen transmembranen Anteil. Die  $\alpha$ -Kette ist normalerweise für jedes Molekül spezifisch, während die  $\beta$ -Kette gemeinsam von verschiedenen Molekülen benutzt wird. Integrine haben meist mehr als eine Liganden-Bindungsstelle und können unterschiedliche Moleküle erkennen. Sie binden bestimmte Target-Sequenzen. Die Integrine sind bei jeder Zelle mit dem Zytoskelett verbunden. Über diese Bindung können Entzündungszellen über die Endothelschicht aus dem Gefäßlumen in das Gewebe übertreten (*MALE. 2004*).

#### **3.2.2.2. Die RGD-Sequenz**

Die zentral lokalisierte RGD-Sequenz (= Arg-Gly-Asp) innerhalb des OPN-Moleküls interagiert mit  $\alpha\beta3$  Integrinen, die häufig auf Makrophagen und Osteoklasten zu finden sind. Das  $\alpha\beta3$  Integrin ist gewissermaßen das „Namenschild“ für diese

beiden Zellarten. Durch diese Bindung wird die Aktivierung von Endothelzellen gefördert, vermehrt Interleukin-12 in Makrophagen synthetisiert, und OPN, als ein Zeichen für Osteoklasten-Anheftung und –Signalisierung (*CHELLAIAH et al., 2003; SODEK et al., 2006*) und für die Migration von Makrophagen (*ZHU et al., 2004; SODEK et al., 2006*) und Osteoklasten (*SUZUKI et al., 2002; SODEK et al., 2006*), phosphoryliert (*ASHKAR et al., 2000; WEBER et al., 2002; SODEK et al., 2006*). Die Phosphorylierung des OPN des Menschen ereignet sich, abseits der RGD-Region und abseits der Region zur Glykosylierung, auf der 3-5 Seite (*CHRISTENSEN et al., 2005; SODEK et al., 2006*). OPN-Rezeptor-Interaktionen sind sowohl RGD abhängig, als auch unabhängig möglich. Beide Arten können durch Thrombin-Spaltung von Osteopontin moduliert werden (*DENHART et al., 2001*). Aktivierte Thrombozyten binden via  $\alpha\beta 3$  in gleichem Ausmaß an die RGD-Sequenz eines gespaltenen OPN-Moleküls oder an eines mit voller Länge.

### **3.2.2.3. Die SLVVGLR-Sequenz**

Es sind weitere Bereiche innerhalb des Osteopontin-Proteins vorhanden, die ebenfalls für die Funktion von OPN eine Rolle spielen. Die SLVVGLR- Sequenz (= Ser-Leu-Val-Val-Gly-Leu-Arg) grenzt räumlich im Proteinmolekül an die RGD-Sequenz an. Auch diese Sequenz ist funktionell wirksam, da sie an zwei weitere Integrine,  $\alpha 4\beta 1$  und  $\alpha 9\beta 1$ , bindet. Diese beiden Integrine sind „Namensschilder“ für Leukozyten und Lymphozyten (*BAYLESS et al., 1998; SODEK et al., 2006*). Durch Spaltung das OPN- Moleküls durch Thrombin wird die SLVVGLR- Sequenz freigelegt (*SODEK et al., 2006*).

### **3.2.2.4. Die kryptische Bindungsstelle**

Eine weitere, im intakten OPN verdeckte kryptische Bindungsstelle, kann über  $\alpha\beta 3$  die Adhäsion von B-Lymphozyten veranlassen. Aktivierte B-Lymphozyten heften sich effektiver an durch Thrombin gespaltenes Osteopontin, als an ein OPN- Molekül voller Länge (*DENHARDT et al., 2001*).

### **3.2.2.5. Der CD44-Rezeptor**

CD44, ein Zelloberflächen Glykoprotein, dient als Adhäsionsmolekül für Zell-Substrat-, oder Zell-Zell-Interaktionen. Die Konzentration dieses Rezeptors ist in akuten und chronischen Entzündungen deutlich erhöht (*DENHARDT et al., 2001*). Die am häufigsten exprimierte Standardform dieses transmembranen Proteins ist CD44. CD44 ist als ein Oberflächenrezeptor für OPN identifiziert worden (*SODEK et al., 2006*). Es ist ein weit verbreitetes Molekül, das unter anderem auf Leukozyten

vorkommt und wahrscheinlich bei der Matrixadhäsion für die transendotheliale Migration eine Rolle spielt (MALE, 2004). Auch scheint die Bindung von OPN und CD44, die chemotaktischen (WEBER et al., 1996; SODEK et al., 2006) und die sekretorischen Eigenschaften von Makrophagen zu beeinflussen (ASHKAR et al., 2000; SODEK et al., 2006). Dadurch kann sowohl die Phagozytose eingeleitet, wie auch Reaktionen der adaptiven Immunität induziert werden.

CD44-Bindungsstellen innerhalb des OPN-Moleküls werden an der amino-terminalen Peptidsequenz (FISHER & FEDARKO, 2003; SODEK et al., 2006), einer kryptischen Stelle in der Nähe der Thrombinspaltungsstelle (LIN & YANG-Yen, 2001; SODEK et al., 2006), und an einer unidentifizierten Region in der C-terminalen Hälfte des Proteins gefunden (WEBER et al., 2002; SODEK et al., 2006). Das amino-terminale Peptid zeigt starke chemotaktische Aktivität für Makrophagen, die durch CD44-Antikörper und Antikörper für den Amino-Terminus von OPN geblockt werden können (BATISTA-DA-SILVA., 2005; SODEK et al., 2006). Jedoch ist die Interaktion von CD44 und Osteopontin nicht direkt (SMITH & GIACHELLI, 1998). Für variable Formen von CD44 ist eine RGD-unabhängige Vermittlung durch das Integrin-β1 nötig (KATAGIRI et al., 1999).

Die Bindung von CD44 und dem Integrin-β3 an separate Domänen des OPN-Proteins, sorgt für die Anziehung von Makrophagen und stimuliert die Expression von Zytokinen und die Metalloproteinase-Produktion (WEBER, 2002; SODEK et al., 2006).

Zusätzlich kann Osteopontin durch die Interaktion von CD44 und αβ3 den Komplementfaktor H auf Zelloberflächen binden und rekrutieren (FEDARKO et al., 2000; SODEK et al., 2006). Dadurch wird zusätzlich das Komplementsystem aktiviert.

### **3.2.3. Formen von OPN**

Es sind verschiedene freie Formen von OPN bekannt. Eine davon stellt die intrazelluläre Form des Proteins (OPNi) dar, die eine Koexistenz mit CD44 auf migrierenden Fibroblasten, Makrophagen und Osteoklasten aufweist (ZOHAR et al., 2000; SUZUKI et al., 2002; ZHU et al., 2004; SODEK et al., 2006). Während OPN in der Immunphase, als typisches Zeichen eines sezernierten Proteins, eine perinukleäre Verteilung aufweist, ist es bei Zellprozessen mit CD44 auf der Zellmembran als OPNi angesiedelt. Diese Form moduliert Zytoskelett verbundene Funktionen, wie Zellbewegung und Zellüberleben (ZOHAR et al., 2004; SODEK

2006) und vermittelt die IFN $\alpha$ - Expression in dendritischen Zellen (*SHINOHARA et al., 2006; SODEK et al., 2006*).

### **3.3. OPN FUNKTIONEN BEI ENTZÜNDUNGEN UND DER IMMUNANTWORT**

Das Protein Osteopontin wird mit vielen verschiedenen Erkrankungen, wie multipler Sklerose (*CAILLIER et al., 2003; NIINO et al., 2003; HENSJEK et al., 2003*), autoimmuner Encephalomyelitis (*CHABAS et al., 2001*), rheumatischer Arthritis (*YAMAMOTO et al., 2003*), Arteriosklerose (*TAYLOR et al., 2005*), Hepatitis (*MOCHIDA et al., 2004; NAITO et al., 2005*), Leberzirrhose (*KIKUTCHI et al., 2003*), Lupus erythematosus (*D`ALFONSO et al., 2005; FORTON et al., 2002*), Urolithiasis (*YAMATE et al., 2000*), Tuberkulose (*NAU et al., 1999; O`REGAN et al., 1999*) und ALPS, autoimmunes lymphoproliferierendes Syndrom (*CHIOCCHETTI et al., 2004*), in Verbindung gebracht.

Die Expression von Osteopontin wird bei entzündlichen Erkrankungen gesteigert und für die Entstehung der zellulären Immunantwort benötigt (*ASHKAR et al., 2000; O`REGAN, 2003; SODEK et al., 2006*). Diese Expression ist nicht auf eine spezifische Zelllinie während einer Entzündung limitiert, sondern involviert eine Vielzahl an Zellen. Sowohl Immunzellen, wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen, T- und B-Zellen, als auch Endothel-, Epithelzellen und Fibroblasten, setzen innerhalb inflammatorischer Prozesse Osteopontin frei (*ASHKAR et al, 2000; O`REGAN & BERMAN, 2000; SODEK et al. 2006*). Somit besitzt OPN eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Immunantwort, in der Gewebeerstörung, sowie im anschließenden Heilungsprozess (*DENHARDT et al., 1995; MIYAZAKI et al., 1995; MCKNEE & NANCI, 1996; ROLLO & DENHARDT, 1996; ROLLO et al., 1996; GIACHELLI et al., 1998; ZOHAR et al., 2000; O`REGAN et al., 2001; IDE et al., 2003; ZHU et al., 2004; OGAWA et al., 2005; SODEK et al., 2006*). Dadurch steht das Protein Osteopontin in einem komplexen Zusammenspiel von lokalen Zellen und Immunzellen und bildet den Schlüssel der zellvermittelten Immunantwort (*SODEK et al., 2006*). Zusätzlich wird OPN für die Interaktion und Kooperation von Makrophagen und Lymphozyten benötigt, um den Übergang von angeborener in die adaptive Immunantwort mit anschließendem Heilungsprozess zu fördern (*SODEK et al., 2006*).

Die Expression scheint bei jeder Entzündung gesteigert und ist mit einer erhöhten Zellmobilisation und vermehrter Zellaktivität verbunden (*SODEK et al., 2006*) und wird in erhöhten Konzentrationen in Körperflüssigkeiten und Plasma reflektiert,

wodurch es einen wichtigen diagnostischen und prognostischen Nutzen für entzündliche Erkrankungen besitzt (*GASSLER et al., 2002; OHSHIMA et al., 2002; KOGUCHI et al., 2003; TAMURA et al., 2003; VOGT et al., 2003; SODEK et al., 2006*).

### **3.3.1. Auswirkungen von OPN auf Makrophagen**

Osteopontin wirkt proinflammatorisch auf die Makrophagenrekrutierung und Differenzierung.

Die Freisetzung von OPN durch Makrophagen während einer Entzündung ist stark erhöht. Dies wird vor allem durch LPS-Stimulation verstärkt (*GAO et al., 2004; SODEK et al., 2006*). Das von Makrophagen produzierte Osteopontin fungiert scheinbar als ein Opsonin, wodurch sowohl die Phagozytose (*MCKNEE & NANCI, 1996; SODEK et al., 2006*), als auch die Zelladhäsion durch die RGD-Bindung erleichtert wird. Ohne Osteopontin ist die Formation von Zellprozessen, verbunden mit der Makrophagenmigration und ihrer Chemotaxis, beeinträchtigt. Diese Beeinträchtigung ist mit einer abnehmenden Expression von CD44 verbunden (*ZHU et al., 2004; SODEK et al., 2006*), die durch OPN reguliert ist, und durch die  $\alpha\beta 3$ -Integrine in Makrophagen (*MARROQUIN et al., 2004; SODEK et al., 2006*) und in Osteoklasten (*CHELLAIAH et al., 2003; SODEK et al., 2006*) funktionieren. Somit wird die OPN-Expression in Makrophagen nicht nur für die Rekrutierung, sondern auch für Instrumentierung der spezifischen und unspezifischen angeborenen Immunantwort benötigt. Ohne OPN Expression wäre die Makrophagen-Migration und ihre Adhäsion beeinträchtigt (*GIACHELLI et al., 1998; ZHU et al., 2004; SODEK et al., 2006*). Das Protein Osteopontin induziert also die Chemotaxis von Makrophagen und wirkt sich auf die Phagozytose-Aktivität und die zytotoxische Aktivität dieser Zellen aus. Zusätzlich dient es als chemotaktischer Lockstoff und kann somit die Makrophagenmigration erleichtern (*DENHARDT et al., 2001*).

### **3.3.2. Auswirkungen von OPN auf Lymphozyten**

Osteopontin wird als ein wichtiger Lymphozyten-Vermittler betrachtet, der von aktivierten T-Lymphozyten sezerniert wird. Dadurch kommt es zur Induktion der Makrophagenmigration, während die Immunglobulin-Produktion und Proliferation von B-Lymphozyten erhöht wird (*WEBER et al., 1996; SODEK et al., 2006*). Zusätzlich wird die gewebeschädigende Freisetzung von reaktiven Oxidantien unterdrückt. Osteopontin sorgt für die Adhäsion von aktivierten T-Zellen. Die Aktivität dieser Zellen wird durch die proteolytische Spaltung von OPN durch Thrombin erhöht. In

niedrigen Konzentrationen fördert OPN die Chemotaxis von T-Zellen, während die Adhäsion von aktivierten T-Zellen durch eine höhere Konzentration des Proteins, vor allem nach der Thrombin-Spaltung, gesteigert ist (*O'REGAN et al., 1999; SODEK et al., 2006*). Zusätzlich fungiert Osteopontin als Kostimulator für die T-Zell-Proliferation und steigert die CD3 vermittelte T-Zell-Produktion von INF- $\gamma$  und dem CD40 Liganden (*O'REGAN & BERMAN, 2000*). Osteopontin induziert die T-Zell-Proliferation, Adhäsion und Chemotaxis. Außerdem moduliert lösliches OPN die Differenzierung und Proliferation von CD4- und CD8- Lymphozyten (*HIGUCHI et al., 2004*). Während eines Entzündungsprozesses treten NKT-Zellen auf, die ebenfalls Osteopontin exprimieren. Natürliche T-Killer-Zellen besitzen zytotoxische Funktion und sezernieren INF- $\gamma$ , um die Phagozytose durch Makrophagen zu fördern (*MOWAT et al., 2003; WATFORD et al., 2003; DAKIC et al., 2004; NAGLER-ANDERSON et al., 2004; SODEK et al., 2006*).

### **3.3.3. Auswirkungen von OPN auf neutrophile Granulozyten**

OPN vergrößert die NKT-Zell-Aktivität und löst die Infiltration und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten aus. Dies ist für die Polarisation und Migration von neutrophilen Granulozyten entscheidend (*ALSTERGREN et al., 2004; SODEK et al., 2006; KOH et al., 2007*). Es gibt eine eigenständige OPN-Expression in neutrophilen Granulozyten. Die Expression der mRNA von Osteopontin steigt in PMNs (*UENO et al., 2001; SODEK et al., 2006*). Im Gegensatz zu Makrophagen, ist die CD44 Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche bei Granulozyten nicht durch OPN beeinflusst, wodurch Unterschiede in der Migration der beiden Zellarten widerspiegelt werden können (*ALSTERGREN et al., 2004; SODEK et al., 2006*).

### **3.3.4. Polarisation der Th1-Antwort durch OPN**

OPN wird auch als T-Lymphozyten Aktivations-1 (Eta-1) Zytokin bezeichnet, weil es nicht nur die Vermittlung der zellulären Immunität und die Makrophagen-Aktivität, sondern auch die Entwicklung der Th1-Antwort fördert (*ASHKAR et al., 2000; CHABAS et al., 2001; JANSSON et al., 2002; O'REGAN, 2003; SODEK et al., 2006*). Aktivierte T-Zellen setzen OPN frei, wodurch es zur Rekrutierung von Makrophagen und zur Freisetzung von Th1-Zytokinen durch die Bindung von  $\alpha\beta 3$ -Rezeptoren kommt. In CD4 T-Zellen wird die mRNA von OPN nur in Th1-, aber nicht in Th2-Zellen exprimiert (*NAGAI et al., 2001; SODEK et al., 2006*). Durch die proinflammatorischen Effekte von OPN werden Makrophagen zu einer steigenden Produktion von Th1-Zytokinen, wie IL-12 und INF- $\gamma$ , und zu einer erniedrigten

Produktion von Th2-Zytokin, wie IL-10 und IL-4, veranlasst. IFN- $\gamma$  aus Th1-Zellen induziert OPN-mRNA und steigert die Expression von Osteopontin Zeit und Dosis abhängig (*LI et al., 2003*), das mit der Wirkung von OPN auf Th1-Zellen übereinstimmt. Diese Auswirkungen hängen wiederum von der Fähigkeit der Makrophagen, sich in APC zu differenzieren, die für die T-Zell Antwort nötig sind (*WEISS et al., 2001; SODEK et al., 2006*), und von ihrer Mobilisation in den Lymphknoten ab. Dadurch wird die Immunantwort auf den Th1-Typ polarisiert (*ASHKAR et al., 2000; SODEK et al., 2006*). Die Th1-Subpopulation fördert eine zellvermittelte Immunantwort. Dabei kommt es zur weiteren Rekrutierung von Makrophagen, zur weiteren Aktivierung von Th1-Zellen und zur erneuten Anziehung von neutrophilen Granulozyten und NKT-Zellen. Dadurch wird die Inflammation verlängert, die Phagozytose-Prozesse unterstützt und die Gewebedestruktion verstärkt (*SODEK et al., 2006*). Die Th2-Antwort dagegen unterstützt antikörpervermittelte Reaktionen, inklusive der IgE-Produktion, wodurch die B-Zell-Differenzierung steigt, die Makrophagen-Aktivierung vermindert bzw. kontrolliert und, in Verbindung mit regulatorischen T-Zellen, die Gewebeerneuerung durch Myofibroblasten initiiert wird. Die Beseitigung der Noxe führt zum Entzündungsrückgang und ermöglicht die Deposition von neuen Matrixbestandteilen, wodurch es zu einer Geweberegeneration kommt.

OPN kann die Entzündungsreaktion modulieren und die Gewebeerneuerung durch seine Auswirkungen auf die T-Zell-Differenzierung und durch die Fähigkeit das Überleben von Epithelzellen, Makrophagen und Fibroblasten zu beeinflussen, fördern. Ohne Osteopontin dominiert die Th2-Zytokin-Antwort und OPN-Null-Mäuse zeigen eine verstärkte Empfänglichkeit für intrazelluläre Pathogene (*PATARCA et al., 1993; NAU et al., 1999; ASHKAR et al., 2000; SODEK et al., 2006*).

### **3.4. OPN FUNKTIONEN IM EPITHEL**

Die Osteopontin Expression steht auch mit den Veränderungen der Epithelbarriere in Verbindung (*GASSLER et al., 2002; SODEK et al., 2006*). OPN kann von Epithelzellen ausgeschüttet werden und kontrolliert als Opsonin die Permeabilität des Epithels und die sekretorische Funktion (*BUTLER 1989; SODEK et al., 2006*). Osteopontin besitzt die Fähigkeit, spezifische Funktionen von Epithelzellen zu regulieren, die in den Schutzprozess involviert sind. Dazu gehören die MHC-II- und Toll-like-Rezeptoren, die die Antigenpräsentation und die Signalisierung einer Entzündung unterstützen (*MOWAT, 2003; BASU & FENTON, 2004; IWASAKI &*

MEDZHITOV, 2004; SODEK et al., 2006). Außerdem hat OPN, durch den Einfluss auf Endothelzellen, Auswirkungen auf die Zelladhäsion und die Zellmigration durch das Epithel (SODEK et al., 2006).

### 3.5. OPN FUNKTIONEN BEI DER WUNDHEILUNG

Bei der Wundheilung wird vermehrt Osteopontin exprimiert (LIAW et al., 1998; RITTLING et al., 1998; SODEK et al., 2006).

Die Regenerationsphase ist durch einen Differenzierungsschub von Histiozyten in Fibroblasten, sowie die Kapillarproliferation gekennzeichnet. Dies führt zu einer gesteigerten Fibroblastenproliferation und Differenzierung in Myofibroblasten (MCKAIG et al., 2002; SODEK et al., 2006) durch die Produktion von TGF- $\beta$ 1 (DI MOLA et al., 1999; MCKAIG et al., 2002; SODEK et al., 2006), TGF- $\alpha$  und PDGF („platelet-derived growth factor“). In OPN-Null-Mäusen ist die Differenzierung in Myofibroblasten beeinträchtigt. Dadurch ist die Kollagensynthese eingeschränkt, wodurch eine mangelhafte Wundheilung resultiert (LIAW et al., 1998; RITTLING et al., 1998; SODEK et al., 2006). Myofibroblasten sind mit einer reparativen Formation von Granulationsgewebe assoziiert. Während der Matrixformation antworten sie auf TGF- $\beta$ 1 mit einer steigenden Expression extrazellulärer Matrix (EMC), die Kollagen enthält und selektiv Matrixmetalloproteinasen unterdrückt (OVERALL et al., 1991; SODEK et al., 2006).

Als extrazelluläres Matrixmolekül (EMC) (DENHARDT et al., 2001) ist Osteopontin durch chemische Bindung fest in ein Gewebe eingebaut. Die extrazelluläre Matrix bezieht sich auf die „Kittsubstanz“ zwischen Zellen des Binde- oder Knochengewebes. Diese spielt eine große Rolle bei der Kontrolle der zellulären Aktivität. Sie ermöglicht das Anheften der Zellen, orientiert sie und bestimmt die Richtung der Zellmigration. Sowohl Osteopontin als auch TGF- $\beta$ 1 sind bedeutende Mediatoren der extrazellulären Matrixformation und der Wundheilung (BENDECK et al., 2000; DENHARDT et al., 2001; SODEK et al., 2000, 2006). Beide Proteine und Integrine werden in diesen Prozessen vermehrt freigesetzt (KAWANO et al., 2000; MAZZALI et al., 2002; SODEK et al., 2006) und fördern die Integrin-vermittelte Kollagen-Kolloid-Kontraktion (MCKRAIG et al., 2003; SODEK et al., 2006). TGF- $\beta$ 1 und OPN verringern die Apoptose von Fibroblasten und steigern somit die Matrixdeposition und die Wundheilung (DESMOULIÈRE et al., 1995; JELASKA & KORN, 2000; ZOHAR et al., 2004; SODEK et al., 2006).

In Fibroblasten und Endothelzellen, die an der Neovaskularisierung beteiligt sind, sorgt OPN für ein Überleben dieser Zellen (*DENHARDT et al., 2001*). Ein Mangel an diesem Protein in Fibroblasten führt zu einer Kaspase unabhängigen Nekrose durch Oxidantien (*ZOHAR et al., 2004*). Im Gegensatz zu einem programmierten Zelltod, in der apoptotische Zellen der Phagozytose unterliegen und mit Neubildung von Zellen und Gewebe verbunden ist, ist eine Nekrose stark mit einer Exazerbation der Entzündung assoziiert. Hierbei kommt es zu einer Rekrutierung von Granulozyten und Makrophagen und somit zu einer anwachsenden Entzündung und zur Gewebedestruktion (*INA et al., 1999; PATEOLOG 2003; KURTOVIC & SEGAL, 2004; SODEK et al., 2006*). In dieser Hinsicht kann OPN für den unterstützenden Zelltod und der Prävention vor rapider Nekrose, die in einer starken Entzündung und in Gewebeverlust endet, von Bedeutung sein (*SODEK et al. 2006*). Dies wird auch dadurch verdeutlicht, dass die Gewebedestruktion, die Wundheilung und die Fibrose im Anschluss an eine Entzündung in OPN-Null-Mäusen stark beeinträchtigt sind (*LIAW et al., 1998; TRUEBLOOD et al., 2001; SODEK et al., 2006*). Es zeigt sich eine steigende Destruktivität der neutrophilen Granulozyten aufgrund der beeinträchtigten Clearance durch Makrophagen, die ohne OPN in ihrer Phagozytose-Aktivität reduziert sind. Durch die zusätzlich eingeschränkte Funktion der Fibroblasten ist die Matrix-Produktion gestört und Zell-Debridment häuft sich an.

### **3.6. DIE ROLLE DES OSTEOPONTIN BEI DER CHRONISCHEN PARODONTITIS**

Um Marker für Alveolarknochenresorption und parodontale Erkrankungen zu finden, wurden Proteine innerhalb der Sulkusflüssigkeit charakterisiert. Unter diesen Proteinen befindet sich auch Osteopontin. Bei Patienten mit Parodontitis und gesunden Probanden wurden die Existenz von OPN innerhalb der Sulkusflüssigkeit und die Beziehung zwischen Osteopontinkonzentrationen und Sondierungstiefe untersucht (*KIDO et al., 2001; SHARMA & PRADEEP, 2006, 2007*). *KIDO et al.* wiesen innerhalb der Patientengruppe mit chronischer Parodontitis in der Sulkusflüssigkeit bei einer Sondierungstiefe von  $\geq 4$ mm zwei verschiedene Formen von OPN mit einem Gewicht von 54kDa und 66kDa zusammen mit zerfallenen Fragmenten nach. Im Gegensatz dazu finden sich in der Kontrollgruppe bei einer Sondierungstiefe von  $\leq 3$ mm nur eine Form mit 54kDa und keine zerfallenen Fragmente. Diese Ergebnisse weisen die Existenz von OPN in der Sulkusflüssigkeit und die Beziehung der steigenden Konzentration von Osteopontin mit einer wachsenden Progression parodontaler Erkrankungen nach (*KIDO et al., 2001;*

*SHARMA & PRADEEP, 2006, 2007*). Eine Parodontalbehandlung führte zur signifikanten Reduktion von Osteopontin in der Sulkusflüssigkeit (*SHARMA & PRADEEP, 2006, 2007*).

Weiterhin kommt es durch Suppression der Osteopontinsekretion zu Änderungen von extrazellulären Matrixkomponenten der Zementoberflächen von Zähnen (*LAO et al., 2006*). Dies könnte die Regenerationsfähigkeit und das Attachement von neuem Gewebe an parodontal erkrankte Zahnwurzeloberflächen beeinflussen (*LAO et al., 2006*).

Diese Resultate zusammen mit der Eigenschaft von Osteopontin als ein inflammatorisches Zytokin, seiner Rolle in der Epithelfunktion, in der zellulären und adaptiven Immunantwort, in Entzündungsprozessen, als T-Lymphozyten-Aktivierungs-Protein (Eta-1), als Knochenmatrix-Protein und seiner Rolle in der Wundheilung, stellt Osteopontin als einen möglichen Marker für eine erhöhte oder verminderte Anfälligkeit für parodontale Entzündungsprozesse, somit auch für die chronische Parodontitis, dar (*SODEK et al., 2006*).

### **3.7. OSTEOPONTIN-POLYMORPHISMEN IM HUMANEN OPN-GEN**

#### **3.7.1. Typisierung der Osteopontin-Polymorphismen**

Von den neun in dieser Studie untersuchten Polymorphismen liegen fünf (OPN-1748, OPN-616, OPN-443, OPN-156, OPN-66) innerhalb der Promotorsequenz des Osteopontingens, an 5'-Ende. Zwei (OPN+282, OPN+750) befinden sich im sechsten codierenden und siebten codierenden Exon. Die restlichen zwei SNPs (OPN+1083, OPN+1239) sind im siebten Exon lokalisiert, stellen aber untranslatierte Bereiche dar.

#### **3.7.2. Polymorphismen innerhalb des Promotorabschnittes**

Der Bereich unmittelbar vor einem Gen umfasst den Promotorabschnitt (=Steuerregion) eines Gens. Diese regulatorische Sequenz dient als Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren und beeinflusst die Transkriptionsaktivität eines Gens, und somit die Stärke der Genexpression.

##### **3.7.2.1. OPN A-1748G: rs2728127**

Dieser SNP liegt am weitesten vor dem Gen. Es handelt sich um einen Basenaustausch. Die eine häufigere Base A des Wildtyps, wird durch eine seltenere Base G ausgetauscht.

### **3.7.2.2. OPN T-616G: rs2853744**

Auch bei diesem Polymorphismus handelt es sich um einen Basenaustausch in der Promotorsequenz des Osteopontingens. Hier handelt es sich um die Basen T und G.

### **3.7.2.3. OPN T-443C: rs11730582**

Bei diesem Polymorphismus wird die häufigere Base T des Wildtyps durch ein C ersetzt. Dieser SNP verursacht Bindungsdifferenzen unbekannter Faktoren während der Transkription und beeinflusst auf diese Weise die Transkriptionsaktivität und die Genexpression (*GIACOPELLI et al., 2004*).

OPN T-443C weist eine Assoziation zur Hepatitis-C Aktivität in einer japanischen Kohortenstudie auf. Dadurch könnte dieser Polymorphismus von diagnostischer und prognostischer Bedeutung für diese Krankheit sein (*MOCHIDA et al., 2004*).

### **3.7.2.4. OPN delG-156: rs11439060**

Bei dem Polymorphismus OPN-156 handelt es sich um einen Deletions- oder Insertionspolymorphismus: Fehlt die betroffene Base G, liegt das Deletionsallel delG vor. Im anderen Fall ist eine zusätzliche G-Base vorhanden. Hierbei handelt es sich um das Insertionsallel G. Dieser Polymorphismus zeigt eine starke Assoziation zu der autoimmunen Erkrankung, systemischer Lupus erythematosus (SLE) (*D'ALFONSO et al., 2005*). OPN delG-156 ist in Patienten mit SLE zusammen mit der OPN-Konzentration deutlich erhöht (*D'ALFONSO et al., 2005*). Zusätzlich besteht eine signifikante Verbindung von OPN-156G mit der Entwicklung der Lymphadenopathie bei SLE-Patienten.

Osteopontin enthält eine RUNX2 bindende Seite. Dies ist für die OPN-Regulierung im Knochengewebe von Bedeutung (*GIACOPELLI et al., 2004*). Durch den SNP OPN delG-156 kann eine weitere RUNX2 Bindungsstelle entstehen, wobei GG die höhere Intensität aufweist. RUNX2 gehört den RUNT-Faktoren an und interagiert mit dem Transkriptionsfaktor Sp1. Durch seine Expression wird der OPN-Promotor aktiviert (*GIACOPELLI et al., 2004*) und durch seine vermehrte Ausbildung werden die Genexpression von Osteopontin und die Transkriptionsaktivität erhöht (*GIACOPELLI et al., 2004*). SNPs innerhalb der RUNX Bindungsseiten werden in drei Genen mit drei verschiedenen Autoimmunerkrankungen, *SLE*, *Psoriasis* und *rheumatischer Arthritis* in Verbindung gebracht (*D'ALFONSO et al., 2005*). Dies lässt auf die wichtige Rolle des OPN-Polymorphismus bei autoimmunologischen Prozessen schließen.

### **3.7.2.5. OPN T-66G: rs28357094**

Der SNP-66 liegt innerhalb der Promotorsequenz am nächsten am codierenden Bereich des Osteopontingens. Es kommt zu einem Basenaustausch T/G. Dieser Polymorphismus beeinflusst die Bindungsaffinität der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3, wobei das T-Allel eine höhere Promotoraktivität bewirkt, als das G-Allel (GIACOPELLI *et al.*, 2004). Der Transkriptionsfaktor Sp1 bindet sequenzspezifisch an das -66T-Allel, aber nicht an das G-Allel (HUMMELSHOJ *et al.*, 2006). Dadurch wird möglicherweise die Th1-Balance gegen die Th2-Balance in der Immunantwort verschoben (HUMMELSHOJ *et al.*, 2006). Weil Osteopontin für das Gleichgewicht von Th1-Antwort und Th2-Antwort eine wichtige Rolle spielt, ist es möglich, dass der SNP-66 mit diesem assoziiert ist (HUMMELSHOJ *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Basenaustausch T/G funktionale Relevanz besitzt und dadurch eine wichtige Rolle in Entzündungen spielt (HUMMELSHOJ *et al.*, 2006).

### **3.7.3. Polymorphismen innerhalb eines Exons**

Unter einem Exon ist der codierende Bereich eines Gens zu verstehen, der die Informationen für ein Protein enthält.

#### **3.7.3.1. OPN T+282C: rs4754**

Der Polymorphismus OPN T+282C befindet sich im sechsten Exon des Osteopontingens. Es handelt sich um einen Basenaustausch (T→C) ohne zu einem Aminosäureaustausch zu führen. Die codierte Aminosäure Aspartat bleibt erhalten. Die Referenzsequenz, die sogenannte *conting reference*, beinhaltet die häufiger gefundene Sequenz, stellt also das häufiger gefundene Allel (= Wildtyp) dar. Im Fall des SNP +282 handelt es sich um das T-Allel.

#### **3.7.3.2. OPN T+750C: rs1126616**

Der Polymorphismus OPN T+750C liegt im siebten Exon des OPN-Gens. Ebenfalls kommt es bei diesem SNP zu einem Basenaustausch (T→C) ohne die Aminosäure Alanin zu verändern. Die *conting reference* ist in diesem Fall das Allel T. Die synonyme Sequenzänderung durch OPN+750 in Exon 7 (Ala<sup>236</sup>Ala) des Osteopontingens ist deutlich mit SLE in einer amerikanischen Kohorten-Studie assoziiert (FORTON *et al.*, 2002).

### **3.7.4. Polymorphismen innerhalb eines untranslatierten Genbereichs**

Diese Polymorphismen liegen innerhalb eines Exons und sind somit in einer m-RNA enthalten. Allerdings befinden sie sich im 3' untranslatierten Bereich, der nicht mehr

Aminosäure-codiert wird. Dieser Bereich einer m-RNA kann funktionell relevant sein, weil dieser die Stabilität der m-RNA oder die Translationsrate beeinflussen kann. Auf diese Weise können Sequenzänderungen innerhalb der 3´untranslatierten Region diese Funktionen ändern und Ursachen für Erkrankungen darstellen. Dadurch sind auch SNPs innerhalb eines uncodierten Bereichs funktionell von Bedeutung.

#### 3.7.4.1. OPN A+1083G: rs1126772

Der SNP OPN A+1083G ist in dem uncodierten Bereich des Exon sieben des Osteopontingens enthalten. Auch bei diesem Polymorphismus handelt es sich um einen Basenaustausch. Die häufigere Base A ist durch die seltenere Base G ausgetauscht und steht mit dem Krankheitsbild ALPS in Verbindung (*CHIOCCHETTI et al., 2004*).

#### 3.7.4.2. OPN A+1239C: rs9138

Bei dem Polymorphismus OPN A+1239C handelt es sich ebenfalls um einen Basenaustausch (A→C) innerhalb des uncodierenden Bereichs des siebten Exon des Osteopontingens. Dieser Basenaustausch ist mit SLE und ALPS assoziiert (*D´ALFONSO et al., 2005; CHIOCCHETTI et al., 2004*).

**Tab. 3.1.:** Charakteristika der Single Nukleotide Polymorphismen (SNPs) des OPN-Gens:

SNP	NCBI ID	Lokalisation	Variation	Funktion
OPN A-1748G	rs2728127	Promotor	A/G	Locus
OPN T-616G	rs2853744	Promotor	T/G	Locus
OPN T-443C	rs11730582	Promotor	T/C	Locus
OPN delG-156	rs11439069	Promotor	delG-	Locus
OPN T-66G	rs28357094	Promotor	T/G	Locus
OPN T+282C	rs4754	Exon 6	T/C	Synonymous change (Asp)
OPN T+750C	rs1126616	Exon 7	T/C	Synonymous change (Ala)
OPN A+1083G	rs1126772	Exon 7	A/G	Untranslated region
OPN A+1239C	rs9138	Exon 7	A/C	Untranslated region

### 3.8. GENOTYPISIERUNG DER OPN-POLYMORPHISMEN DURCH REAL-TIME PCR

Den Nachweis der neun Osteopontin Polymorphismen wurde in der Studienpopulation der vorliegenden Arbeit mittels Real-Time PCR auf dem LightCycler 480 (Roche) geführt. Das LightCycler® System vereint die Vorteile einer *Rapid Cycle PCR* mit denen der kontinuierlichen parallelen Fluoreszenzmessung (WITTWER & RIRIE, 1997).

Unter *Rapid Cycle PCR* versteht man eine DNA-Amplifikation durch eine Polymerasekettenreaktion mit sehr kurzen Zyklen von ca. 20-60 Sekunden (WITTWER *et al.*, 1994). Hierfür werden Kapillaren verwendet, die aufgrund des Verhältnisses von großer Oberfläche zu kleinem Volumen, schnelle Temperaturveränderungen durch Heiß- beziehungsweise Kaltluft ermöglichen (WITTWER, 2001). Mit Hilfe der PCR lassen sich sehr geringe Mengen DNA vervielfältigen. Theoretisch genügt dafür ein Molekül.

Ihr Prinzip liegt in der Denaturierung der DNA, dem *Annealing* und der *Elongation* (MÜHLHARDT, 2006). Während des Denaturierungsschrittes wird die DNA auf 95°C erhitzt, so dass sich die beiden Stränge der Template-DNA trennen. Im zweiten Schritt, dem *Annealing*, wird die Temperatur auf die für den *Primer* passende Annealingtemperatur gesenkt. Auf diese Weise kommt es zur Bindung der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer an die komplementäre Sequenz der Template-DNA.

Im Anschluss wird die Temperatur auf 72°C erhöht (MÜHLHARDT, 2006). Dies führt zu einer optimalen Zweistrangsynthese. Die *Primer* werden verlängert, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Template-DNA exakt gleicht. Weil die Komplementierung an beiden Strängen der Template-DNA durch den Forward- und Reverseprimer abläuft, ist innerhalb eines Zykluses die Zahl der Template-DNA verdoppelt. Wiederholt man den Zyklus erhält man die vierfache Menge. Diesen Schritt nennt man *Elongation* (MÜHLHARDT, 2006).

Die simultane Fluoreszenzmessung ermöglicht die Analyse der PCR-Produkte schon während der Amplifikation, daher spricht man von *Real-Time PCR* (JEONG *et al.*, 2005). Die Markierung der DNA kann sequenzunspezifisch durch interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe erfolgen oder sequenzspezifisch durch Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden.

Die *Real-Time PCR* ermöglicht während der Amplifikation durch Vergleiche mit externen Standards die Quantifizierung der Ausgangsmenge an Kopien des

Genabschnitts, der durch die *Primer* amplifiziert wird. Zudem können durch die Schmelzpunktanalysen sequenzspezifische Informationen über das PCR-Produkt gewonnen werden (CUI *et al.*, 2007). Die Schmelzpunktanalyse mit *Hybridization Probes* ermöglicht die Identifizierung von SNPs (LAY & WITTEWER, 1997).

Bei *Hybridization Probes* handelt es sich um ein zusammengehöriges Paar von kurzen mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Oligonukleotiden, einer so genannten Ankersonde und einer Sensorsonde (MÜHLHARDT, 2006). Der Sensor deckt die variable Sequenz, also die Mutationsstelle, ab. Er bindet nukleotid-spezifisch und temperaturabhängig an die DNA und wird zusammen mit dem Anker am Ende der Elongation wieder abgeschmolzen. Bindet der Sensor Allel-spezifisch, ist eine höhere Temperatur für das Abschmelzen nötig, da die Verbindung Sensor-spezifisches Allel stärker ist als eine Allel-unspezifische Bindung (WITTEWER, 2001).

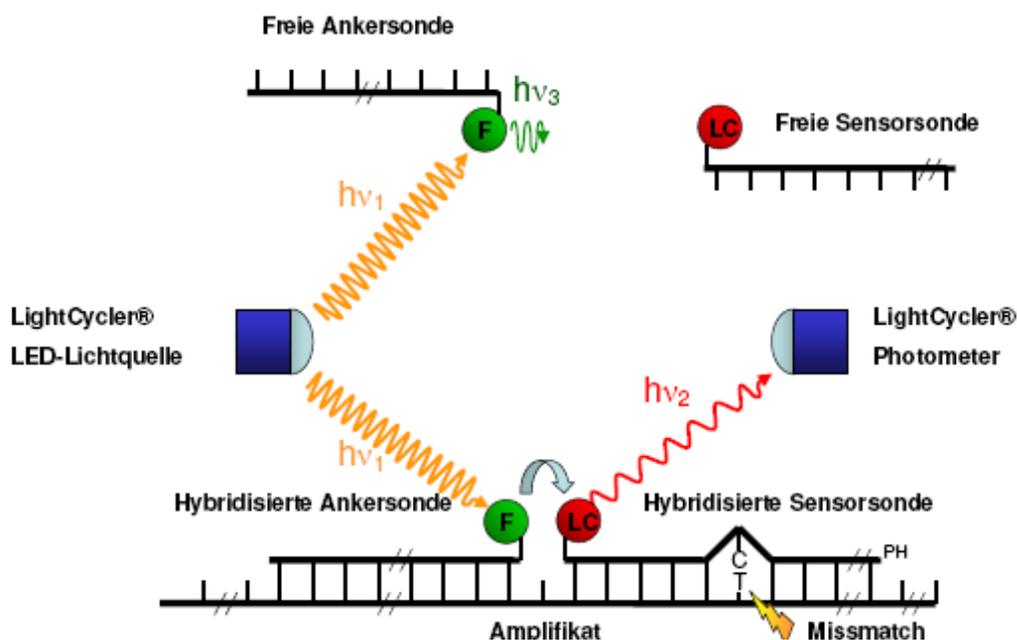
Das Detektionsprinzip der *Hybridization Probes* basiert auf einem *Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)*. Die mit Fluoreszein markierte Ankersonde überträgt als Donor nach Anregung durch die Lichtquelle mittels Resonanz ihre Energie auf den Akzeptor, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. LCRed640) markierte Sensorsonde (MEUER & WITTEWER, 2005). Dieser wiederum emittiert nach dieser Anregung Lichtquanten mit einer spezifischen Wellenlänge, die vom Photometer des LightCycler® Systems detektiert werden können (WITTEWER & RIRIE, 1997). Entscheidend ist dabei, dass der *FRET* nur bis zu einer bestimmten räumlichen Nähe zwischen Donor und Akzeptor stattfindet. Anker und Sensor werden daher so konzipiert, dass sie spezifisch nur an zwei durch 1–5 Basen getrennte Genabschnitte binden. Werden diese Sonden gleichzeitig an das Amplifikat gebunden wird ein detektierbares Signal emittiert. Liegen eine oder beide Sonden nur in Lösung bzw. unspezifisch hybridisiert vor, ist der durchschnittliche Abstand zwischen den *Hybridization Probes* zu groß, um ein signifikantes Signal auszusenden (JEONG *et al.*, 2005).

Zur Identifizierung von SNPs wird direkt nach der Amplifikation durch Messung dieses Signals eine Schmelzkurve erstellt (RASMUSSEN, 2001).

Die Schmelzkurvenanalyse beruht auf physikalischen Prozessen, d.h. auf der temperaturabhängigen DNA-Anlagerung und –Dissoziation. Dabei wird die Temperatur kontinuierlich langsam gesteigert und die Abnahme der Fluoreszenz bestimmt. Die Schmelzkurve besitzt meist einen sigmoiden Verlauf und wird durch  $T_m$  bestimmt (MEUER & WITTEWER, 2005).  $T_m$  ist die Temperatur, bei der 50% der doppelsträngigen DNA als Einzelstränge vorliegen. Der  $T_m$  wird durch Faktoren wie

Salzkonzentration,  $MgCl_2$ -Konzentration und Stabilität der Basenpaarung beeinflusst. Den Hauptfaktor stellen aber der GC-Basenanteil (Guanin/Cytosin) und dessen Länge dar.

Der Schmelzpunkt markiert die Temperatur, an dem diese Kurve am steilsten abfällt, d.h. die Sonden am schnellsten dissoziieren. Leitet man die bei der Erstellung der Schmelzkurve ermittelte Fluoreszenz nach der Zeit ab ( $dF/dt$ ), entspricht der Schmelzpunkt dem Scheitelpunkt der errechneten Kurve (RASMUSSEN, 2001).



**Abb. 3.1.: Wirkungsweise von Hybridization Probes.**

Durch die Abstrahlung ( $h\nu_1$ ) der LightCycler® Lichtquelle wird das mit der Ankersonde verbundene Fluoreszenz (F) angeregt. Durch Resonanz vermittelt, kann die daraus resultierende Positionenenergie der Elektronen auf nahe liegende Elektronen anderer Moleküle übertragen werden (blauer Pfeil). Der mit der Sensorsonde gekoppelte Farbstoff LCRed640 (LC) kann auf diese Weise angeregt werden und emittiert daraufhin Lichtquanten einer spezifischen Wellenlänge ( $h\nu_2$ ), die vom LightCycler® Photometer bestimmt werden können. Dieser so genannte *FRET* (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) findet signifikant nur bei räumlicher Nähe zwischen dem Donor Fluoreszenz und dem Akzeptor statt. Diese ist nur gewährleistet, wenn beide *Hybridization Probes* an das Amplifikat binden (unten), nicht aber, wenn sie sich frei in Lösung befinden (oben). In diesem Fall wird die Energie als Fluoreszenz freigesetzt ( $h\nu_3$ ). Ein *Mismatch*, eine Fehlbindung, der Sonden mit dem Amplifikat beeinflusst die Stabilität der Hybridisierung und bedingt deren Dissoziation mit dem PCR-Produkt bei niedrigeren Temperaturen. Damit die Sensorsonde nicht als Primer für die Polymerase wirken kann, wird das 3'-Ende phosphoryliert (PH).

Quelle: Roche Diagnostics, Workshop Martinsried, 2007

Beim Design von *Hybridization Probes* wird im Allgemeinen darauf geachtet, dass der Schmelzpunkt der Ankersonde möglichst nicht durch unter ihr liegende Polymorphismen beeinflusst werden kann. Zusätzlich sollte dieser höher liegen als der Schmelzpunkt der Sensorsonde, unter der die interessierenden Mutationen liegen (WITTEWER, 2001). Da die durch den *FRET* vermittelte Fluoreszenz nur dann emittiert wird, wenn beide Sonden mit dem PCR-Produkt hybridisiert sind, wird so bei

der Schmelzpunktanalyse die Dissoziation der Sensorsonde von dem Amplifikat ermittelt. Der Schmelzpunkt einer Sensorsonde ist abhängig von der Stabilität seiner Bindung an das PCR-Produkt. Diese wird unter anderem von der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Basen bestimmt (*MEUER & WITTEWER, 2005*). Ein *Mismatch*, also die fehlende Kompatibilität einer Base mit ihrem zugehörigen Partner, bewirkt daher eine schwächere Bindung zwischen Sensorsonde und Amplifikat. Zusätzlich kann diese Bindung auch durch daraus entstehende strukturelle und elektrostatische Sekundäreffekte weitergehend beeinflusst werden (*RASMUSSEN, 2001*). Im Allgemeinen beträgt der Abstand zwischen dem Schmelzpunkt des Wildtyps und der Mutation ca. 5°C. Da dabei aber auch die Position des *Mismatches* in der Sensorsonde, sowie die Nachbarbasen eine Rolle spielen, können mittels der Schmelzpunktbestimmung sogar unterschiedliche Mutationen voneinander abgegrenzt werden (*JEONG et al., 2005*).

#### **4. ZIELE DER ARBEIT**

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob die neun Polymorphismen des Osteopontingens mit der chronischen Parodontitis assoziiert sind.

Hierzu werden die SNPs OPN A-1748G:rs2728127, OPN T-616G:rs2853744, OPN T-443C:rs11730582, OPN T-66G:rs28357094, OPN T+282C:rs4754, OPN T+750C:rs1126616, OPN A+1083G:rs1126772, OPN A+1239C:rs9138 und der Deletionspolymorphismus OPN delG-156:rs11439060 bei 402 Patienten mit chronischer Parodontitis und 793 Kontrollpersonen untersucht. Die Genotyp- sowie die Allelfrequenz der Polymorphismen der Patientengruppe soll mit denen der Kontrollgruppe verglichen werden. Außerdem sollen die Genotyp- und Allelfrequenzen der Studienpopulation dahingehend untersucht werden, ob eine geschlechtsspezifische Verteilung der Polymorphismen vorhanden ist, und ob eine Verbindung zum Risikofaktor Rauchen existiert.

## 5. MATERIAL UND METHODEN

### 5.1. STUDIENPOPULATION

#### 5.1.1. Kohorte mit chronischer Parodontitis

Diese Gruppe umfasst 402 Patienten mit chronischer Parodontitis, welche in der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Ludwig-Maximilians-Universität München in Behandlung waren oder sind (P1-402). Patienten mit systemischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Immundefekten, sowie Patienten mit einem erhöhten Endokarditis-Risiko und schwangere Frauen wurden nicht in die Studie aufgenommen. Alle Patienten erhielten Information über Ablauf, Inhalt und Ziele der Untersuchungen und erklärten schriftlich vor der Aufnahme in die Studie ihr Einverständnis zur Teilnahme.

Das Vorliegen einer „generalisierten, chronischen Parodontitis“ wurde anhand einer kombinierten radiologischen und klinischen Befunderhebung diagnostiziert: An jedem Zahn wurde eine 6-Punkt Taschensondierungstiefenmessung (TST) durchgeführt, wobei Provokation einer Blutung notiert wurde („*bleeding on probing*“, BOP). Die Lokalisation der Messpunkte war mesiobukkal, zentrobukkal, distobukkal, distooral zentrooral und mesiooral. Die Messung erfolgte entlang der Zahnachse, vom Gingivalsaum zum Sulkusboden, mit Hilfe einer Parodontalsonde PCP 10 (Hu-Friedy Europe, Leimen, Deutschland). Der Furkationsbefall wurde mit einer Naber Sonde Typ PQ2N (Hu-Friedy Europe, Leimen, Deutschland) in horizontaler Richtung vom Furkationseingang bis zum Defektboden gemessen. Die Einteilung erfolgte anhand der Klassifikation von *Nyman* und *Lindhe* (1997):

<b>Grad I:</b> Furkation bis 3mm horizontal sondierbar
<b>Grad II:</b> Furkation mehr als 3mm horizontal sondierbar, jedoch nicht durchgängig
<b>Grad III:</b> Furkation durchgängig sondierbar

**Tab. 5.1.:** Einteilung des Furkationsbefall von Prämolaren und Molaren.

Auch die Zahnlockerung wurde in drei verschiedene Klassen eingeteilt:

<b>Grad I:</b> Zahnkrone bis 1mm auslenkbar
<b>Grad II:</b> Zahnkrone mehr als 1mm auslenkbar
<b>Grad III:</b> Zahn bewegt sich auf Lippen- und Wangendruck, auch in axialer Richtung

**Tab. 5.2.:** Einteilung des Lockerungsgrades.

Zusätzlich zum klinischen wurde ein röntgenologischer Befund erhoben. Zur Beurteilung des Knochenniveaus wurde bei Patienten der Untersuchungsgruppe ein Orthopantomogramm angefertigt. Dabei wurde die Distanz zwischen Limbus alveolaris und der Schmelz-Zement-Grenze als Zeichen des Knochenverlusts bestimmt. Werte von  $\geq 1\text{mm}$  zirkulär um den betroffenen Zahn wurden als Attachmentverlust interpretiert.

Um in die Untersuchungsgruppe aufgenommen zu werden, mussten folgende Kriterien erfüllt sein: Mindestens 5 Zähne mussten eine Taschensondierungstiefe  $\geq 5\text{mm}$  oder einen Furkationsbefall vom Grad II oder III aufweisen. Der Abstand des Limbus alveolaris zur Schmelz-Zement-Grenze sollte zirkulär mindestens 3mm betragen.

### **5.1.2. Kohorte ohne Parodontitis**

Die Kontrollgruppe umfasst 793 gesunde Blutspender kaukasischer Herkunft.

Alle Individuen dieser Gruppe wurden parodontologisch untersucht. Diese sollten keinerlei klinische Anzeichen einer chronischen Parodontitis aufweisen und durften sich innerhalb der letzten fünf Jahre keiner Parodontaltherapie unterzogen haben. Es sollten noch mehr als 22 Zähne in situ sein und es durfte nicht an mehr als einer Stelle eine maximale Taschensondierungstiefe von  $\geq 3\text{mm}$  vorhanden sein. Außerdem durften kein Furkationsbefall und kein Knochenabbau feststellbar sein.

Bei der Kontrollgruppe wurde, sofern kein aktuelles Orthopantomogramm zur Verfügung stand, aus ethischen Gründen auf die gesonderte Anfertigung eines Röntgenbildes verzichtet.

Die Studie wurde vom Ethikkomitee der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität genehmigt (290/01).

### **5.1.3. Blutentnahme**

Jedem Patienten und jeder Kontrollperson wurden 9ml venöses Blut aus der Armbeuge entnommen. Dazu verwendete man sterile Röhrchen (Monovette<sup>®</sup>, Sarstedt, Nümbrecht) mit 1,6mg Kalium-EDTA-Lösung pro ml Blut. Das entnommene Blut wurde gleichmäßig mit der Kalium-EDTA-Lösung in Kontakt gebracht.

### **5.1.4. Aufarbeitung der Blutproben**

Die Blutproben wurden auf zwei verschiedene Arten verarbeitet.

Das entnommene Vollblut wurde 10 Minuten bei 2000rpm zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde abpipettiert. Der Buffycoat (Leukozyten und Thrombozyten), der sich auf dem Erythrozytensediment befand, wurde entfernt und

in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß umgefüllt. Die Plasmaproben wurden für die spätere Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingelagert.

Die zweite Möglichkeit der Blutaufarbeitung bestand darin, nach Abnahme des Plasmas, das Erythrozytensediment mit dem Buffycoat (Volumen etwa 5ml) in ein 15ml Zentrifugenröhrchen zu überführen und mit Erythrozytenlysepuffer (155mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 400 mM NaCl, 1mM EDTA) auf 12ml aufzufüllen. Es erfolgte eine Inkubation von etwa 10 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur oder  $37^{\circ}\text{C}$ , bis die Erythrozyten lysiert waren. Nach ihrer vollständigen Lyse wurde die Lösung 10 Minuten bei 2000rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Leukozytensediment in 1ml Ery-Lysepuffer resuspendiert, in ein 1,5ml Gefäß überführt und mittels einer Tischzentrifuge (Modell SD und AL, Roth) für 5 Minuten bei 5000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und verworfen. Das Leukozytensediment wurde entweder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt oder sofort weiterverarbeitet.

### **5.1.5. Isolierung genomischer DNA**

#### **5.1.5.1. DNA-Isolierung mit Hilfe des QIAamp<sup>®</sup> Blood Midi Kit**

200 $\mu\text{l}$  Buffycoat wurden in ein 1,5ml Reaktionsgefäß, in dem 20 $\mu\text{l}$  Proteinase K-Lösung (20mg/ml, Quiagen) enthalten waren, überführt. Nach Zugabe von 200 $\mu\text{l}$  im Kit enthaltenen Lysepuffers AL (10 mM Tris/HCl PH 8, 400 mM NaCl, 10 mM EDTA), wurde die Lösung sorgfältig mittels Vortex-Schüttler vermischt. Danach folgte eine Inkubation der Röhrchen von 10 Minuten im Wasserbad bei  $56^{\circ}\text{C}$ . Nach Zugabe von 200 $\mu\text{l}$  100%igem Ethanol (Merck) und erneutem Mischen, wurde das Lysat auf die vorgesehene Säule übertragen und eine Minute bei 13000 Upm zentrifugiert. Die in der Lösung erhaltene DNA heftete sich hierbei an die Silica-Gel-Matrix der Säule. Im weiteren Verlauf erfolgten zwei Waschschriffe. Im ersten Waschschriffe wurden 500 $\mu\text{l}$  Puffer AW1 auf die Säule aufgebracht und für 1 Minute bei 13000 Upm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Im zweiten Waschschriffe wurde der Durchfluss, der aus 500 $\mu\text{l}$  Puffer AW2 und 3 Minuten langer Zentrifugation bei 13000 Upm entstand, ebenfalls abpipettiert. Um möglichst alle Reste des ethanolhaltigen Puffers AW2 zu beseitigen, wurde ein zusätzlicher einminütiger Zentrifugationsschriffe bei 13000 Upm durchgeführt. Zur Elution der DNA wurde die Säule in ein sauberes 1,5ml-Gefäß platziert und es wurden 200 $\mu\text{l}$  Elutionspuffer AE direkt auf die Membran der Säule aufgetragen. Nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte eine

Zentrifugation für 3 Minuten bei 13000 Upm. Die so gewonnene DNA wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### **5.1.5.2. DNA-Isolierung nach der Aussalzmethode (MILLER 1988)**

Ausgangsmaterial waren die aus 9ml Blut isolierten Leukozyten. Die Zellen wurden in 15ml Zentrifugenröhrchen (Spitzboden) überführt und in 6ml Kernlysepuffer (10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 400 mM  $\text{NaCl}$ , 1 mM EDTA) durch Auf- und Abpipettieren, sowie durch Mixen auf dem Vortex-Schüttler resuspendiert. Zur Degradation von Membran- und Proteinanteilen wurde SDS (Natriumdodecylsulfat-Lösung 20%, Endkonzentration 1%) und Proteinase K (Quiagen, Endkonzentration 0,2mg/ml) zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  für mindestens drei Stunden. Während dieser Inkubationszeit wurde wiederholt auf dem Vortex-Schüttler gemixt, um die DNA besser in Lösung zu bringen. Dabei musste darauf geachtet werden, dass sich die DNA vollständig löst und nicht mehr als geléeartiges Aggregat vorlag. Sonst wäre sie bei den Folgeschritten verloren gegangen. Um die DNA vollständig aufzulösen, wurde das Volumen an Kernlysepuffer gegebenenfalls erhöht und die Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  verlängert. Zur Fällung der Protein- und Membranfragmente wurde  $\frac{1}{3}$  Volumen 5M  $\text{NaCl}$ -Lösung zugegeben, kräftig gemixt und für mindestens 30 Minuten über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  oder auf Eis inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 3600rpm wurde der Überstand abpipettiert und anschließend nochmals 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand dieses Schrittes wurde in ein neues Röhrchen überführt, mit 0,6 Volumen Isopropanol (Merck) versetzt und langsam gemischt. Die fadenförmig ausgefallene DNA wurde mit einer automatischen 200- $\mu\text{l}$ -Pipette aufgenommen und zweimal in 70%igem Ethanol (Merck) gewaschen. Anschließend wurde die DNA zur Trocknung von der Spitze in einem 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß abgestreift. Dadurch vermied man einen Verlust der getrockneten DNA durch Abfallen von der Spitze. Die getrocknete DNA wurde je nach Menge in 100-500 $\mu\text{l}$  TE-Puffer (10 mM Tris/HCl PH 8, 1 mM EDTA) gelöst. Die Aufbewahrung erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **5.1.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Messung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm in einem Photometer Modell Gene Quant Pro RNA/DNA Calculator® (Amersham Pharmacia) durchgeführt. Nach der Bestimmung der Konzentration erfolgte die Verdünnung der Proben zu einer Endkonzentration von 100ng/ $\mu\text{l}$ .

## 5.1.7. Real-Time PCR auf dem LightCycler® System

### 5.1.7.1. Auswahl der Sonden

Um eine hohe Spezifität bei der *Real-Time PCR* zur Identifizierung der OPN SNPs zu erreichen, wurden von der Firma *TIB-Molbiol* für die einzelnen SNPs Sonden-Kombinationen synthetisiert.

**Tab. 5.3.:** Folgende Sonden wurden verwendet:

Sonde	Sequenz
OPN -1748A	5`-: gTTTTTAgAATTTTCaGACTTCCC—FL -3`
OPN -1748 Anchor	5`-: LC Red670-CCACTAAATTgACAACATgACACgCTT—PH -3`
OPN -616 Anchor	5`-: CTCCTgAAgCAgCCCTCTCAAgC—FL -3`
OPN -616G	5`-: LC Red610-TCATCCTgCTCTCAgTCAgAAAC—PH -3`
OPN -443 Anchor	5`-: TCACAAAgCTAAgCTTgAgTAgTAAAggAC—FL 3`
OPN -443C	5`-: LC Red640-AggCAAgtTCTCTgAACTCCTT—PH 3`
OPN -156G	5`-: gTTTTTggTTTTTTTTTgTTTTAAACC—FL -3`
OPN -156 Anchor	5`-: LC Red640-AACCAgAgggggAAgTgTgggAgC—PH -3`
OPN -66G	5`-: ATgACACAATCTCgCCgCC—FL -3`
OPN -66 Anchor	5`-: LC Red610-CCCTgTgTTggTggAggATgTCTgC—PH -3`
OPN +282C	5`-: AAgATgATgACgACCATgTgg—FL -3`
OPN +282 Anchor	5`-: LC Red610-CAgCCAggACTCCATTgACTCgAA—PH -3`
OPN +750C	5`-: ggAAAgCCAATgATgAgAgCA—FL -3`
OPN +750 Anchor	5`-: LC Red640-TgAgCATTCCgATgTgATTgATAgTCA—PH -3`
OPN +1083G	5`-: AAACACATCAgTTATTTCCAgAC—FL -3`
OPN +1083 Anchor	5`-: LC Red640-CAAATAgATACACATTCAACCAATAAACTg—PH -3`
OPN +1239C short	5`-:TgTTTgCgTCTACATAAATTC—FL -3`
OPN +1239 Anchor	5`-:LC610-TTCATgAgAgAATAACAAATATTAATAACAgTg—PH -3`

### 5.1.7.2. Auswahl der Primer

Bei der Konzeption der *Real-Time PCR* wurde besonderer Wert auf eine hohe Spezifität des Verfahrens zur Identifizierung der OPN Polymorphismen gelegt .Dafür wurden von der Firma *TIB-Molbiol* für die einzelnen SNPs Primer-Kombinationen synthetisiert. Primer sind kurze Nukleotidsäuren aus mehreren Mononukleotiden, die über Phosphordiesterbindungen verknüpft sind (*CALLADINE et al., 2006*). Sie stellen ein kurzes Stück DNA mit definierter Sequenz dar, das als Verlängerungspunkt der Polymerase dient (*WITTEWER, 2001*). Zudem müssen die Primer so gewählt werden,

dass sie nicht untereinander oder mit den Sonden in relevanten Umfang hybridisieren können. Außerdem dürfen die Primer nicht auf dem variablen Bereich liegen (MÜHLHARDT, 2006). Damit sie diese Funktionen, und somit eine spezifische Amplifikation innerhalb der PCR erfüllen, muss die geeignete Primerpaarkombination für jeden Polymorphismus getestet werden.

**Tab. 5.4.:** Folgende Primer fanden Verwendung:

Primer- Name	Sequenz
OPN -1748 F	5'-: ggCTCCAgCATAATCTATTCCTA -3`
OPN -1748 R	5'-: TggTTTgTAggTAATAAgCACCCAT -3`
OPN -443 Bm	5-gAAggCTATTgTTCAAgCCTACA`-3
OPN -616 F	5`-CATggATgAgggAACAAggATA -3`
OPN -616 S	5`-AgCAgTgACACAgCggAA -3`
OPN -156 F	5'-: CTgAATgCCCATCCCgTA -3`
OPN -66 A	5'-: AAgCCCTCCCAgAATTTAAATgC -3`
OPN -66 R	5'-: TgACAACCAAgCCCTCCCAgAA -3`
OPN +282 R	5'-: gTgAgACTCATCAgACTggTgAgAA`-3
OPN +282 S	5'-: TAATTTTCAGACCCTTCCAAg -3
OPN +750 B	5'- :ATggCTgTggAATTCACgg -3`
OPN +750 S	5'- :TgAAACCCACAgCCACAAg -3`
OPN +1083 F	5'-: CATgAATTAgATAgTgCATCTTCTgAgg -3`
OPN +1239 A	5'-: TgTTATATTCTCTTTTTAAgTgggTA -3`
OPN +1239 S	5'-: gTCTATgTTCATTCTATAgAAgAAATgC -3`

### 5.1.7.3. Testdurchführung

Um für jeden der neun Polymorphismen eine spezifische *Real-Time PCR* mit paralleler Fluoreszenzmessung, und somit eine genaue Identifizierung der SNPs zu gewährleisten, mussten alle Primer- und Sondenpaaren getestet werden. Ziel war es, diejenige Kombination von Primern und Sonden zu finden, die eindeutige Schmelzkurven generierten und somit einem spezifischen Genotyp (Wildtyp, heterozygoter Typ, Mutante) zuzuordnen waren. Hierzu wurde in die von der Firma Roche hergestellten Kapillaren für den LightCycler 480 für 15 Proben je Probe 1µl Genotyping Master-Mix, 0,25µl für je einen auszutestenden Primer, 0,25µl der Sensor- und 0,25µl der Ankersonde, 3,125µl destilliertes Wasser pro Probe pipettiert und 15 verschiedene DNA Proben der Studienpopulation von je 0,5µl hinzugefügt und gemischt. Zur Qualitätssicherung wurde zusätzlich eine Negativkontrolle ohne

DNA beigefügt. Die Kapillaren wurden dann im Rotor des LightCycler® Instruments platziert. Die Annealing-Temperatur der Sonden und Primer musste manuell eingestellt und ebenfalls ausgetestet werden. Für die Analyse wurde das Programm mit den in der Tabelle 5.5. aufgelisteten Parametern gewählt und daraufhin der Lauf gestartet. Die PCR und Schmelzkurvenanalyse wurden im LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Auf die 15-minütige Anfangsdenaturierung bei 95 °C, folgten 45 Amplifikationszyklen in 35 Sekunden mit ausgetesteter Primertemperatur und schließlich die Schmelzkurvenanalyse bei kontinuierlich ansteigender Temperatur.

Nach dem Lauf konnten die PCR Produkte in den Kapillaren bei -20 °C für die spätere Weiterverarbeitung eingefroren werden.

PCR-Schritt	Temperatur	Zyklendauer/Zykluszahl
Inkubation	95 °C	1 00:10:00
Amplifizierung	95 °C 56 °C-60 °C 72 °C	45 00:00:10 00:00:10 00:00:15
Schmelzkurvenanalyse	95 °C 40 °C 80 °C	1 00:01:00 00:00:30 Continuous
Abkühlung	40 °C	1 00:00:30

**Tab. 5.5.:** Angewandte PCR-Bedingungen, Anzahl und Dauer der Zyklen, sowie der Primertemperatur.

#### 5.1.7.4. Testauswertung

Zur Visualisierung und Auswertung der Schmelzkurven wurde die LightCycler®-Software (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Proben wurden in drei Kategorien, homozygoter Wildtyp, heterozygoter und homozygoter Träger der Mutation eingeteilt. War eine Schmelzkurve nicht eindeutig einem Genotypen zuzuordnen, wurde die Probe erneut analysiert.

Die Bestimmung der Schmelzpunkte wurde mit dem Programmabschnitt *Melting curve* analysiert. Dabei wurde der digitale Filter aktiviert. Die Berechnung erfolgte anhand der polynomialen Kalkulationsmethode. Die *Melting-Peaks* wurden mit dem Programm *Melting Peaks* analysiert.

Für jeden der neun Polymorphismen wurde ein bestimmtes Primerpaar mit dazugehörigem Sondenpaar bei einer bestimmten *Annealing*-Temperatur ermittelt. Bei den SNPs OPN-156 und OPN+1083 waren asymmetrisch ablaufende PCR-

Ansätze notwendig. Eine asymmetrische Polymerasekettenreaktion dient als Optimierungsstrategie. Durch Konzentrationssenkung des *Forward*- bzw. Erhöhung des *Reverse-Primers*, wird der Strang der DNA, an den die Sonde bindet, bevorzugt synthetisiert.

Mit dieser Kombination von Primern und Sonden erhielt man definierte Schmelzkurven und *Melting-Peaks* für jeden Polymorphismus. Diese waren eindeutig einem bestimmten Genotyp zuzuordnen.

**Tab. 5.6.:** Ergebnisse der Austestungen:

	Forward Primer	Revers Primer	Sonden-Paar	Annealing	Primer-Asymmetrie
OPN T-66G	156 F	66 R	66 (Ankor+Sensor)	60 °C	
OPN delG-156	156 F	66 A	156 (Ankor+Sensor)	60 °C	1:5
OPN T+282C	282 S	282 R	282 (Ankor+Sensor)	57 °C	
OPN T-443C	616 F	443 Bm	443 (Ankor+Sensor)	56 °C	
OPN T-616G	616 S	443 Bm	616 (Ankor+Sensor)	56 °C	
OPN T+750C	750 S	750 B	750 (Ankor+Sensor)	58 °C	
OPN A+1083G	1083 F	1239 A	1083 (Ankor+Sensor)	58 °C	5:1
OPNA+1239C	1239 S	1239 A	1239 (Ankor+Sensor)	58 °C	
OPN A-1748G	1748 F	1748 R	1748 (Ankor+Sensor)	59 °C	

Die Genotypisierung erfolgte durch das Programm *Genotyping*. Hierbei werden die Kurven automatisch ausgewertet und zu Genotypen, abhängig vom Verlauf der Schmelzkurve, gruppiert. Dabei werden unbekannte Gruppen mit Standards verglichen und Negativ-, wie Positiv-Proben können definiert werden. Die Genauigkeit hängt von der Auflösung der Schmelzkurven und diese wiederum von der Menge der akquirierten Daten pro °C Temperaturerhöhung ab.

### 5.1.8. Effizienz der PCR

Die Zuverlässigkeit der ausgetesteten Primer, Sonden und PCR-Produkte am LightCycler wurde mit einer PCR mittels ThermoCycler (Thermal Cycler DNA Engine, Peltier, DYAD™) und einer anschließenden Agarosegel-Elektrophorese untersucht.

#### 5.1.8.1. PCR mittels ThermoCycler

Das Prinzip der PCR mittels ThermoCycler (Thermal Cycler DNA Engine, Peltier, DYAD™) entspricht dem der PCR durch den LightCycler (Roche). Der Unterschied besteht darin, dass sich bei der Polymerasekettenreaktion durch den ThermoCycler der PCR-Ansatz und die Bedingungen verschieden gestalten. Außerdem sind keine Sonden enthalten. Der PCR-Ansatz setzte sich aus einem PCR-Puffer (15mM MgCl<sub>2</sub>,

Quiagen), einem der vier Deoxynukleotidtriphosphaten (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Sigma), der Hot Start Taq-DNA-Polymerase (Qiagen), destilliertem Wasser (aqua ad injectabilia, Braun) zur Einstellung des Gesamtvolumens, sowie der als Matrize dienenden Ausgangs-DNA zusammen. Das *Primer-Annealing* wird in einem Temperaturbereich von 50-70 °C getestet.

### **5.1.8.2. Agarosegelelektrophorese**

Die hergestellten PCR-Produkte mittels ThermoCycler wurden in eine Agarosegel-Elektrophorese überführt. Die Agarosegelelektrophorese dient zur horizontalen Auftrennung von Doppelstrang-DNA-Fragmenten nach ihrer Größe innerhalb eines elektrischen Feldes. Die verschiedenen langen DNA-Fragmente wandern durch die Gelporen des Agarosegels. Das Gel wird horizontal in eine Kammer mit einer Pufferlösung platziert, an die ein Spannungsfeld angelegt wird. Die negativ geladenen Nukleinsäuren bewegen sich dabei zu der positiv geladenen Anode. Da kleinere Fragmente schneller durch die Poren laufen, kann, durch Vergleich mit einem Molekulargewichtsstandard, die Größe ermittelt und die Konzentration abgeschätzt werden. Sichtbar werden die Banden durch Interkalation des in UV-Licht orange fluoreszierenden Farbstoffs Ethidiumbromid, der an die DNA bindet. Der Farbstoff wird zur Gellösung und/oder zum Laufpuffer zugegeben. Verwendet wurden 2%tige Agarosekonzentrationen. Die entsprechende Menge Agarose (Typ I-A, Sigma) wurde in 200ml oder 250ml 1×TBE-Puffer (10X TBE: 890mM Tris, 890mM Borsäure, 20mM Edta pH8) durch Kochen in einem Mikrowellenofen vollständig gelöst. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von Ethidiumbromid (Sigma) in einer Menge von 4µl. Die vermischte Gellösung wurde in einen Gelschlitten (15×25cm) mit vier Gelkämmen gegossen. Nach Erstarrung der Agarose wurden die Kämmen vorsichtig herausgezogen. Auf diese Weise entstand ein Gel mit Taschen. Der Gelträger wurde in die mit Laufpuffer (1×TBE-Puffer mit 0,3 Ethidiumbromid) gefüllte Gelkammer gestellt und die DNA-Proben, mit  $\frac{1}{4}$  Volumen Auftragspuffer gemischt, aufgebracht. Zusätzlich wurden in die Geltaschen am Rand 15µl eines DNA-Leiters (100bp DNA-Ladder, Cambrex) als Größenstandard pipettiert. Der Lauf erfolgte bei 120 Volt für zwei Stunden. Zum Schluss wurde das Gel auf dem UV-Transilluminator betrachtet und fotografiert. Die Agarosegelelektrophorese wird zur Auftrennung der DNA-Fragmente und zur Kontrolle einer erfolgreichen Amplifikation in der PCR für die Sequenzierung der Kontrollproben verwendet

### **5.1.9. Reinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung**

Die PCR-Produkte, die mittels des ThermoCyclers für die Sequenzierung hergestellt worden sind, wurden mit Hilfe eines kommerziellen Kits (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) gereinigt. Mit Hilfe dieser Purifikation können die nicht eingebauten Primer, Primerdimere, sowie andere Reagenzien aus der PCR effizient entfernt werden. Für diesen Vorgang wurden die PCR-Produkte in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 5 Volumen des im Kit erhaltenen Bindungspuffers PB versetzt. Nach sorgfältigem Mischen wurde die Lösung auf die dafür vorgesehene Säule aufgetragen und für 1 Minute bei 13000rpm zentrifugiert. Die in der Lösung erhaltene DNA heftete sich hierbei an die Silica-Gel-Matrix der Säule. Zum Waschen wurden 750µl Puffer PE auf die Säule pipettiert, für 1 Minute bei 13000rpm zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Um möglichst alle Reste des ethanolhaltigen Puffers PE zu beseitigen, wurde ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt für 1 Minute bei 13000rpm durchgeführt. Zur Elution der DNA wurde die Säule in ein neues Gefäß platziert und es wurden 40-60µl Elutionspuffer EB direkt auf die Membran der Säule aufgetragen. Nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur, erfolgte eine Zentrifugation für 3 Minuten bei 13000rpm. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde das Filtrat anschließend erneut auf die Säule aufgetragen und die Zentrifugation wiederholt. Die so gewonnenen PCR-Produkte wurden durch ein kommerzielles Sequenzierungsunternehmen sequenziert (*SEQUISERVE, Dr. Willi Metzger*).

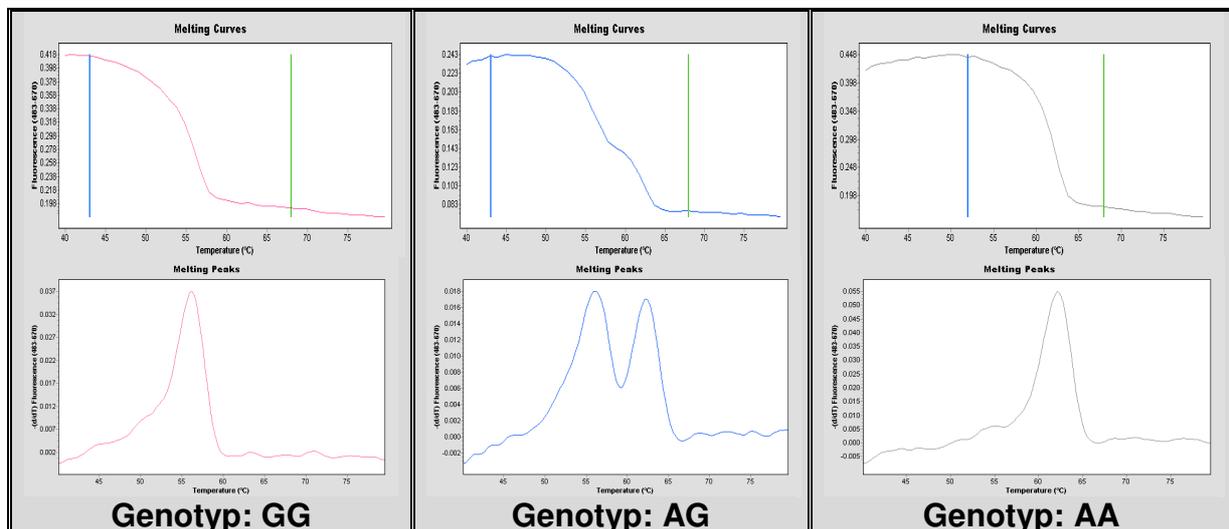
Nach Bestätigung der Genotypen durch die Sequenzierung, diente die gesamte genomische DNA der Studienpopulation als Ausgangsmaterial. Diese wurde mittels des LightCyclers (Roche) anhand *Real-Time PCR* und Genotypisierung verifiziert. Insgesamt wurden neun Polymorphismen des humanen OPN- Gens in der Studienpopulation untersucht. Im Einzelnen sind dies OPN A-1748G:rs2728127, OPN T-616G:rs2853744, OPN T-443C:rs11730582, OPN delG-156:rs11439060, OPN T-66G:rs28357094, OPN T+282C:rs4754, OPN T+750C:rs1126616, OPN A+1083G:rs1126772 und OPN A+1239C:rs9138.

### **5.1.10. Nachweis der Basenvariationen in den OPN- Polymorphismen**

#### **5.1.10.1. Nachweis der Basenvariation für OPN A-1748G: rs2728127**

Bei diesem Polymorphismus liegt ein Basenaustausch A/G vor. Um diesen nachzuweisen, bindet die hinzugefügte Sonde Allel-A spezifisch. Am Ende der Schmelzkurvenanalyse erhielt man für die drei möglichen Genotypen (AA; AG; GG) drei differente *Melting-Peaks* mit dazugehöriger Schmelzkurve. Der *Melting-Peak* bei

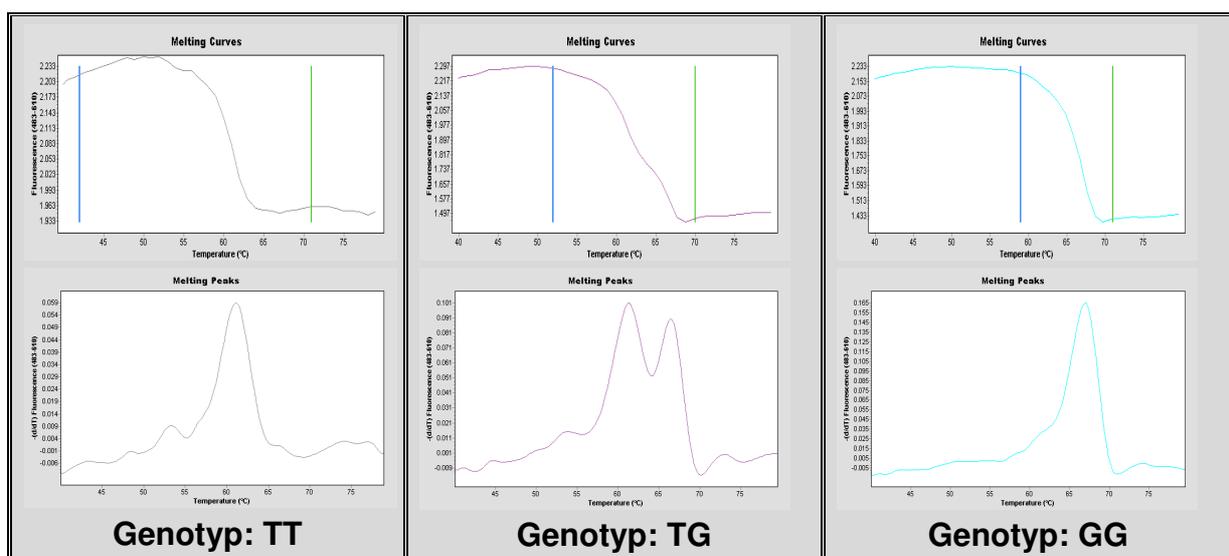
höherer Temperatur zeigt, durch die Allel-spezifische Bindung der Sonde, den Genotyp AA an. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei dem Peak bei niedriger Temperatur um den homozygoten Genotyp GG, und somit um einen Basenaustausch. Der heterozygote Genotyp wird durch die zwei homozygoten Peaks beschrieben.



**Abb. 5.1.:** Die drei verschiedenen Genotypen für den Polymorphismus OPN A-1748G. Dargestellt sind der mutierte homozygote Genotyp GG, der heterozygote Genotyp AG und der homozygote Genotyp AA (=Wildtyp) mit jeweils zugehörig temperaturabhängigen Schmelzkurven und Melting-Peaks.

### 5.1.10.2. Nachweis der Basenvariation für OPN T-616G: rs2853744

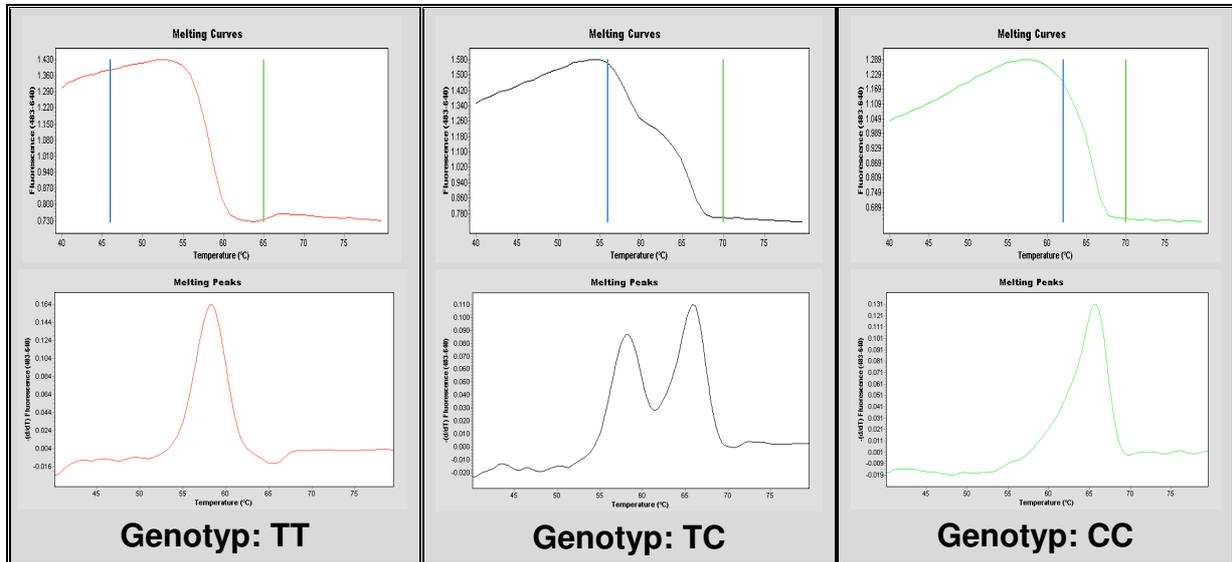
Bei dem SNP OPN T-616G wurde, um die Basenvariation festzustellen, eine G-Allel spezifische Sonde verwendet. Auch hier erhielt man zu den drei möglichen Genotypen (TT; TG; GG) drei zugehörige *Melting Peaks* mit Schmelzkurve.



**Abb. 5.2.:** Die drei verschiedenen Genotypen für den Polymorphismus OPN T-616G. Dargestellt sind der homozygote Genotyp TT (=Wildtyp), der heterozygote Genotyp TG und der homozygot mutierte Genotyp GG mit jeweils zugehörig temperaturabhängigen Schmelzkurven und Melting-Peaks.

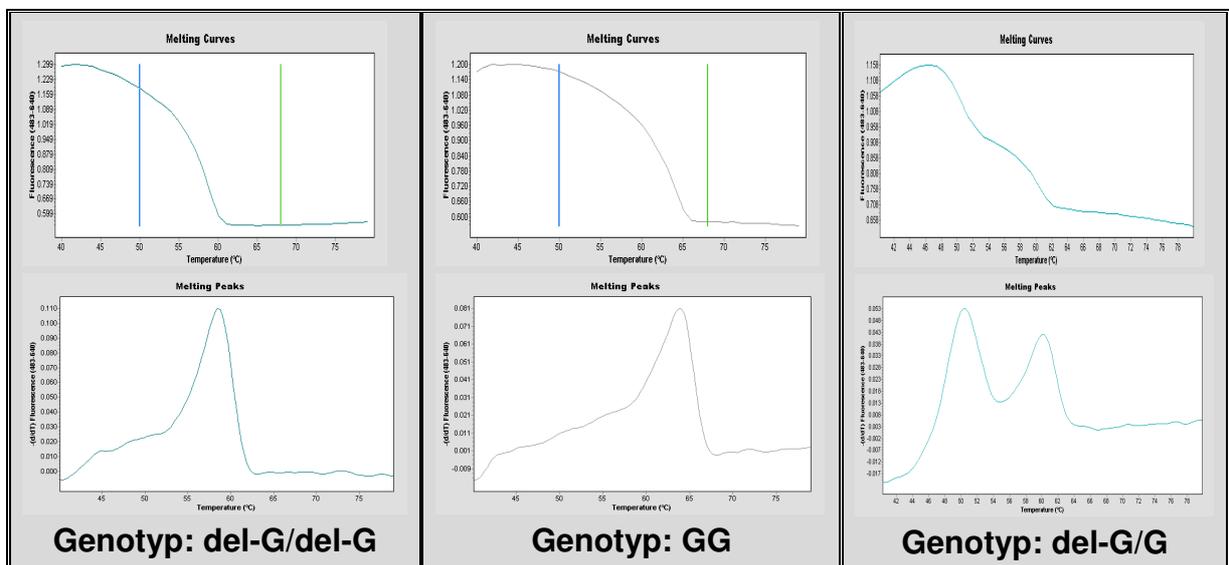
### 5.1.10.3. Nachweis der Basenvariation für OPN T-443C: rs11730582

Um den Basenaustausch T/C innerhalb des Osteopontin-Polymorphismus T-443C festzustellen, kam eine C-Allel spezifische Sonde zum Einsatz. Die erhaltenen *Melting Peaks* mit Schmelzkurve spiegeln die drei Genotypen TT, TC und CC wider.



**Abb. 5.3.:** Die drei verschiedenen Genotypen für den Polymorphismus OPN T-443C. Dargestellt sind der homozygote Genotyp TT (=Wildtyp), der heterozygote Genotyp TC und der homozygot mutierte Genotyp CC mit jeweils zugehörig temperaturabhängigen Schmelzkurven und Melting-Peaks.

### 5.1.10.4. Nachweis der Basenvariation für OPN delG-156: rs11439060

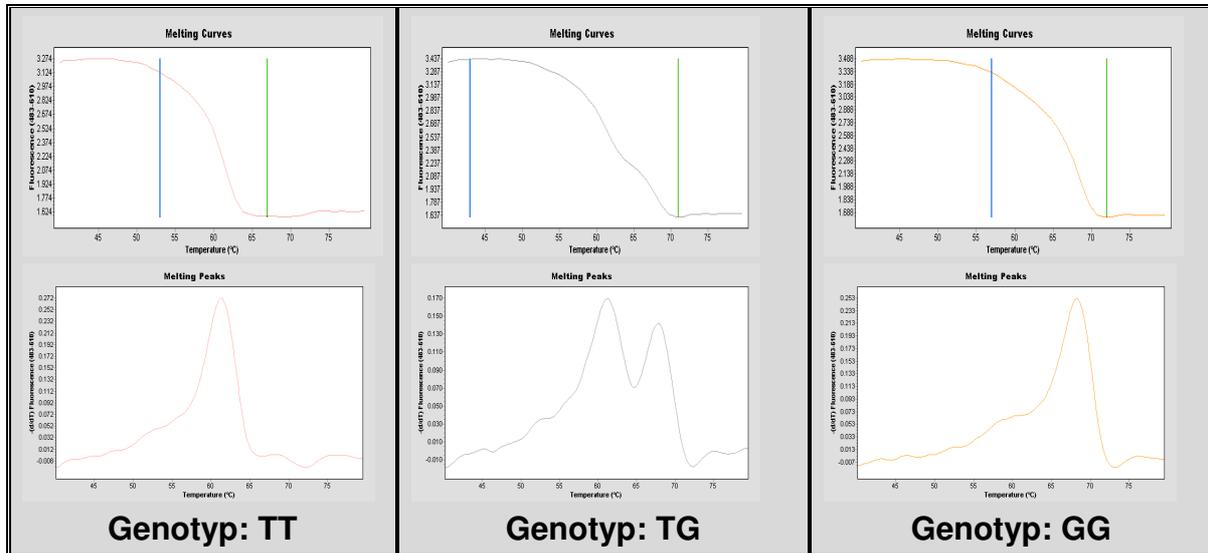


**Abb. 5.4.:** Die drei verschiedenen Genotypen für den Polymorphismus OPN delG-156. Dargestellt sind der homozygote Genotyp del-G/del-G (=Wildtyp), der heterozygote Genotyp del-G/G und der homozygot mutierte Genotyp GG mit jeweils zugehörig temperaturabhängigen Schmelzkurven und Melting-Peaks.

Bei diesem Deletionspolymorphismus bindet die verwendete Sonde G-Allel spezifisch. Wenn das Allel G vorhanden ist, erhält man aufgrund der spezifischen Bindung einen *Melting Peak* bei höherer Temperatur. Bei niedrigerer

Temperaturangabe wird das Allel delG angezeigt. Der heterozygote Genotyp ergibt sich aus den beiden *Melting Peaks* für das jeweils homozygote Allel.

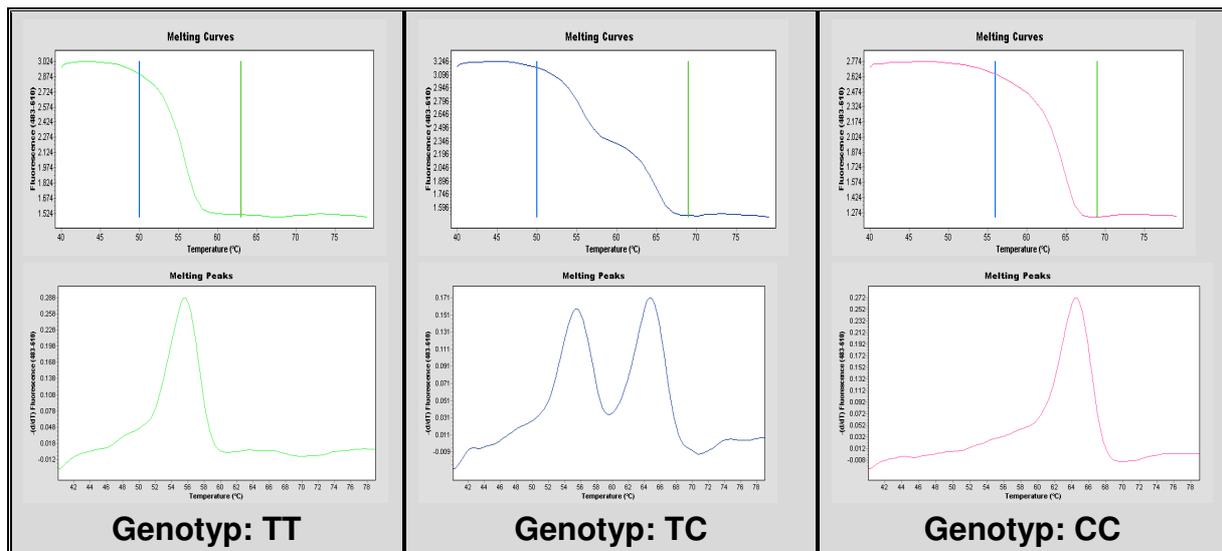
### 5.1.10.5. Nachweis der Basenvariation für OPN T-66G: rs28357094



**Abb. 5.5.:** Die drei verschiedenen Genotypen für den Polymorphismus OPN T-66G. Dargestellt sind der homozygote Genotyp TT (=Wildtyp), der heterozygote Genotyp TG und der homozygot mutierte Genotyp GG mit jeweils zugehörig temperaturabhängigen Schmelzkurven und Melting-Peaks.

Der SNP OPNT-66G kann zu einem Basenaustausch T/G führen. Dieser wurde durch eine G-spezifische Sonde nachgewiesen. Es ergaben sich für die drei möglichen Genotypen (TT, TG, GG) drei *Melting Peaks* mit zugehöriger Schmelzkurve.

### 5.1.10.6. Nachweis der Basenvariationen für OPN T+282C: rs4754

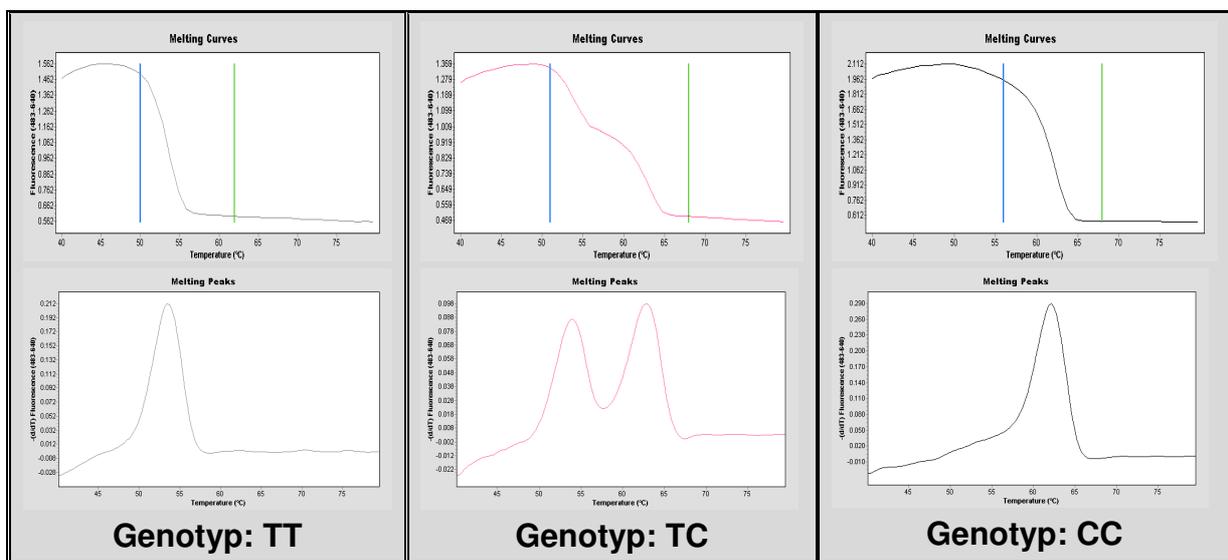


**Abb. 5.6.:** Die drei verschiedenen Genotypen für den Polymorphismus OPN T+282C. Dargestellt sind der homozygote Genotyp TT (=Wildtyp), der heterozygote Genotyp TC und der homozygot mutierte Genotyp CC mit jeweils zugehörig temperaturabhängigen Schmelzkurven und Melting-Peaks.

Nach dem Prinzip der Messung der Abschmelztemperatur, wurde für den Polymorphismus OPN T+282C eine Allel-C spezifische Sonde verwendet. Es ergab sich wiederum für jeden Genotyp ein über die Abschmelztemperatur zugehöriger *Melting Peak* mit Schmelzkurve.

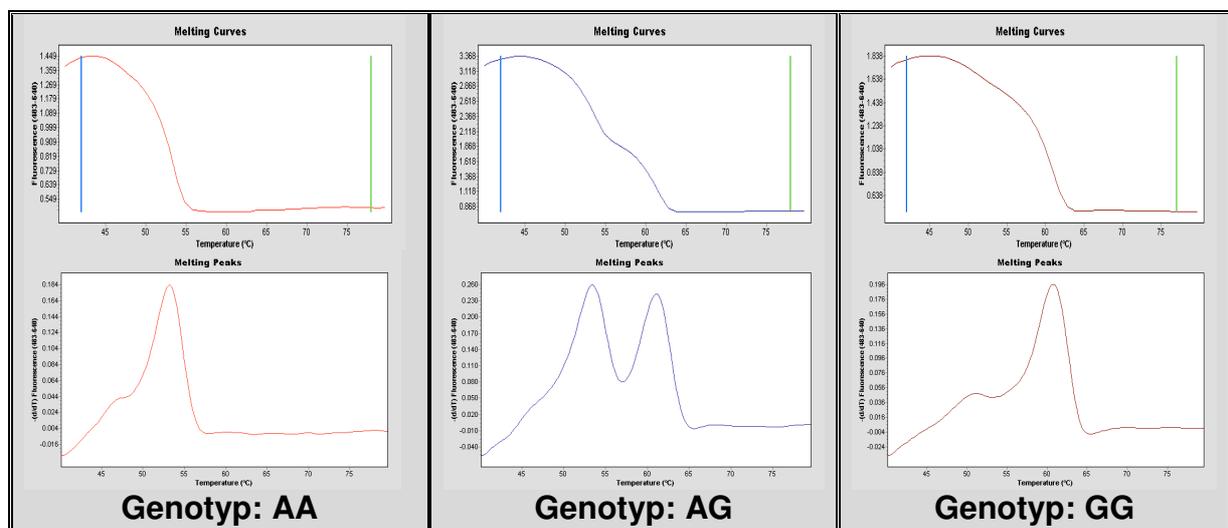
### 5.1.10.7. Nachweis der Basenvariation für OPN T+750C: rs1126616

Für den Polymorphismus OPN T+750C wurde, um den Basenaustausch T/C nachzuweisen, ebenfalls eine C-spezifische Sonde zu der PCR-Amplifikation hinzugefügt. Es ergaben sich über die Abschmelztemperatur der Sonde erneut drei spezifische *Melting Peaks* mit den zugehörigen Schmelzkurven.



**Abb. 5.7.:** Die drei verschiedenen Genotypen für den Polymorphismus OPN T+750C. Dargestellt sind der homozygote Genotyp TT (=Wildtyp), der heterozygote Genotyp TC und der homozygot mutierte Genotyp CC mit jeweils zugehörig temperaturabhängigen Schmelzkurven und Melting-Peaks.

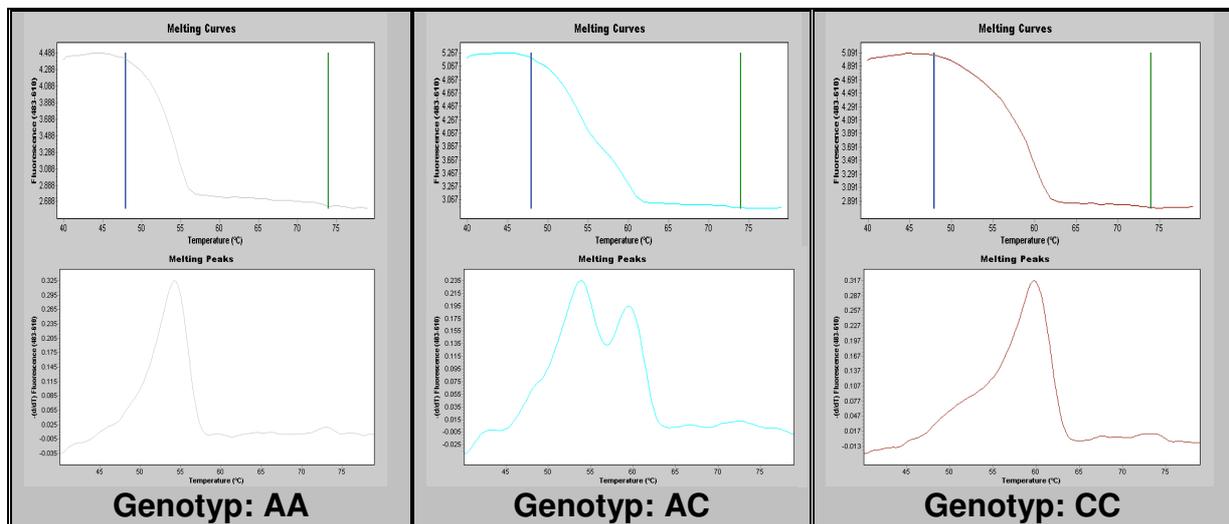
### 5.1.10.8. Nachweis der Basenvariation für OPN A+1083G: rs11226772



**Abb. 5.8.:** Die drei verschiedenen Genotypen für den Polymorphismus OPN A+1083G. Dargestellt sind der homozygote Genotyp AA (=Wildtyp), der heterozygote Genotyp AG und der homozygot mutierte Genotyp GG mit jeweils zugehörig temperaturabhängigen Schmelzkurven und Melting-Peaks.

Um den Basenaustausch (A/G) für den SNP des Osteopontingens A+1083G nachzuweisen, wurde eine G-Allel spezifisch bindende Sonde benutzt. Als Ergebnis zeigten sich drei differente *Melting Peaks* mit den zugehörigen Schmelzkurven für die Genotypen AA, AG, GG.

### 5.1.10.9. Nachweis der Basenvariation für OPN A+1239C: rs9138



**Abb. 5.9.:** Die drei verschiedenen Genotypen für den Polymorphismus OPN A+1239C. Dargestellt sind der homozygote Genotyp AA (=Wildtyp), der heterozygote Genotyp AC und der homozygot mutierte Genotyp CC mit jeweils zugehörig temperaturabhängigen Schmelzkurven und Melting-Peaks.

Bei diesem Polymorphismus handelt es sich um einen Basenaustausch A/C. Um diesen nachweisen zu können, wurde eine C-spezifische Sonde verwendet. Auch hier erhielt man für die drei möglichen Genotypen (AA; AC; CC) drei verschiedene Schmelzkurven und die dazugehörigen *Melting-Peaks*.

## 5.2. STATISTISCHE ANALYSE

Die Verteilung der Genotyp- und Allelfrequenzen in jeder Testgruppe, im vorliegenden Fall in der Kontrollgruppe, sowie in der Patientengruppe, wird mit den bei Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes erwarteten Frequenzen verglichen. Die Allel- und Genotypfrequenzen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe werden mit Hilfe des Chi-Quadrat ( $\chi^2$ )-Testes und des Fisher's-Exact-Tests verglichen. Die Odds-ratio wurde mit 95%-Konfidenzintervall bestimmt. Die Signifikanz wurde für alle Tests auf 5% festgelegt ( $p < 0.05$ ).

Für die Bestimmung der Kopplungsgleichgewichte wird ein von Günter Brännler, Labor für Immungenetik, Kinderklinik und Kinderpoliklinik, LMU München, entwickeltes Statistikanalyseprogramm verwendet.

## **6. ERGEBNISSE**

### **6.1. VORBEMERKUNG**

Bei den untersuchten Polymorphismen des Osteopontingens, das eine Rolle in der Vermittlung der Immunantwort bei Entzündungsgeschehen besitzt, handelt es sich um acht Einzelnukleotidpolymorphismen und einen Deletionspolymorphismus. Für jeden Polymorphismus wurden in der Literatur jeweils zwei beteiligte Allele beschrieben. Mittels der PCR in Kombination mit Hybridisierung, Schmelzkurvenanalyse und Genotypisierung, konnte jedem Individuum der Studienpopulation einer der drei möglichen Genotypen des jeweiligen SNPs eindeutig zugeordnet werden.

Innerhalb der Patientengruppen und der Kontrollgruppe wurden Berechnungen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes für alle 9 Polymorphismen durchgeführt. Dies ließ den Schluss zu, dass sich die Studienpopulation, aus Patienten und Kontrollindividuen, im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befand, und somit systematische Fehler bei der Zusammenstellung der Studienpopulation, sowie bei der Typisierung auszuschließen sind.

Die Allel- und Genotypfrequenzen innerhalb der Patientengruppen mit dem Krankheitsbild der chronischen Parodontitis wurden mit den Frequenzen in der Kontrollgruppe verglichen. Zusätzlich stellte man die Allel- und Genotypfrequenzen in der Kontrollgruppe Daten in anderen Normalpopulationen gegenüber, um die Plausibilität der eigenen Daten zu prüfen und zu sichern. Die Ergebnisse der Genotypisierung wurden mittels Sequenzierung von Stichproben jedes möglichen Genotyps bestätigt.

### **6.2. CHARAKTERISTIKA DER STUDIENPOPULATION**

Die Studienpopulation bestand insgesamt aus 1195 mitteleuropäischen Kaukasiern. Sie setzte sich aus 402 Proben für die Untersuchungsgruppe der Parodontitispatienten (P-Proben) und aus 793 Proben von gesunden Probanden der Kontrollgruppe (B-Proben) zusammen. In der Untersuchungsgruppe befanden sich 204 weibliche und 184 männliche Patienten, während in der Kontrollgruppe 524 Männer und 254 Frauen waren. Der Altersdurchschnitt beider Gruppen lag bei 47 (P-Proben) bzw. 54 Jahren (B-Proben). Die Patientengruppe zählte 116 Raucher und 252 Nichtraucher. In der Kontrollgruppe betrug die Verteilung 96 zu 685. Bei

insgesamt 36 Proben fehlten die Angaben zum Rauchverhalten. Bei 19 Proben der Studienpopulation waren keine Daten zum Geschlecht der Blutspender vorhanden.

	Kontrollgruppe	Patientengruppe
Anzahl gesamt	793	402
Männer	524	184
Frauen	254	204
Keine Angaben zum Geschlecht	15	14
Altersdurchschnitt	47 Jahre	54 Jahre
Maximum	68 Jahre	84 Jahre
Minimum	31 Jahre	18 Jahre
Raucher	96	116
Nichtraucher	685	252
Keine Angaben zum Rauchverhalten	12	34

**Tab. 6.1.:** Charakteristika der Studienpopulation.

Kontrollgruppe	Patientengruppe
B22, B65, B82, B246, B397, B406, B412, B460, B465, B473, B553, B599, B614, B679, B686	P24, P50, P126, P127, P128, P130, P131, P147, P290, P291, P292, P293, P294, P295

**Tab. 6.2.:** Proben ohne Daten zum Geschlecht.

Kontrollgruppe	Patientengruppe
B65, B82, B246, B397, B406, B412, B460, B465, B473, B614, B679, B686	P10, P24, P49, P88, P92, P126, P127, P129, P131, P147, P283, P284, P285, P286, P287, P288, P289, P290, P291, P292, P293, P294, P295, P296, P297, P298, P299, P300, P319, P320, P321, P322, P323, P324

**Tab. 6.3.:** Proben ohne Angaben zum Rauchverhalten.

### 6.3. AUSGESCHLOSSENE PROBEN

Mehrere Proben zeigten auch nach Versuchswiederholung kein Ergebnis. In der Patientengruppe konnten bei den einzelnen Polymorphismen zwischen 5 und 11 Proben nicht genotypisiert werden, was einer Ausfallrate von 1,24% bis 2,74% entspricht. Bei der Kontrollgruppe waren zwischen 12 und 17 Proben ohne Ergebnis, entsprechend einer Ausfallrate von 1,51% bis 2,14%.

Für die statistische Auswertung der Patientengruppe standen nach Versuchswiederholung 397 Proben zur Verfügung, die sich auf 252 Nichtraucher und 116 Raucher, sowie 184 Männer und 204 Frauen aufteilten. Bei der Kontrollgruppe verblieben 781 Proben, von denen 96 Raucher und 685 Nichtraucher, sowie 525 Männer und 254 Frauen waren.

SNP	Kontrollgruppe	Patientengruppe
OPN A-1748G: rs2728127	B22, B65, B82, B246, B387, B397, B404, B404, B412, B441, B460, B465, B473, B676	P81, P125, P126, P288, P333
OPN T-616G: rs2853744	B22, B65, B82, B387, B397, B403, B404, B412, B441, B446, B460, B465, B473, B676, B685, B692, B778	P81, P125, P126, P288, P333
OPN T-443C: rs11730582	B22, B65, B82, B387, B397, B403, B404, B406, B412, B441, B460, B465, B473, B613, B614, B676, B692	P81, P125, P126, P276, P283, P288, P333
OPN delG-156: rs11439069	B22, B65, B82, B387, B397, B403, B404, B412, B441, B460, B465, B473, B613, B676, B692	P81, P125, P126, P288, P333
OPN T-66G: rs28357094	B22, B65, B82, B387, B397, B403, B404, B412, B441, B460, B465, B473	P81, P125, P126, P288, P333
OPN T+282C: rs4754	B22, B65, B82, B387, B397, B403, B404, B406, B412, B441, B460, B465, B473, B614, B692	P81, P125, P126, P288, P333
OPN T+750C: rs1126616	B22, B65, B82, B246, B387, B397, B403, B404, B412, B441, B460, B465, B473, B692	P81, P125, P126, P288, P333
OPN A+1083G: rs1126772	B22, B65, B82, B387, B397, B403, B404, B412, B441, B460, B465, B473	P81, P125, P126, P275, P280, P283, P288, P333, P358, P367, P402
OPN A+1239C: rs9138	B22, B65, B82, B246, B387, B397, B403, B404, B412, B441, B460, B465, B473, B676, B692	P81, P125, P126, P288, P333

Tab. 6.4.: Ausgeschlossene Proben.

	Kontrollgruppe	Patientengruppe
Anzahl gesamt	793	402
Anzahl verbleibend	781	397
Männer	524	184
Frauen	254	204
Raucher	96	116
Nichtraucher	685	252

Tab. 6.5.: Für die Auswertung herangezogene Probenzahl.

## 6.4. POLYMORPHISMEN DES OSTEOPONTINGENS IN DER STUDIENPOPULATION

### 6.4.1. Der Polymorphismus OPN A-1748G: rs2728127

Mittels der PCR in Kombination mit Hybridisierung, Schmelzkurvenanalyse und Genotypisierung, waren innerhalb der Patientengruppe und der Kontrollgruppe die

drei möglichen Genotypen (AG, AA, GG) für diesen Polymorphismus zu finden. So ergaben sich drei verschiedene Schmelzkurven, eine je Genotyp.

Die Allel- und Genotypfrequenzen setzen sich in den beiden Studienpopulationen für den Polymorphismus OPN A-1748G wie folgt zusammen:

	Genotypfrequenz			Allelfrequenz	
	AA	AG	GG	A	G
Patienten	48,9% N=194	41,1% N=163	10% N=40	69,46 N=551	30,6% N=243
Kontrollen	46,98% N=366	45,19% N=352	7,83% N=61	69,58% N=1084	30,42% N=474

**Tab 6.6.:** Prozentuale Verteilung der Genotypen und der Allele G und A in der Studienpopulation.

Der Vergleich zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe ergibt keine signifikanten Unterschiede in der Genotyp- und der Allelfrequenz. Die Signifikanzberechnung ( $p=0,93$ ) und das relative Risiko (odds ratio=0,99) zeigen ebenfalls keine Assoziation des Polymorphismus mit dem Krankheitsbild der chronischen Parodontitis auf.

#### 6.4.2. Der Polymorphismus OPN T-616G: rs2853744

Auch bei diesem Polymorphismus zeigten sich in den beiden Studienpopulationen drei zugehörigen Genotypen (TG, GG, TT).

Der Vergleich der Genotypfrequenz und der Allelfrequenz innerhalb der Studienpopulation weist keine signifikanten Unterschiede auf.

	Genotypfrequenz			Allelfrequenz	
	TT	TG	GG	T	G
Patienten	0,75% N=3	16,88% N=67	82,37% N=327	9,19% N=73	90,81% N=721
Kontrollen	0,13% N=1	15,85% N=123	84,02% N=652	8,05% N=125	91,95% N=1427

**Tab. 6.7.:** Prozentuale Verteilung der Genotypen und der Allele T und G in der Studienpopulation.

Auch die Berechnung der Signifikanz ( $p=0,35$ ) und des relativen Risikos (odds ratio=0,87) zeigen keine Auffälligkeiten.

### 6.4.3. Der Polymorphismus OPN T-443C: rs11730582

Auch dieser Polymorphismus weist keine Assoziation zur chronischen Parodontitis auf, da bei diesem Basenaustausch ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Studienpopulationen zu beobachten sind.

	Genotypfrequenz			Allelfrequenz	
	TT	TC	CC	T	C
Patienten	26,84% N=106	52,15% N=206	21,01% N=83	52,91% N=418	47,09% N=372
Kontrollen	26,03% N=202	52,45% N=407	21,52% N=167	52,26% N=811	47,74% N=741

**Tab. 6.8.:** Prozentuale Verteilung der Genotypen und der Allele T und C in der Studienpopulation.

Es sind keine Verteilungsunterschiede der Genotypen und der Allele vorhanden. Die Berechnung der Signifikanz ( $p=0,79$ ) und des relativen Risikos (odds ratio=0,97) untermauern dieses Ergebnis.

### 6.4.4. Der Polymorphismus OPN delG-156: rs11439060

Bei dem einzigen Deletionspolymorphismus setzt sich die Genotyp- und die Allelfrequenzverteilung nach der PCR mit Hybridisierung, Schmelzkurvenanalyse und anschließender Genotypisierung wie folgt zusammen:

	Genotypfrequenz			Allelfrequenz	
	delG/delG	delG/G	G/G	delG	G
Patienten	52,65% N=209	39,04% N=155	8,31% N=33	72,17% N=573	27,83% N=221
Kontrollen	49,36% N=384	42,29% N=329	8,35% N=65	70,5% N=1097	29,5% N=459

**Tab. 6.9.:** Prozentuale Verteilung der Genotypen und der Allele delG und G in der Studienpopulation.

Der Vergleich zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe ergibt keinerlei signifikante Unterschiede und Abweichungen in der Genotyp- und der Allelfrequenz, das sich auch in der graphischen Darstellung widerspiegelt. Zusätzlich ergibt sich keine Signifikanz ( $p=0,14$ ) und kein relatives Risiko (odds ratio=0,92) für diesen Polymorphismus.

#### 6.4.5. Der Polymorphismus OPN T-66G: rs28357094

	Genotypfrequenz			Allelfrequenz	
	TT	TG	GG	T	G
Patienten	61,46% N=244	33,25% N=132	5,29% N=21	78,09% N=620	21,91% N=174
Kontrollen	63,25% N=494	31,63% N=247	5,12% N=40	70,5% N=1235	20,9% N=327

**Tab. 6.10.:** Prozentuale Verteilung der Genotypen und der Allele T und G in der Studienpopulation.

Anhand der Genotyp- und Allelverteilung in Bezug auf den SNP OPN T-66G, lassen sich auch bei diesem Basenaustausch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Studienpopulationen finden.

Die Signifikanzberechnung ( $p=0,6$ ) und das relative Risiko (odds ratio=0,94) unterstützen diese Aussage.

#### 6.4.6. Der Polymorphismus OPN T+282C: rs4754

	Genotypfrequenz			Allelfrequenz	
	TT	TC	CC	T	C
Patienten	47,86% N=190	43,32% N=172	8,82% N=35	69,52% N=552	30,48% N=242
Kontrollen	43,45% N=338	39,97% N=311	16,58% N=129	63,43% N=987	36,57% N=569

**Tab. 6.11.:** Prozentuale Verteilung der Genotypen und der Allele T und C in der Studienpopulation: Deutlich wird der geringere Anteil des homozygoten Genotyps CC in der Patientengruppe und das häufigere Vorkommen des Allel C innerhalb der Kontrollgruppe.

Bei diesem Polymorphismus innerhalb des Exonbereiches beträgt der Anteil des homozygoten Genotyps CC innerhalb der Patientengruppe nur die Hälfte des Anteils innerhalb der Kontrollgruppe, wodurch sich ein Rückschluss einer Assoziation des Genotypen CC mit der chronischen Parodontitis ergibt. Mit der genetischen Ausstattung des Genotyps CC des Polymorphismus OPN T+282C besteht nur ein halb so hohes Risiko, an einer chronischen Parodontitis zu erkranken. Diesen Schluss unterstützten auch die Signifikanzberechnung ( $p=0,0033$ ) und das erhöhte relative Risiko (odds ratio=1,3). Das Allel C ist in der Kontrollgruppe stärker vertreten als in der Patientengruppe. Diese Ergebnisse stellen einen signifikanten Unterschied

und damit einen Beweis für eine Assoziation des Polymorphismus OPN T+282C mit der chronischen Parodontitis dar.

#### 6.4.7. Der Polymorphismus OPN T+750C: rs1126616

Der SNP OPN T+750C weist aufgrund der beobachteten Verteilung der drei möglichen Genotypfrequenzen und der Allelfrequenzen keine signifikanten Unterschiede und Abweichungen in den beiden Studiengruppen auf. Deshalb ist eine Assoziation mit dem Krankheitsbild der chronischen Parodontitis unwahrscheinlich. Dies belegen auch die Werte des relativen Risikos (odds ratio=0,96) und der Signifikanz ( $p=0,7$ ).

	Genotypfrequenz			Allelfrequenz	
	CC	TC	TT	C	T
Patienten	48,11% N=191	43,58% N=173	8,31% N=33	69,9% N=555	30,1% N=239
Kontrollen	50,44% N=393	40,57% N=316	8,99% N=70	70,73% N=1102	29,27% N=456

Tab. 6.12.: Prozentuale Verteilung der Genotypen und der Allele C und T in der Studienpopulation.

#### 6.4.8. Der Polymorphismus OPN A+1083G: 1126772

	Genotypfrequenz			Allelfrequenz	
	AA	AG	GG	A	G
Patienten	58,1% N=227	35,8% N=140	6,1% N=24	75,96% N=594	24,04% N=188
Kontrollen	60,56% N=473	34,44% N=269	5% N=39	77,79% N=1215	22,21% N=347

Tab. 6.13.: Prozentuale Verteilung der Genotypen und der Allele A und G in der Studienpopulation.

Auch der Polymorphismus OPN A+1083G mit dem Basenaustausch A/G innerhalb des uncodierenden Bereichs des Osteopontingens zeigt keine signifikanten Assoziationen zur chronischen Parodontitis. Die Genotypfrequenz- und Allelfrequenzverteilung in der Patienten- und Kontrollgruppe weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Die Signifikanzberechnung ( $p=0,32$ ) und die Berechnung des relativen Risikos (odds ratio=0,9) belegen diese Feststellung.

#### 6.4.9. Der Polymorphismus OPN A+1239C: rs9138

Bei dem letzten der neun zu untersuchenden Polymorphismen ist keine signifikante unterschiedliche Prävalenz der Genotypen oder Allele in den beiden Studienpopulation zu beobachten. Die Genotyp- und Allelfrequenz sind gleich verteilt. Die Berechnung der Signifikanz ( $p=0,29$ ) und des relativen Risikos (odds ratio=0,9) zeigen keine Assoziation des SNPs OPN A+1239C mit der chronischen Parodontitis.

	Genotypfrequenz			Allelfrequenz	
	AA	AC	CC	A	C
Patienten	47,1% N=187	43,83% N=174	9,07% N=36	69,02% N=548	30,98% N=246
Kontrollen	50,64% N=394	41% N=319	8,36% N=65	71,14% N=1107	28,86% N=449

Tab. 6.14.: Prozentuale Verteilung der Genotypen und der Allele A und C in der Studienpopulation.

#### 6.5. KOPPLUNGSGLEICHGEWICHTE

Nach der Auswertung der Kopplungsgleichgewichte durch das dafür entwickelte Statistikanalyseprogramms zeigt sich, dass die neun OPN-Polymorphismen gemeinsam im Block vererbt werden. Somit befinden sie sich im Kopplungsgleichgewicht.

#### 6.6. GESCHLECHTSABHÄNGIGE VERTEILUNG DER POLYMORPHISMEN

Um eventuelle geschlechtsspezifische Unterschiede in der Verteilung der Polymorphismen nachzuweisen, wurden die Genotypfrequenzen der Polymorphismen des Osteopontingens bei Männern und Frauen separat untersucht. Die Genotypen wurden innerhalb der Studienpopulation miteinander verglichen.

##### 6.6.1. OPN A-1748G: rs2728127

Auffällig ist, dass der weibliche Anteil des Genotyps GG in der Patientengruppe mit 11,9% größer ist, als in der weiblichen Kontrollgruppe. Eine Signifikanz dieses Genotyps ist allerdings nicht vorhanden ( $p=0,2$ ). Aber das relative Risiko (odds ratio) ist mit 1,2 erhöht. Auch der Genotyp AG zeigt bei den weiblichen Patienten einen größeren Prozentsatz (43,6%). Der Wildtyp AA weist ein häufigeres Vorkommen in der weiblichen Kontrollgruppe, als in der weiblichen Patientengruppe auf. In der männlichen Studienpopulation ist der homozygot mutierte Genotyp GG in der

Patientengruppe mit 8,2% öfter vertreten, als in der männlichen Kontrollgruppe. Es zeigt sich durch die Signifikanzberechnung ( $p=0,26$ ) und das relative Risiko (odds ratio= 0,85) aber keine Assoziation des Genotyps GG. Der Genotyp AG zeigt im Vergleich einen höheren Prozentsatz (48,3%) in der männlichen Kontrollgruppe. Der Anteil des Wildtyps (52,8%) ist dagegen in der männlichen Patientengruppe größer.

	Frauen			Männer		
	AA	AG	GG	AA	AG	GG
Patienten	44,5% N=90	43,6% N=88	11,9% N=24	52,8% N=96	39% N=71	8,2% N=15
Kontrollen	50,8% N=129	39,4% N=100	9,8% N=25	44,8% N=233	48,3% N=251	6,9% N=36

**Tab. 6.15.:** Geschlechtsspezifische Verteilung der Genotypen für OPN -A1748G.

### 6.6.2. OPN T-616G: rs2853744

	Frauen			Männer		
	GG	TG	TT	GG	TG	TT
Patienten	81,2% N=164	17,3% N=35	1,5% N=3	84,6% N=154	15,4% N=28	0% N=0
Kontrollen	83,1,8% N=210	16,9% N=43	0% N=0	85,2% N=443	14,6% N=76	0,2% N=1

**Tab. 6.16.:** Geschlechtsspezifische Verteilung der Genotypen für OPN T-616G.

In der gesamten Studienpopulation liegen nur vier Basenaustausche zu dem homozygoten Genotyp TT vor. Aus diesem Grund lässt sich keine Aussage über die geschlechtsabhängige Verteilung dieses Genotyps treffen. Sowohl der Genotyp GG, als auch der heterozygote Genotyp TG weisen in der Studienpopulation eine Gleichverteilung auf.

Eine Assoziation des homozygot mutierten Genotyps GG lässt sich weder in der weiblichen Studienpopulation durch eine Signifikanz ( $p=0,42$ ) oder ein erhöhtes relatives Risiko (odds ratio=0,82), noch in der männlichen Studienpopulation ( $p=0,91$ / odds ratio=0,96) feststellen.

### 6.6.3. OPN T- 443C: rs11730582

Auffällig ist, dass sowohl in der weiblichen, als auch in der männlichen Studienpopulation der heterozygote Genotyp TC am häufigsten auftritt. Die

Prozentsätze dieses Genotyps gleichen sich. Der Wildtyp TT zeigt ebenfalls keine Auffälligkeiten in der geschlechtsspezifischen Verteilung und gleicht sich in seinem prozentualen Vorkommen. Der homozygote Genotyp CC kommt sowohl in der weiblichen (24%), als auch in der männlichen Kontrollgruppe (26,2%) häufiger vor, als in den jeweiligen Patientengruppen mit 19,8% und 20,3%. Es lässt sich in der weiblichen Studienpopulation keine Signifikanz ( $p=0,29$ ) oder ein erhöhtes relatives Risiko (odds ratio=0,86) für den homozygot mutierten Genotyp CC feststellen. In der männlichen Studienpopulation ist dagegen das relative Risiko (odds ratio=1,03) für diesen Genotyp leicht erhöht. Es zeigt sich aber keine Signifikanz ( $p=0,81$ ).

	Frauen			Männer		
	TT	TC	CC	TT	TC	CC
Patienten	28,7% N=58	51,5% N=104	19,8% N=40	24,7% N=45	55,0% N=100	20,3% N= 37
Kontrollen	25,6% N=65	50,4% N=128	24,0% N=61	26,1% N=136	53,7% N=279	26,2% N=105

**Tab. 6.17.:** Geschlechtsspezifische Verteilung der Genotypen für OPN T-443C.

#### 6.6.4. OPN delG-156: rs11439060

	Frauen			Männer		
	delG/delG	delG/G	G/G	delG/delG	delG/G	G/G
Patienten	52,5% N=106	38,1% N=77	9,4% N=19	52,2% N=95	40,7% N=74	7,1% N=13
Kontrollen	53,5% N=136	36,6% N=93	9,9% N=25	48,9% N=254	43,6% N=227	7,5% N=39

**Tab. 6.18.:** Geschlechtsspezifische Verteilung der Genotypen für OPN delG-156.

Der homozygot mutierte Genotyp G/G besitzt mit 9,4% und 9,9% in der weiblichen Studienpopulation im Vergleich zur männlichen Studienpopulation mit 7,1% und 7,5% einen höheren Anteil. Für diesen Genotyp ist kein signifikanter Unterschied ( $p=0,94$ ) in der weiblichen Gruppe festzustellen. Aber das relative Risiko (odds ratio=1,02) ist für diese Gruppe leicht erhöht. Für die männliche Studienpopulation zeigt weder die Signifikanzberechnung ( $p=0,55$ ), noch das relative Risiko (odds ratio=0,91) eine Assoziation des homozygot mutierten Genotyps GG. Der Wildtyp delG/delG und der heterozygote Genotyp delG/G weisen im Vergleich zwischen

Männer und Frauen, wie im Vergleich weiblicher Patienten mit weiblichen Kontrollen und im Vergleich männliche Patienten mit männlichen Kontrollen keine signifikanten Unterschiede auf.

#### 6.6.5. OPN T-66G: rs28357094

	Frauen			Männer		
	TT	TG	GG	TT	TG	GG
Patienten	60,9% N=123	33,6% N=68	5,5% N=11	61,0% N=111	33,5% N=61	5,5% N=10
Kontrollen	65,4% N=166	29,5% N=75	5,1% N=13	62,3% N=324	32,7% N=170	5,0% N=26

**Tab. 6.19.:** Geschlechtsspezifische Verteilung der Genotypen für OPN T-66G.

Bei diesem Polymorphismus zeigen sich im Vergleich zwischen männlicher und weiblicher Studienpopulation keine Unterschiede. Auch im Vergleich zwischen Patienten und Kontrollen ergibt sich weder für die Frauen, noch für die Männer ein Unterschied in der Verteilung eines Genotyps. Allerdings ist das relative Risiko für den homozygot mutierten Genotyp GG sowohl in der weiblichen Studienpopulation (odds ratio=1,15), als auch in der männlichen Gruppe (odds ratio=1,06) erhöht. Die Signifikanzberechnung ( $p=0,41/p=0,71$ ) für diesen Genotyp zeigt aber keine Assoziation.

#### 6.6.6. OPN T+282C: rs4754

Bei diesem Polymorphismus fällt die unterschiedliche Verteilung des homozygot mutierten Genotyps CC auf. In der weiblichen Studienpopulation ist dieser bei den Kontrollen mit 17,3% mehr als doppelt so groß, wie bei den weiblichen Patienten mit 7,4%. Die Signifikanzberechnung ( $p=0,0017$ ) zeigt eine hohe Assoziation dieses Genotyps in der weiblichen Studienpopulation. Das relative Risiko (odds ratio=0,64) ist dagegen nicht erhöht. In der männlichen Studienpopulation findet sich ein ähnliches Ergebnis. Im Vergleich zwischen männlichen Kontrollen und Patienten zeigt sich bei den Kontrollen mit 16,1% ein größerer Prozentsatz, als bei den Patienten (9,9%). Hier ist aber weder das relative Risiko (odds ratio=0,86) erhöht, noch zeigt sich eine Assoziation durch die Signifikanzberechnung ( $p=0,28$ ). In Vergleich Frauen/ Männer findet sich in der Patientengruppe der Genotyp CC häufiger bei den Männern. In der Kontrollgruppe ist es umgekehrt. Außerdem ist die unterschiedliche Verteilung des Wildtyps TT in der weiblichen Studienpopulation

auffällig. Der prozentuale Anteil dieses Genotyps ist mit 48,5% deutlich höher, als in der Kontrollgruppe (38,2%). In der männlichen Studienpopulation findet man zusätzlich eine unterschiedliche Verteilung des Genotyps TC. Dessen Anteil ist mit 44% in der Patientengruppe größer, als bei den männlichen Kontrollen mit 38,1%.

	Frauen			Männer		
	TT	TC	CC	TT	TC	CC
Patienten	48,5% N=98	44,1% N=89	7,4% N=15	46,1% N=84	44,0% N=80	9,9% N=18
Kontrollen	38,2% N=97	44,5% N=113	17,3% N=44	45,8% N=238	38,1% N=198	16,1% N=84

**Tab. 6.20.:** Geschlechtsspezifische Verteilung der Genotypen für OPN T+282C.

### 6.6.7. OPN T+750C: rs1126616

	Frauen			Männer		
	TT	TC	CC	TT	TC	CC
Patienten	7,4% N=15	44,1% N=89	48,5% N=98	8,8% N=16	44,5% N=81	46,7% N=85
Kontrollen	10,6% N=27	44,9% N=114	44,5% N=113	8,1% N=42	38,3% N=199	53,6% N=279

**Tab. 6.21.:** Geschlechtsspezifische Verteilung der Genotypen für OPN T+750C.

Im Vergleich zwischen männlicher und weiblicher Studienpopulation zeigt sich sowohl in der Patientengruppe, als auch in der Kontrollgruppe ein unterschiedliches Verteilungsmuster der Genotypen. Mit 48,5% ist der Anteil des homozygot mutierten Genotyps CC im Vergleich in der weiblichen Kontrollgruppe höher, als bei den Patienten (44,5%). Die Signifikanzberechnung ( $p=0,25$ ) zeigt keine Assoziation. Aber das relative Risiko (odds ratio=1,18) des homozygot mutierten Genotyps ist erhöht. In der männlichen Studienpopulation verhält sich das Verteilungsmuster dieses Genotyps umgekehrt. Mit 53,6% ist dessen Anteil in der Kontrollgruppe größer, als in der Patientengruppe (46,7%). Die Signifikanzberechnung ( $p=0,18$ ) und das relative Risiko (odds ratio=0,83) zeigen keine Assoziation des Genotyps CC. Auffällig ist die Verteilung des Wildtyps TT. Mit 10,6% in der weiblichen Kontrollgruppe zeigt sich ein deutlich größerer Prozentsatz, als in der weiblichen Patientengruppe (7,4%). Der heterozygote Genotyp TC weist mit 44,5% in der männlichen Patientengruppe eine

unterschiedliche Verteilung im Vergleich mit der männlichen Kontrollgruppe (38,3%) auf.

#### 6.6.8. OPN A+1083G: rs1126772

	Frauen			Männer		
	AA	AG	GG	AA	AG	GG
Patienten	57,9% N=117	36,6% N=74	5,5% N=11	58,2% N=106	45,7% N=65	6,1% N=11
Kontrollen	57,1% N=145	37,0% N=94	5,9% N=15	62,1% N=323	33,1% N=172	4,8% N=25

**Tab. 6.22.:** Geschlechtsspezifische Verteilung der Genotypen für OPN A+1083G.

Bei diesem Polymorphismus fällt der Unterschied in der Verteilung der Genotypen in der männlichen Studienpopulation auf. Mit 6,1% in der männlichen Patientengruppe ist der Anteil des homozygot mutierten Genotyps GG größer, als in der männlichen Kontrollgruppe mit 4,8%. Auch das relative Risiko (odds ratio=1,16) ist für diesen Genotyp erhöht. Die Signifikanzberechnung ( $p=0,34$ ) zeigt aber keine Assoziation. Der Wildtyp AA stellt dagegen mit 58,2% in der männlichen Patientengruppe den kleineren Prozentsatz dar. In der Kontrollgruppe beträgt dieser 62,1%. Auch der heterozygote Genotyp zeigt eine unterschiedliche Verteilung in der männlichen Studienpopulation. Mit 45,7% ist dieser in der männlichen Patientengruppe häufiger, als in der Kontrollgruppe. Die weibliche Studienpopulation stellt eine Gleichverteilung der drei Genotypen dar. Die Signifikanzberechnung ( $p=0,88$ ) und das relative Risiko (odds ratio=0,97) weisen auf keine Assoziation des homozygoten Genotyps GG in der weiblichen Studienpopulation hin.

#### 6.6.9. OPN A+1239C: rs9138

Auch bei diesem Polymorphismus fällt die unterschiedliche Genotypverteilung in der männlichen Studienpopulation auf. Der Anteil des homozygot mutierten Genotyps CC beträgt in der männlichen Patientengruppe 8,8% und in der männlichen Kontrollgruppe 7,5%. Das relative Risiko (odds ratio=1,26) ist für diesen Genotyp erhöht. Die Signifikanzberechnung ( $p=0,08$ ) zeigt aber keine Assoziation. Der Wildtyp AA zeigt mit 53,5% in der männlichen Kontrollgruppe einen deutlichen Unterschied im Vergleich zur männlichen Patientengruppe mit 45,1%. Auch der heterozygote Genotyp AC ist mit 46,1% in der männlichen Patientengruppe und 39% in der männlichen Kontrollgruppe ungleich verteilt. In der weiblichen Studienpopulation ist

dagegen eine Gleichverteilung der Genotypen zu finden. Es tritt keine Assoziation des homozygot mutierten Genotyps CC auf ( $p=0,67$ /odds ratio=0,94).

	Frauen			Männer		
	AA	AC	CC	AA	AC	CC
Patienten	48,0% N=97	43,1% N=87	8,9% N=18	45,1% N=82	46,1% N=84	8,8% N=16
Kontrollen	46,1% N=117	44,1% N=112	9,8% N=25	53,5% N=278	39,0% N=203	7,5% N=39

**Tab. 6.23.:** Geschlechtsspezifische Verteilung der Genotypen für OPN A+1239C.

## 6.7. RISIKOFAKTOR RAUCHEN

### 6.7.1. Verteilung in der Studienpopulation

Innerhalb der Studienpopulation liegt der Anteil an Rauchern in der Patientengruppe mit chronischer Parodontitis mit 32% ca. dreimal höher, als in der Kontrollgruppe (12%). Die Tatsache, dass Rauchen ein Risikofaktor für die Entwicklung und Progression einer Parodontitis darstellt, wird mit Hilfe dieses Ergebnisses unterstützt. Allerdings stellt sich die Frage, ob der Risikofaktor Rauchen nicht auch in direkter Verbindung zu den Basenaustauschen der untersuchten Polymorphismen steht.

### 6.7.2. Vergleich des Risikofaktors Rauchen mit den untersuchten Polymorphismen

#### 6.7.2.1. OPN A-1748G: rs2728127

Der Prozentsatz des mutierten Genotyps GG des Polymorphismus OPN A-1748G in der Patientengruppe der Raucher ist mit 19,4% deutlich höher, als mit 13,1% in der Kontrollgruppe der Raucher. Es zeigt sich keine direkte Assoziation des homozygot mutierten Genotyps GG mit dem Faktor Rauchen ( $p=0,4$ ). Das relative Risiko ist dagegen erhöht (odds ratio=1,6).

	Raucher	Nichtraucher
Patienten	19,4% N=7	80,6% N=29
Kontrollen	13,1% N=8	86,9% N=53

**Tab. 6.24.:** Vergleich des Risikofaktors Rauchen in Bezug auf den mutierten Genotyp GG.

### 6.7.2.2. OPN T-616G: rs2853744

	Raucher	Nichtraucher
Patienten	66,7% N=2	33,3% N=1
Kontrollen	0% N=0	100% N=1

**Tab. 6.25.:** Vergleich des Risikofaktors Rauchen in Bezug auf den Genotyp TT.

Bei diesem Vergleich wird deutlich, dass der homozygote Genotyp TT in Bezug auf den Faktor Rauchen in der Patientengruppe mit 66,7% deutlich höher ist, als in der Kontrollgruppe mit 0%. Mit 100% des Genotyps GG in der Kontrollgruppe in Bezug auf die Nichtraucher fällt ebenfalls ein Unterschied zu 33,3% in der Patientengruppe auf. Dieses Ergebnis muss aber aufgrund der insgesamt nur vier auftretenden TT-Genotypen mit Vorbehalt betrachtet werden.

### 6.7.2.3. OPN T-443C: rs11730582

	Raucher	Nichtraucher
Patienten	33,8% N=25	66,2% N=49
Kontrollen	15% N=25	85% N=142

**Tab. 6.26.:** Vergleich des Risikofaktors Rauchen in Bezug auf den homozygot mutierten Genotyp CC.

Bei diesem Polymorphismus ist der Anteil des homozygot mutierten Genotyps CC in Bezug auf den Risikofaktor Rauchen in der Patientengruppe mehr als doppelt so groß, wie im Vergleich zu den Rauchern der Kontrollgruppe. Für diesen Polymorphismus zeigt sich auch durch die Signifikanzberechnung ( $p=0,0017$ ) und das relative Risiko (odds ratio=2,9) eine starke Assoziation des homozygot mutierten Genotyps CC in Bezug auf den Faktor Rauchen.

### 6.7.2.4. OPN delG-156: rs11439060

Auch bei diesem Polymorphismus wird der Unterschied in der Verteilung des homozygot mutierten Genotyps GG in Bezug auf den Risikofaktor Rauchen deutlich. Sein prozentualer Anteil ist im Vergleich in der Patientengruppe mit 18,8% doppelt so hoch, als in der Kontrollgruppe der Raucher mit 9,4%. Durch die Berechnung der

Signifikanz ( $p=0,21$ ) lässt sich keine Assoziation feststellen. Dagegen ist das relative Risiko (odds ratio=2,23) stark erhöht.

	Raucher	Nichtraucher
Patienten	18,8% N=6	81,2% N=26
Kontrollen	9,4% N=6	90,6% N=58

**Tab. 6.27.:** Vergleich des Risikofaktors Rauchen in Bezug auf den homozygot mutierten Genotyp GG.

#### 6.7.2.5. OPN T-66G: rs28357094

	Raucher	Nichtraucher
Patienten	20% N=4	80% N=16
Kontrollen	18% N=7	82% N=32

**Tab. 6.28.:** Vergleich des Risikofaktors Rauchen in Bezug auf den homozygot mutierten Genotyp GG.

Bei dem Polymorphismus OPN T-66G zeigt sich eine Gleichverteilung des homozygot mutierten Genotyps GG in Bezug auf den Risikofaktor Rauchen in der Studienpopulation. Trotzdem ist das relative Risiko (odds ratio=2,5) erhöht. Durch die Signifikanzberechnung ( $p=0,087$ ) lässt sich aber keine Assoziation des Genotyps GG in Bezug auf den Faktor Rauchen feststellen.

#### 6.7.2.6. OPN T+282C: 4754

Auch hier fällt ein deutlich größerer Anteil des homozygot mutierten Genotyps CC in Bezug auf den Risikofaktor Rauchen mit 25% in der Patientengruppe auf. In der Kontrollgruppe beträgt dieser nur 11,7%. Eine Assoziation lässt sich aber durch Berechnung der Signifikanz ( $p=0,1$ ) nicht bestätigen. Dagegen ist das relative Risiko (odds ratio=2,5) stark erhöht.

	Raucher	Nichtraucher
Patienten	25% N=8	75% N=24
Kontrollen	11,7% N=15	88,3% N=113

**Tab. 6.29.:** Vergleich des Risikofaktors Rauchen in Bezug auf den homozygot mutierten Genotyp CC.

#### 6.7.2.7. OPN T+750C: rs1126616

	Raucher	Nichtraucher
Patienten	33,3% N=10	66,7% N=20
Kontrollen	13% N=9	87% N=60

**Tab. 6.30.:** Vergleich des Risikofaktors Rauchen in Bezug auf den homozygot mutierten Genotyp CC. Bei diesem Polymorphismus ist der deutlich größere Anteil des homozygot mutierten Genotyps CC in Bezug auf den Risikofaktor Rauchen mit 33,3% in der Patientengruppe im Vergleich zu 13% in der Kontrollgruppe auffällig. Deutlich wird die Assoziation dieses Genotyps in Bezug auf den Faktor Rauchen auch durch die Signifikanzberechnung ( $p=0,026$ ) und durch das erhöhte relative Risiko (odds ratio=3,3).

#### 6.7.2.8. OPN A+1083G: rs1126772

Auch bei diesem Polymorphismus ist der Anteil des homozygot mutierten Genotyps GG im Vergleich der Raucher in der Patientengruppe mit 22,7% höher, als in der Kontrollgruppe mit 15,4%. Das relative Risiko (odds ratio=1,62) ist auch bei diesem Polymorphismus in Bezug auf den mutierten Genotyp und den Faktor Rauchen erhöht. Durch die Signifikanzberechnung findet sich aber keine Assoziation ( $p=0,5$ ).

	Raucher	Nichtraucher
Patienten	22,7% N=5	77,3% N=17
Kontrollen	15,4% N=6	84,6% N=33

**Tab. 6.31.:** Vergleich des Risikofaktors Rauchen in Bezug auf den homozygot mutierten Genotyp GG.

#### 6.7.2.9. OPN A+1239C: rs9138

Die Verteilung des homozygot mutierten Genotyps CC ist im Vergleich der Raucher in der Patientengruppe mit 20,6% erneut deutlich höher, als in der Kontrollgruppe mit 11,9%. Auch bei diesem Polymorphismus ist das relative Risiko (odds ratio=2,22) stark erhöht. Die Berechnung der Signifikanz ( $p=0,22$ ) zeigt keine Assoziation des homozygot mutierten Genotyps CC mit dem Faktor Rauchen.

	Raucher	Nichtraucher
Patienten	20,6% N=7	79,4% N=23
Kontrollen	11,9% N=7	88,1% N=51

**Tab. 6.32.:** Vergleich des Risikofaktors Rauchen in Bezug auf den homozygot mutierten Genotyp CC.

## 6.8. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Die Studienpopulation aus Patientengruppe und Kontrollindividuen befindet sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, da die beobachteten Genotypfrequenzen keine Abweichungen zu den erwarteten Genotypfrequenzen zeigen. Der Polymorphismus OPN T+282C weist durch die Verteilung des homozygoten Genotyps CC, mit 8,82% innerhalb der Patienten- und 16,58% in der Kontrollgruppe, eine Assoziation zum Krankheitsbild der chronischen Parodontitis auf. Diese Verbindung wird durch  $p=0,003$  und ein gesteigertes relatives Risiko mit 1,3 verdeutlicht. Zusätzlich ist der Genotyp CC in der weiblichen Studienpopulation signifikant erhöht ( $p=0,0017$ ).

Die acht anderen Polymorphismen des Osteopontingens, die in dieser Studie untersucht wurden, zeigen keine Assoziation zum Krankheitsbild der chronischen Parodontitis.

Nach Stratifikation der Gesamtpopulation nach dem Geschlecht, ist für die Polymorphismen OPN T-443C, A+1083G und A+1239C das relative Risiko für den jeweiligen homozygot mutierten Genotyp in der männlichen Studienpopulation erhöht. Die Polymorphismen OPN A-1748G, delG-156 und T+750C dagegen zeigen ein erhöhtes relatives Risiko für den homozygot mutierten Genotyp in der weiblichen Studienpopulation. Allerdings sind keine erhöhten Signifikanzen feststellbar. Für den Polymorphismus OPN T-66G ist das relative Risiko für GG sowohl in der weiblichen, als auch in der männlichen Gruppe erhöht, wohingegen die Signifikanzberechnung keine Assoziation zeigt. Der Polymorphismus OPN T-616G weist eine Gleichverteilung des Genotyps mit Basenaustausch in der Studienpopulation auf.

Insgesamt ist der homozygot mutierte Genotyp der neun untersuchten Polymorphismen in der Patientengruppe bei Rauchern häufiger, als bei Nichtrauchern. Auch ist das relative Risiko für diesen Genotyp in Bezug auf den Risikofaktor Rauchen für die Polymorphismen OPN A-1748G, delG -156, T-66G, T+282C, A+1083G und A+1239C erhöht. Die Signifikanzberechnung zeigt allerdings keine Assoziation. Für die Polymorphismen OPN T-443C und T+750C dagegen, ist

eine Assoziation der homozygot mutierten Genotypen mit dem Faktor Rauchen zu beobachten. Sowohl das relative Risiko (odds ratio= 2,9 und 3,3), als auch die Signifikanzberechnung ( $p= 0,0017$  und  $0,026$ ) sind erhöht und verdeutlichen diese Verbindung.

## 7. DISKUSSION

### 7.1. STUDIENDESIGN

Bei der hier vorgestellten Arbeit handelt es sich um eine Assoziationsstudie. Im Falle von Krankheitsbildern mit multifaktorieller Ätiologie und genetischem Hintergrund, wie chronisch-entzündlichen Parodontalerkrankungen, stellen Assoziationsstudien einen Ansatz zur Suche nach krankheitsrelevanten Genen dar (*KINANE et al., 2005*). Eine direkte Assoziationsstudie soll klären, ob einzelne Polymorphismen, wie Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) oder Deletionspolymorphismen, mit einem bestimmten Krankheitsbild in Verbindung stehen. Dazu werden die Allel- und Genotypfrequenzen für den untersuchten Polymorphismus in der betreffenden Patientengruppe mit den Frequenzen in einer gesunden Kontrollgruppe mittels statistischer Tests verglichen (*KINANE et al., 2005*).

Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs = *Single nucleotid polymorphisms*) sind einzelne Positionen von Nukleotiden, an denen mehr als eine mögliche Base vorkommen kann (*STONEK, 2006*). Die überwiegende Mehrzahl der SNPs ist biallelisch, d. h. es gibt zwei mögliche Allele. SNPs finden sich in großer Häufigkeit über das gesamte Genom verteilt. Dabei beträgt die Frequenz des selteneren Allels in der jeweiligen Population mindestens 1 % (*STONEK, 2006; CHAKRAVARTI 2001*). Die Häufigkeit der SNPs ist von der genomischen Region und der Population abhängig. Sie wird durchschnittlich auf einen SNP pro 200-600 Basen geschätzt (*TSALENKO, 2003*).

Nicht jeder Polymorphismus ist für Assoziationsstudien in gleichem Maße geeignet. Die SNPs können nach verschiedenen Kriterien klassifiziert werden: Zum einen können sie innerhalb oder außerhalb einer codierenden Region liegen (*CHAKRAVARTI 2001*), oder in einer nicht-codierenden Region, jedoch in regulatorischen Bereichen des Genoms, wie etwa in der Promotorregion eines Gens. Diese Polymorphismen lassen sich sehr gut für die Untersuchung komplexer Erkrankungen verwenden (*CHAKRAVARTI, 2001*). Ebenso eignen sich für Assoziationsstudien SNPs, die durch einen nicht stummen Basenaustausch die codierende Sequenz des Gens verändern und dadurch zu einer veränderten Proteinsequenz in Form von Aminosäureaustausch oder einem verkürzten Protein führen (*STONEK, 2006*). In der Regel werden in Assoziationsstudien funktionell

wirksame SNPs analysiert (KINANE *et al.*, 2005; STONEK, 2006; CALLADINE, 2006).

Das Osteopontin, das in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, codiert für das Protein OPN. Dieses Protein ist ein sehr komplexes Molekül, das an zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt ist (SODEK *et al.*, 2006). Es besitzt eine wichtige Funktion in der Vermittlung der Immunantwort bei Entzündungsgeschehen (ASHKAR *et al.*, 2000; O`REGAN, 2003; SODEK *et al.*, 2006), in der Wundheilung (LIAW *et al.*, 1998; RITTLING *et al.*, 1998) und als Matrixprotein (SODEK *et al.*, 2006). Angesichts der bedeutsamen Rolle des Immunsystems und des geschädigten Parodontalgewebes in der Ätiologie und Pathogenese der chronischen Parodontitis (MARSH, 1994; VAN STEENBERGEN *et al.*, 1996; LOESCHE, 1999; VAN DYKE *et al.*, 2005; IRWIN *et al.*, 2007), stellt das untersuchte Gen einen sehr interessanten funktionellen Kandidaten für die Aufklärung des genetischen Hintergrunds der chronischen Parodontitis dar.

Vier der untersuchten Polymorphismen, OPN T+282C und OPN T+750C, OPN A+1083G, OPN A+1239C, liegen innerhalb des codierenden Bereichs des Osteopontins. Der Basenaustausch der SNPs OPN T+282C und OPN T+750C führt zu keinem Aminosäurewechsel und bleibt somit stumm. OPN A+1083G und OPN A+1239C bleiben untranslatiert. Innerhalb der genregulatorischen Region, wie dem Promotorbereich, befinden sich die Polymorphismen OPN A-1748G, OPN T-616G, OPN T-443C, OPN delG-156 und OPN T-66G. Die Ausnahme hierbei bildet der Polymorphismus OPN delG-156, der einen Deletionspolymorphismus darstellt. Für einen Teil dieser Polymorphismen werden funktionelle Auswirkungen beschrieben, wie gesteigerte Transkriptionsaktivität und erhöhte Genexpression (GIACOPELLI *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2000), Affinität zu bestimmten Transkriptionsfaktoren (HUMMELSHOJ *et al.*, 2006), bis hin zu Assoziationen mit bestimmten Krankheitsbildern (MOCHIDA *et al.*, 2004; D`ALFONSO *et al.*, 2005; GIACOPELLI *et al.*, 2004; FORTON *et al.*, 2002; CHIOCCHETTI *et al.*, 2004). Durch diese Aspekte eignen sich diese Polymorphismen sehr gut für die Untersuchung einer möglichen Assoziation des Osteopontins mit dem Krankheitsbild der chronischen Parodontitis. Bei den anderen Polymorphismen handelt es sich ebenfalls um funktionell wirksame SNPs, die in der Lage sind, die Genfunktion zu beeinflussen. So stellen auch diese mögliche Kandidaten dar, die die Funktionen von

Osteopontin beeinflussen und sich dadurch auf die chronische Parodontitis auswirken können.

Die Relevanz der Befunde zahlreicher Assoziationsstudien ist umstritten (*BORELL & PAPAPANOU, 2002*). Sehr häufig können die Ergebnisse einzelner Assoziationsstudien in weiteren nachfolgenden Studien nicht bestätigt werden. Die Variabilität der Befunde ist vor allem auf drei Einflussfaktoren zurückzuführen (*SCHREIBER 2002*): Eine Ursache ist die genetische Variabilität zwischen einzelnen Populationen, die insbesondere bei schwächeren genetischen Einflussfaktoren bedeutsam wird. Einen weiteren Grund stellt die Möglichkeit dar, dass gefundene genetische Assoziationen nicht den ursächlichen Basenaustausch im eigentlichen pathogenitätsrelevanten Locus, sondern Varianten in dessen Nachbarschaft identifizieren, welche gekoppelt vererbt werden. Somit besteht ein sogenanntes Kopplungsungleichgewicht.

Schließlich sind Assoziationen auf Artefakte durch zu geringe oder unzureichend charakterisierte Studienpopulationen, insbesondere zu kleine Kontrollgruppen, zurückzuführen (*BORELL & PAPAPANOU, 2002*).

## **7.2. AUSWAHL DER STUDIENPOPULATION**

Auf die Auswahl der Studienpopulation sollte beim Design einer Studie, sowie der Analyse und Interpretation der Daten geachtet werden (*COLHUON et al., 2003; MATHEW et al., 2004*). Sehr wichtig ist hierbei eine geeignete Auswahl in Bezug auf Größe und Zusammensetzung. Die Anzahl der getesteten Personen sollte ausreichend hoch sein, um auch schwächere Assoziationen detektieren zu können. Im Fall einer Assoziationsstudie sollte die Kontrollpopulation mindestens etwa gleich, bis zweimal so groß, wie die Patientengruppe sein. Bei Verwendung einer zu kleinen Kontrollgruppe kann die statistische Signifikanz von Assoziationen verfehlt werden. Bei Verwendung einer zu großen Kontrollgruppe kann eine falsch positive statistische Signifikanz resultieren. Zusätzlich sollten die ethnische Zusammensetzung und das Geschlechtsverhältnis der Kontrollpopulation mit denen der Patientengruppe vergleichbar sein (*MOMBELLI et al., 2002*).

Die Patientengruppe muss klar charakterisiert sein. Die Diagnose sollte anhand standardisierter klinischer Kriterien gestellt werden (*BOCH et al., 2001; SCAREL-CAMINAGA et al., 2002; MOMBELLI et al., 2002*).

Die Genotypisierung sollte unter Verwendung vergleichbar zuverlässiger Methoden sowohl in der Kontrollpopulation, als auch in der Patientengruppe erfolgen, um

unterschiedliche Fehltypisierungsraten zu vermeiden (COLHOUN *et al.*, 2003; KINANE *et al.*, 2005). Die Genotypverteilung in der Kontrollpopulation soll mit den entsprechend einem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht vorhergesagten Häufigkeiten verglichen werden. Bei der Berechnung von Genotyp-, Phänotyp- und Haplotypfrequenzen müssen entsprechende Korrekturen vorgenommen werden. Weiterhin sollte eine beobachtete Assoziation in mindestens einer weiteren unabhängigen Studie überprüft werden (MATHEW, 2003), um die Aussagekraft zu verdeutlichen und zu bestätigen.

In der hier vorgestellten Arbeit wurden 397 Patienten mit chronischer Parodontitis und 781 Kontrollpersonen eingeschlossen. Alle Studienteilnehmer sind kaukasischer Herkunft und stammen aus dem süddeutschen Raum. Die Diagnose des Krankheitsbildes der chronischen Parodontitis wird anhand standardisierter klinischer Kriterien gestellt (KINANE *et al.*, 2005). Kritisch muss der Altersunterschied innerhalb der Studienpopulation gesehen werden. Die Kontrollindividuen sind durchschnittlich 46,78 Jahre und die Patienten 53,69 Jahre. Die Differenz von ca. sieben Jahren ist bei Vergleichen beider Gruppen zu berücksichtigen. Zusätzlich gestaltet sich der Vergleich einer geschlechtsabhängigen Verteilung der Genotypen innerhalb der beiden Gruppen problematisch. In der Patientenpopulation herrscht eine ausgewogene Verteilung der Geschlechter. Bei den Kontrollindividuen nehmen die Männer einen höheren Prozentsatz ein, so dass geschlechtsbezogene Vergleiche mit Vorbehalt betrachtet werden müssen.

Für alle Polymorphismen wurde die Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes vorgenommen. Da die beobachteten Genotypfrequenzen keine Abweichungen von den erwarteten Frequenzen zeigen, kann die Aussage getroffen werden, dass sich beide Gruppen der Studienpopulation im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befinden, und somit systematische Fehler bei der Zusammenstellung der Studienpopulation, sowie bei der Typisierung, mit Ausnahme der geschlechtlichen Verteilung und des Alters, nicht anzunehmen sind. Bei der Berechnung der Genotyp- und Allelfrequenzen wurden die p-Werte entsprechend korrigiert.

### **7.3. VALIDITÄT DER VERWENDETEN METHODEN**

Neben einem geeigneten Studiendesign, ist die wichtigste Voraussetzung für die Durchführung einer Assoziationsstudie die sichere und zweifelsfreie Identifizierung sämtlicher bereits bekannter Allele des zu untersuchenden Polymorphismus

(COLHOUN *et al.*, 2003). Für die Typisierung von Einzelnukleotid-Polymorphismen können verschiedenen Methoden verwendet werden. Standardmethoden hierzu sind Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus(RFLP)-Analyse, DNA-Sequenzierung, allelspezifische PCR, Hybridisierungstechniken und Einzelstrang-Konformationspolymorphismus(SSCP)-Analyse (ATAKAN & BÄHRING, 2007).

In der vorliegenden Studie wird für die Analyse der Polymorphismen die Schmelzkurventechnologie mit Hybridisierungssonden, verbunden mit einer PCR-Amplifikation, eingesetzt. Die Methode basiert auf der Bindung der Hybridisierungssonden an die *Mutationsstelle* und der Übermittlung der Lage des Basenaustausches über die Schmelzpunkte, also temperaturabhängig, und über die Fluoreszenz (WITTEWER, 2001). Diese Methode ist sehr zuverlässig, zeit- und kostensparend, sowie sehr sensitiv (HAMPE *et al.*, 2001; HAYDEN *et al.*, 2008).

### **7.3.1. Polymerase-Ketten-Reaktion**

Die Effizienz der PCR ist nicht über alle Zyklen konstant. Dafür gibt es mehrere Gründe. Ein kritischer Punkt ist die Denaturierung. Es handelt sich um einen sehr schnellen Prozess, bei dem alle Komponenten durch die Hitzeeinwirkung beeinflusst werden. Die Polymerase wird denaturiert, die Nukleotide zerfallen und die Template-DNA und die Primer werden depuriniert. Aufgrund dessen sollte die Denaturierungszeit so kurz wie möglich gehalten werden (MÜHLHARDT, 2006).

Die Annealingtemperatur richtet sich hauptsächlich nach den verwendeten Primern (CUI *et al.*, 2007; BROWN & WITTEWER 1998). Auf diese Weise kommt es zur Bindung der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer an die komplementäre Sequenz der Template-DNA. Zusätzlich soll die Elongationszeit an die Länge des erwarteten Produkts angepasst werden. Dies führt zu einer optimalen Zweistrangsynthese, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Template-DNA exakt gleicht.

Auch das Template und seine Menge sind zu beachtende Punkte. Je besser die Qualität der Template-DNA, desto sicherer funktioniert die PCR (JEONG *et al.*, 2005). Theoretisch reicht ein einziges Templatemolekül aus, doch in der Praxis sind mehr Moleküle nötig, um problemlos zu amplifizieren. Allerdings sollte keine zu große Menge an Template eingesetzt werden, weil dadurch die Wahrscheinlichkeit eines Fehlannealing steigt und die Reaktion zu früh in die Sättigung geraten kann. Darunter leidet die Qualität des Produkts (MÜHLHARDT, 2006).

Außerdem spielt der Multiplikationsfaktor eine Rolle. Die DNA-Moleküle werden von Zyklus zu Zyklus verdoppelt. Jedoch ist die Vermengungsrate zu Beginn der PCR kleiner, vermutlich, weil die Wahrscheinlichkeit, dass sich Template, Primer, und Enzym treffen, anfangs vergleichsweise gering ist. Sie steigt dann mit zunehmender Templatemenge an, verringert sich aber gegen Ende der Reaktion wieder, weil die Vermehrung zunehmend durch Phosphat, zerfallene Nukleotide und rehybridisierende Produkte gehemmt wird (*RASSMUSSEN, 2001*). Außerdem darf die Zyklenzahl innerhalb der PCR nicht außer Acht gelassen werden. Ab einer gewissen Produktmenge kommt es zu einem Plateau-effekt, bei dem die Vermehrungsrate stark abnimmt (*RASSMUSSEN, 2001*). Dies kann aus verschiedenen Gründen geschehen: Die Akkumulation von Endprodukten (DNA, Phosphat) verlangsamt die Synthese, die Wahrscheinlichkeit des Reannealing von zwei fertigen DNA-Strängen reduziert die Neusynthese, die Substratkonzentration nimmt ab, die Menge an intakter Polymerase sinkt, es kommt zur Konkurrenz mit unspezifischen Produkten (wie Primerdimeren) und zur verstärkten Fehlhybridisierung. Tatsächlich steigt in diesem Moment die Zahl falscher Produkte. Außerdem tendiert das Produkt bei zu vielen Zyklen zum „Schmierer“: Neben dem gewünschten Produkt entstehen immer mehr falsche Produkte, die sich meist vom richtigen durch ihre Länge unterscheiden. Aus diesem Grund passt man für das beste Ergebnis die Zahl der Zyklen so an, dass die PCR beendet ist, wenn das Plateau erreicht ist (*MÜHLHARDT, 2006*).

Ein wichtiger Punkt für die Effizienz der PCR ist die temperaturabhängige Aktivität der Polymerase. Obwohl diese thermostabilen Enzyme ihr Arbeitsoptimum bei ca. 70°C besitzen, sind sie auch bei anderen Temperaturen nicht inaktiv. So werden bereits bei niedrigen Temperaturen Nukleotide frei (*HOGREFE et al., 2002*).

In dieser Studie wurde eine Enzymaktivierung für 10min bei 95°C und ein Denaturierungsprozess von 45x für 10s bei 95°C gewählt. Auf diese Weise konnte man die Aufspaltung der Template-DNA garantieren und eine kurze Denaturierungszeit, um die beteiligten Reaktionspartner nicht zu beschädigen. Für eine optimale Amplifizierung in einer Zeit von 35 Sekunden wählte man die Annealingtemperatur nach Primer, die sich aus den Austestungen ergaben, und sicherten, dass die Primer bei dieser Temperatur an die DNA banden. Außerdem wurde während der Elongation das Temperaturoptimum der Polymerase bei 72°C

gewährleistet. Die Template-DNA verfügte mit 100ng/μl über eine ausreichende Konzentration und sicherte somit ebenfalls die Qualität der PCR.

### 7.3.2. Primer und Sonden

Die Primer werden einerseits speziell für die gewünschte Amplifikation hergestellt, andererseits entscheiden sie in erster Linie über das Gelingen der Amplifikation (MÜHLHARDT, 2006). Ihre Sequenz sollte möglichst spezifisch für das gewünschte Produkt sein, so dass die Primer nur an der richtigen Stelle hybridisieren (CHOTÁR *et al.*, 2006). Je mehr verwandte Sequenzen in der verwendeten Template-DNA existieren, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für unspezifische Amplifikationsprodukte. Je komplexer die Template-DNA, je mehr unterschiedliche Sequenzen enthalten sind, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit Artefakte zu amplifizieren (MÜHLHARDT, 2006). Diesem Problem begegnet man am besten mit möglichst hohen Annealingtemperaturen, sofern dies die Primersequenz zulässt. Mit steigender Temperatur sinken allerdings die Annealingwahrscheinlichkeit und damit die Ausbeute (BROWN & WITTEWER, 1998). Zusätzlich muss darauf geachtet werden, dass die Primer nicht miteinander hybridisieren. Sie sollten aus diesem Grund eine geringe Komplementarität aufweisen, sonst kann der eine Primer als Template für den anderen Primer dienen (JARMAN, 2004). Auf diese Weise würden, anstatt den gewünschten Amplifikationsprodukten, vor allem Primerdimere entstehen. Die Menge an nutzbaren Primer würde dadurch drastisch reduziert, und die Amplifikationseffizienz stark gesenkt werden. Auch die Primerkonzentration kann erheblichen Einfluss auf die Ausbeute besitzen.

Bei der Konzeption einer auf die Identifizierung von Polymorphismen oder Mutationen optimierten PCR mit Hybridisierungssonden sind mehrere Parameter zu beachten (MEUER & WITTEWER, 2005): Die Hybridisierungssonden markieren in der Schmelzkurvenanalyse spezifisch Nukleotide, und somit den möglichen Basenpaaraustausch (ATAKAN & BÄHRING, 2007). Dafür wird der  $T_m$  der Sensorsonde analysiert. Die Sensorsonde darf nicht weiter als vier Basen vom Strangende liegen und die Mutationsstelle sollte ungefähr in der Mitte der Sensorsonde liegen (MEUER & WITTEWER, 2005; WITTEWER *et al.*, 2001). Idealerweise hybridisiert die Ankersonde in einem Genabschnitt, in dem keine Polymorphismen erwartet werden, und besitzt einen höheren Schmelzpunkt als die Sensorsonde. Damit wird weitgehend sichergestellt, dass Veränderungen des Schmelzpunktes, Variationen unter der Sensorsonde zugeordnet werden können

(MEUER & WITTWER, 2005). Um einen ausreichenden *FRET* zu gewährleisten sollte der Abstand zwischen der Ankersonde und der Sensorsonde 1-5 Basen betragen und für die *T<sub>m</sub>*-Analyse sollte die Sequenzlänge der Sensorsonde größer als die der Ankersonde sein. Prinzipiell sind für saubere Schmelzkurven und größere *T<sub>m</sub>*'s GC-reiche Sequenzen nach Möglichkeit zu meiden. Die untersuchten Polymorphismen sollten nicht näher als 3 Basen von einem der beiden Enden der Sensorsonde entfernt liegen. Zusätzlich sollte auf festbindende Sequenzmotive bei den Sonden verzichtet werden, da sonst der Effekt der Fehlpaarung überdeckt wird. Außerdem sollten sie keine *Stem-Loop*-Sequenzen enthalten (LAY & WITTWER, 1997). Auch GT-Fehlpaarungen sollten vermieden werden, da diese zu einer *T<sub>m</sub>*-Reduzierung von 2- 4°C führen könnten. In diesem Fall sollte die Sonde besser auf den komplementären Strang gelegt werden (AC-Fehlpaarung) (CUI *et al.*, 2007).

Wichtig für die Analyse des Basenaustausches ist die richtige Annealingtemperatur der Sonden, da es anderenfalls zu *Mismatch*-Verbindungen kommen kann (MÜHLHARDT, 2006). Auf diese Weise würden keine genauen Signale generiert werden und es könnte kein Nachweis der spezifischen Sondenbindung über die Schmelzkurve, und somit auch keine Genotypisierung erbracht werden (BROWN & WITTWER, 1998).

Diesen Problemen begegnete man in dieser Studie mit eigens designten Sonden und Primern und deren gezielter Austestung für eine qualitative PCR. Außerdem wurden die verschiedenen Genotypen mittels eines unabhängigen Sequenzierungsunternehmens bestätigt.

### **7.3.3. Genotypisierung**

Bei dem Genotypisierungsprogramm des LightCycler 480 handelt es sich um keine vollautomatische Auswertung. Das Programm gruppiert die Kurven abhängig vom Verlauf der Schmelzkurve zu drei Lagern, homozygot Wildtyp, homozygot Mutant und heterozygoter Typ. Um welche Basenpaarkombination und somit um welchen Genotyp es sich handelt, muss anhand der Temperatur der Melting-Peaks bestimmt werden (MONTGOMERY *et al.*, 2007). Dies sollte stichprobenartig durch eine Sequenzierung bestätigt werden.

Häufig werden Kurven, die in ihrem Verlauf eindeutig einem Genotyp zugeordnet werden können, und nur minimal in ihrer *T<sub>m</sub>*-Temperatur abweichen, als gesonderte Einzelgruppen identifiziert. Die Genauigkeit der Gruppierung hängt von der Auflösung der Schmelzkurve und diese wiederum von der Menge der akquirierten Daten pro

Grad Temperaturerhöhung ab. Die automatische Gruppierung erfolgt umso besser, je mehr Kurven zur Verfügung stehen (LAREU & RUIZ-PONTE, 2005).

#### 7.4. VERGLEICH DER FREQUENZEN DER UNTERSUCHTEN POLYMORPHISMEN MIT ANDEREN STUDIEN

Ein wichtiger Hinweis für eine geeignete Auswahl der Studienpopulation und für eine korrekte Genotypisierung der Polymorphismen ist sowohl das Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes, als auch die Vergleichbarkeit der ermittelten Genotypfrequenzen mit Daten anderer, an ethnisch vergleichbaren Populationen durchgeführter Studien (ENDO *et al.*, 2001). Im Folgenden werden die Allelfrequenzen für die untersuchten Polymorphismen mit den Daten anderer Studien aus der Literatur verglichen. In erster Linie werden Studien zum Vergleich verwendet, die in Bezug auf die vorliegende Studienpopulation gleiche geographische bzw. ethnische Abstammung aufweisen. Außerdem werden Daten der *NCBI-Datenbank* herangezogen. Das *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* ermöglicht einen Zugang zu Datenbanken für Nukleinsäuresequenzen (*Genbank*), Proteinsequenzen (*Genpept*), vererbten Krankheiten (*OMIM- Online Mendelian Inheritance on Man*) und Taxonomie Datenbanken. Alle Informationen sind untereinander verknüpft.

##### 7.4.1. OPN A-1748G: rs2728127

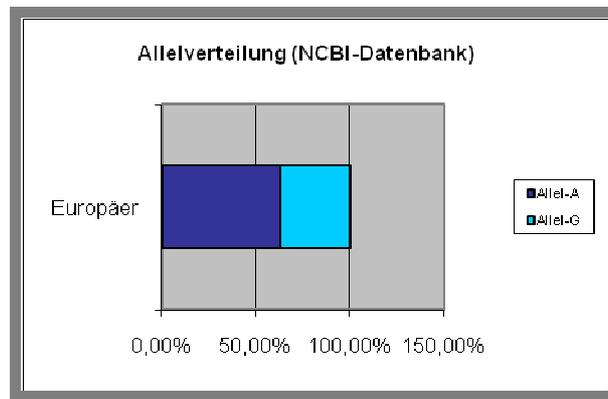
Genotypen	Eigene Kontrollgruppe	Daten aus der Literatur		
AA	47%	53,9%	Dänemark	<b>Referenz</b> <i>HUMMELSHOJ et al. 2005</i>
AG	45,2%	38,5%		
GG	7,8%	7,7%		

**Tab. 7.1.:** Vergleich der Genotyphäufigkeit für OPN A-1748G.

Ein Vergleich der Genotypen des Osteopontinpolymorphismus A-1748G der durchgeführten Studie mit einer dänischen Assoziationsstudie (HUMMELSHOJ *et al.* 2005) zeigt keine großen Abweichungen der Frequenzen. Der Wildtyp AA ist in beiden Studien mit 47% und 53,9%, der heterozygote Genotyp mit 45,2% und 38,5%, und der mutierte homozygote Genotyp mit 7,8% und 7,7% enthalten.

Die Verteilung des Allel A beträgt in der Patientengruppe 69,4% und bei den Kontrollindividuen 69,58%. Das Allel G weist einen Prozentsatz von 30,6% in der Kohorte mit Parodontitis auf und 30,42% innerhalb der gesunden Individuen.

Die Allelverteilung innerhalb der Studienpopulation wird durch die *NCBI-Datenbank* bestätigt: Hier liegt die Verteilung für das Allel A bei ca. 70% und für das Allel G bei ca. 30%. Sowohl das Auftreten der Genotypen, als auch die Allelhäufigkeit gleichen sich. Dies spricht für die geeignete Auswahl der Studienpopulation in der vorliegenden Studie und für die korrekte Genotypisierung des SNPs OPN A-1748G.



**Abb. 7.1.:** Allelverteilung des Polymorphismus OPN A-1748G

#### 7.4.2. OPN T-616G: rs2853744

Genotypen	Eigene Kontrollgruppe	Daten aus der Literatur	
GG	85,02%	91,4%	Dänemark <b>Referenz HUMMELSHOJ et al. 2005</b>
GT	15,85%	7,7%	
TT	0,13%	0,96%	

**Tab. 7.2.:** Vergleich der Genotyphäufigkeit für OPN T-616G.

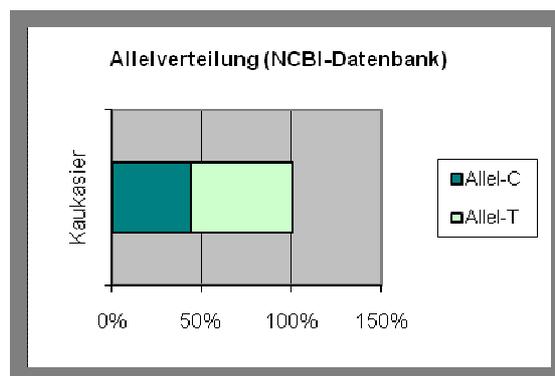
Der homozygote Genotyp GG beträgt in beiden Studien knapp 90% und der Genotyp TT liegt bei unter 1%. In der vorliegenden Studie ist allerdings der Prozentsatz des heterozygoten Genotyps mit 15% doppelt so hoch, wie in der dänischen Kohortenstudie mit 7,7% (*HUMMELSHOJ, et al., 2005*). Dies beruht unter Umständen auf unterschiedlichen exogenen Faktoren. Eine mögliche Erklärung wäre, dass dieser SNP durch die räumliche Trennung der Populationen verbunden mit einer voneinander unabhängigen Entwicklung dieser beiden Populationen aufgetreten ist, und dadurch eine Differenzierung entsteht. (*ENDO et al., 2001; COLHUON et al., 2003; STONEK, 2006*).

### 7.4.3. OPN T-443C: rs11730582

Die Frequenzen des Polymorphismus OPN T-443C der Studienpopulation lassen sich mit einer dänischen (*HUMMELSHOJ et al., 2005*) und einer italienischen Assoziationsstudie (*GIACOPELLI et al., 2004*) vergleichen. Die Verteilung des Genotyp TT zeigt mit 26,4% in der durchgeführten Studie und 29,8% in der Vergleichsstudie keine signifikante Abweichung. Auch die beiden anderen Genotypen zeigen mit 52% und 21% keine deutlichen Differenzen. Die Allele T (52%) und C (48%) unterscheiden sich nicht mit den Allelfrequenzen (50%) der italienischen Vergleichsstudie (*GIACOPELLI et al., 2004*) und für kaukasische Kohorten (*NCBI-Datenbank*).

Genotypen	Eigene Patienten	Eigene Kontrollen	Daten aus der Literatur		
TT	26,84%	26,03%	29,8%	Dänemark	<b>Referenz HUMMELSHOJ et al., 2005</b>
TC	52,15%	52,45%	44,2%		
CC	21,01%	21,52%	26%		
Allelfrequenz					
T	52,91%	52,26%	50%	Italien	<b>GIACOPELLI et al., 2004</b>
C	47,09%	47,74%	50%		

**Tab. 7.3:** Vergleich der Genotyphäufigkeit für OPN T-443C



**Abb. 7.2.:** Verteilung der Allele C und T für den Polymorphismus OPN T-443C.

### 7.4.4. OPN delG-156: rs11439060

Ein Vergleich der Genotypen des Osteopontinpolymorphismus delG-156 der vorliegenden Studie mit einer dänischen Assoziationsstudie (*HUMMELSHOJ et al. 2005*) zeigt für die Verteilung der Genotypen keine großen Abweichungen der

Frequenzen. Der Wildtyp delG/delG ist in beiden Studien mit ca. 50% und 53,8%, der heterozygote Genotyp delG/G mit ca. 40% und 40,4%, und der mutierte homozygote Genotyp GG mit ca. 8,3% und 6% enthalten. Die Verteilung des Allel delG beträgt in der Patientengruppe 72,8% und bei den Kontrollindividuen 70,5%. Das Allel G weist einen Prozentsatz von 27,8% in der Kohorte mit Parodontitis und von 29,5% in der Gruppe mit gesunden Individuen auf. Im Vergleich dazu liegt der prozentuale Anteil der Verteilung des Allel delG in einer italienischen Assoziationsstudie bei 65% und der des Allels G bei 35% (*GIACOPELLI et al., 2004*). Somit sind auch keine signifikanten Unterschiede der Allelprävalenz erkennbar.

Genotypen	Eigene Patienten	Eigene Kontrollen	Daten aus der Literatur		
delG/delG	52,65%	49,36%	53,8%	Dänemark	<b>Referenz</b> <i>HUMMELSHOJ et al., 2005</i>
delG/G	39,04%	42,29%	40,4%		
GG	8,31%	8,35%	5,8%		
Allelfrequenz					
delG	72,83%	70,5%	65%	Italien	<b>GIACOPELLI et al., 2004</b>
G	27,83%	29,5%	35%		

**Tab. 7.4.:** Vergleich der Genotyphäufigkeit für OPN delG-156.

#### 7.4.5. OPN T-66G: rs28357094

Genotypen	Eigene Patienten	Eigene Kontrollen	Daten aus der Literatur		
TT	61,46%	63,25%	61,5%	Dänemark	<b>Referenz</b> <i>HUMMELSHOJ et al., 2005</i>
TG	33,25%	31,63%	31,7%		
GG	5,29%	5,12%	6,7%		
Allelfrequenz					
T	78,09%	79,1%	78%	Italien	<b>GIACOPELLI et al., 2004</b>
G	21,91%	20,9%	22%		

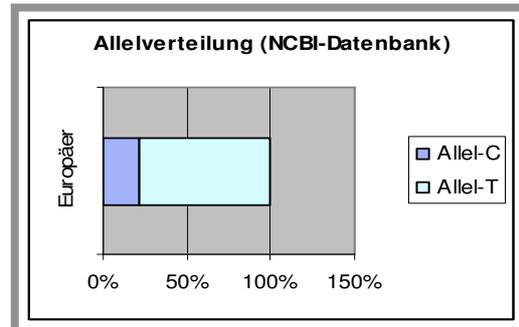
**Tab. 7.5.:** Vergleich der Genotyphäufigkeit für OPN T-66G.

Die Frequenzen des Polymorphismus OPN T-66G der Studienpopulation lassen sich ebenfalls mit der erwähnten dänischen (*HUMMELSHOJ et al., 2005*) und italienischen Assoziationsstudie (*GIACOPELLI et al., 2004*) vergleichen. Die Verteilung des Genotyps TT zeigt mit 62,4% in der durchgeführten Studie und 61,5% in der Vergleichsstudie keine signifikante Abweichung. Auch die beiden anderen Genotypen zeigen mit 32,4% und 5,2% keine deutlichen Differenzen zu der dänischen Kohorte mit 31,7% und 6,7%. Die Allele T (79%) und G (21%) unterscheiden sich nicht mit den Allelfrequenzen (78% für das Allel T und 22% für das Allel G) der italienischen Vergleichsstudie (*GIACOPELLI et al., 2004*).

#### 7.4.6. OPN T+282C: rs4754

Allelfrequenz	Eigene Patienten	Eigene Kontrollen	Daten aus der Literatur		
			Patienten	Kontrollen	Referenz
T	69,52%	63,43%	72%	28%	England <b>HENSIEK et al., 2003</b>
C	30,48%	36,57%	71%	29%	

**Tab. 7.6.:** Vergleich der Genotyphäufigkeit für OPN T+282C.



**Abb. 7.3.:** Verteilung der Allele C und T bezüglich des Polymorphismus OPN T+282C.

Durch einen Allelfrequenzvergleich des Polymorphismus OPN T+282C zwischen der vorliegenden Studienpopulation und einer englischen Assoziationsstudie (*HENSIEK et al., 2003*) lassen sich Abweichungen der Genotyphäufigkeit innerhalb der Studienpopulation zu Daten aus der Literatur feststellen. Die Verteilung des Allels T weist einen Prozentsatz von 69,5% auf. In der Kontrollgruppe beträgt dieser 63,43%. In der Vergleichsstudie zeigt sich eine prozentuale Verteilung des Allels T von 72% in der Patientengruppe und 28% bei den Kontrollindividuen. Die Verteilung des Allel C beträgt in der Studienpopulation 30,5% und 36,57%. In der englischen Assoziationsstudie sind dies 71% und 29%. Die *NCBI-Datenbank* zeigt eine Allelhäufigkeit (T=79% und C=21%), die mit der englischen Studie übereinstimmt.

Der Unterschied bezüglich der Allelfrequenz in der vorliegenden Studie, der englischen Assoziationsstudie und der *NCBI-Datenbank* kann damit erklärt werden, dass in der vorliegenden Studie eine Assoziation des Polymorphismus OPN T+282C zur chronischen Parodontitis vorhanden ist. In der Vergleichsstudie konnte dies nicht nachgewiesen werden. Aufgrund dessen kann es zu Auswirkungen auf Allelfrequenz- und Genotypverteilung kommen (*COLHUON et al., 2003; STONEK, 2006; ENDO et al., 2001*). Weiter könnte dieser Unterschied unter Umständen auf unterschiedlichen exogenen Faktoren beruhen. Auch dieser SNP könnte durch die räumliche Trennung der Populationen, verbunden mit einer voneinander unabhängigen Entwicklung dieser beiden Populationen, aufgetreten sein, und dadurch wäre eine Differenzierung der Allelhäufigkeiten möglich (*ENDO et al., 2001; COLHUON et al., 2003; STONEK, 2006*).

#### 7.4.7. OPNT+750C: rs1126616

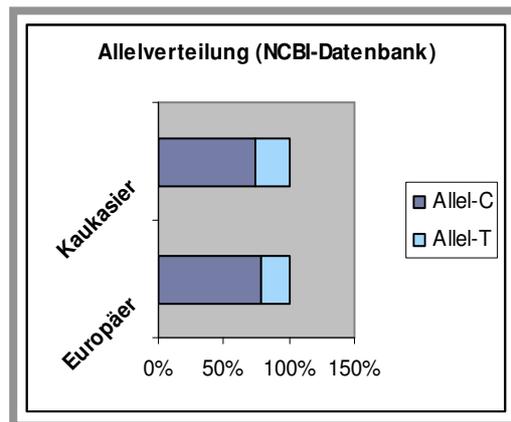
Genotypen	Eigene Patienten	Eigene Kontrollen	Daten aus der Literatur			
			Patienten	Kontrollen		
CC	48,11%	50,44%	45%	41%	Amerika	Referenz <b>WOHLFAHR T et al., 2006</b>  + <b>FORTON et al., 2002</b>
			42%	66%		
CT	43,58%	40,57%	48%	48%		
			46%	32%		
TT	8,31%	8,99%	7%	11%		
			12%	2,53%		

**Tab. 7.7.:** Vergleich der Genotyphäufigkeit für OPN T+750C.

Bei dem Vergleich der vorliegenden Studie mit zwei amerikanischen Assoziationsstudien (*FORTON et al., 2002; WOHLFAHRT et al., 2006*) können keine signifikanten Differenzen der Genotyp- und der Allelhäufigkeiten festgestellt werden. Die Verteilung des Genotyp CC in dieser Studie beträgt in der Patientengruppe 48% und in der Kontrollgruppe 50%. In den Vergleichsstudien liegt der Prozentsatz bei den Patienten bei 45% und 42%. Bei den Kontrollindividuen 41% und 66%. Der heterozygote Genotyp CT gleicht mit 44% und 41% der Genotypverteilung in der amerikanischen Kohortenstudie (*FORTON et al., 2002; WOHLFAHRT et al., 2006*). Auch bei der Variante TT sind mit 8% und 9% keine deutlichen Abweichungen zu den Vergleichsstudien mit 7,12% und 3% zu erkennen. Die geringen Differenzen beim Vergleich lassen sich dadurch erklären, dass bei den beiden anderen Studien

das untersuchte Kollektiv wesentlich kleiner war. Zusätzlich muss erwähnt werden, dass sich bei beiden Vergleichsstudien Assoziationen der Polymorphismen gezeigt haben, wodurch sich eine Auswirkung auf die Genotypverteilung ergeben kann.

Der Vergleich der Allelfrequenzverteilung innerhalb der Studienpopulation mit der *NCBI-Datenbank* zeigt ebenfalls keine Unterschiede in ihrer Häufigkeit. Das Allel C ist mit 70% und 71% in der eigenen Studienpopulation vertreten. Das Allel T mit 30%. Eine ähnliche Verteilung mit 70% und 30% findet sich in der Datenbank wieder.



**Abb. 7.4.:** Verteilung der Allele C und T bezüglich des Polymorphismus für Kaukasier und Europäer in der *NCBI-Datenbank*.

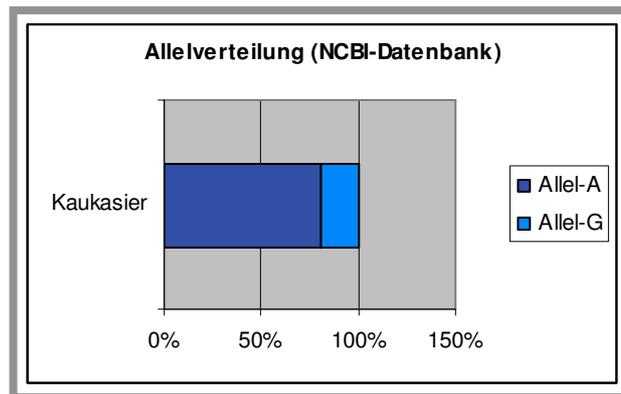
#### 7.4.8. OPN A+1083G: rs1126772

Allelfrequenz	Eigene Patienten	Eigene Kontrollen	Daten aus der Literatur		
			Patienten	Kontrollen	Referenz
A	75,96%	77,79%	76%	71%	England <b>HENSIEK et al., 2003</b>
G	24,04%	22,21%	24%	29%	

**Tab. 7.8:** Vergleich der Genotyphäufigkeit für OPN A+1083G

Bei dem Vergleich der Allelfrequenz dieses SNPs und einer englischen Assoziationsstudie (*HENSIEK et al., 2003*) zeigt sich erneut kein Unterschied in deren Auftreten und Häufigkeit. Die Verteilung des Allels A weist in der Patientengruppe einen Prozentsatz von 76% auf. In der Kontrollgruppe beträgt dieser 78%. In der Vergleichsstudie zeigt sich eine prozentuale Verteilung des Allels A von 76% bei den Patienten und 71% bei den Kontrollindividuen. Die Verteilung des Allel C beträgt in der Studienpopulation 24% und 22%. In der englischen Assoziationsstudie sind dies 24% und 29%. Auch in der *NCBI-Datenbank* findet sich für das Allel A (81%) und für das Allel G (19%) eine ähnliche Verteilung.

Dies bestätigt erneut die repräsentative Auswahl der Studienpopulation.



**Abb. 7.5.:** Allelverteilung des Polymorphismus OPN A+1083G für Kaukasier in der *NCBI-Datenbank*.

#### 7.4.9. OPN A+1239C: rs9138

Genotypen	Eigene Patienten	Eigene Kontrollen	Daten aus der Literatur		
			Genotyp	Allelfrequenz	Quelle
AA	47,83%	50,64%	50%	Referenz <i>NCBI-Datenbank</i>	
AC	47,1%	41%	45%		
CC	9,07%	8,36%	5%		
<b>Allelfrequenz</b>					
A	69,02%	71,14%	74%	England	<i>HENSIEK et al., 2003</i>
C	30,98%	28,86%	26%		

**Tab. 7.9.:** Vergleich der Genotyphäufigkeit für OPN A+1239C.

Ein Vergleich der Genotypen des Osteopontinpolymorphismus A+1239C der vorliegenden Studie mit Daten der *NCBI-Datenbank* zeigt für die Verteilung der Genotyp- und Allelhäufigkeiten keine signifikanten Abweichungen der Frequenzen. Der Wildtyp AA ist mit 48% und 51%, der heterozygote Genotyp mit 47% und 41%, und der mutierte homozygote Genotyp mit 9% und 8% enthalten. Die Daten aus der Literatur betragen für den Genotyp AA 50%, für AC 45% und für die homozygote Variante 5% (*NCBI-Datenbank*). Die Verteilung des Allel A beträgt in der Patientengruppe 69% und bei den Kontrollindividuen 71%. Das Allel G weist einen Prozentsatz von 31% in der Kohorte mit Parodontitis und 29% bei den gesunden Individuen auf. Im Vergleich mit einer englischen Assoziationsstudie, in der der

prozentuale Anteil des Allel A 74% und des Allel C 26% beträgt, zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Häufigkeiten (*HENSIEK et al., 2003*).

Insgesamt sprechen diese Beobachtungen für eine repräsentative Auswahl der Studienpopulation und eine korrekte Genotypisierung. Die geringen Unterschiede bei den Allelfrequenzen in der vorliegenden Studienpopulation im Vergleich zu den herangezogenen Daten sollten jedoch bei der Interpretation von schwachen Assoziationen berücksichtigt werden. Aus diesem Grund sollte die beobachtete Verbindung des Polymorphismus OPN T+282C in mindestens einer weiteren Replikationsstudie überprüft werden, um die Beobachtung zu bestätigen.

## **7.5. BEWERTUNG DER ERGEBNISSE AUS FUNKTIONELLER SICHT**

Die Mundhöhle bildet im menschlichen Organismus ein einzigartiges, komplexes Biotop (*MARSH, 1994; VAN STEENBERGEN et al., 1996*). Opportunistische Keime besiedeln stets die Mundhöhle. Sie konkurrieren untereinander, sowie mit pathogenen Keimen. Durch diese Konkurrenz wird beim Gesunden ein überschießendes Wachstum pathogener Spezies verhindert (*SIQUEIRA et al., 2002*). Außerdem bestehen Abwehrmechanismen, die eine bakterielle Besiedlung verhindern. Es besteht somit ein Gleichgewicht zwischen Besiedlung und Abwehr. Es sind in der Mundhöhle aber auch ökologische Nischen vorhanden, die eine Kolonisierung von Bakterien fördern (*GURENLIAN, 2007*). Im Wesentlichen sind dies Fissuren, die Zahnhalsregion, das Wurzelkanalsystem sowie kariöses Dentin. Durch eine unzureichende Mundhygiene bilden die Bakterien zunehmend einen Biofilm in Form einer subgingivalen dentalen Plaque aus, in der diese in metabolischer Kooperation leben. Dadurch werden sie unempfindlicher gegenüber mechanischer Entfernung und resistent gegenüber einer Phagozytose und Abtötung durch neutrophile Granulozyten (*MÜLLER, 2001; RATEISCHAK, 2004*). Das immunologische Gleichgewicht ist gestört. Somit kann sich eine Entzündungsreaktion der Gingiva bis hin zu einer chronischen Parodontitis entwickeln (*LOESCHE, 1999*).

## **7.6. OSTEOPONTIN IM BEZUG AUF DIE CHRONISCHE PARODONTITIS**

Das Epithel der Mundhöhle stellt einen Schutz vor Infiltration von parodontopathogenen Mikroorganismen dar. Epithelzellen besitzen die Fähigkeit, Osteopontin zu sezernieren. Dadurch ist OPN in der Lage, die Permeabilität des Epithels und die sekretorische Funktion zu beeinflussen (*BUTLER 1989; SODEK et al., 2006*). Dies kann auf die Invasion von Bakterien deutliche Auswirkungen haben,

da Osteopontin mit der Veränderung der Epithelbarrierefunktion in Verbindung steht (GASSLER *et al.*, 2002; SODEK *et al.*, 2006). Diesem Protein ist es möglich, spezifische Funktionen der Epithelzellen, die in den Schutzprozess involviert sind, zu regulieren. Der Epithelzelltod, der auch mit einer parodontalen Beschädigung einhergeht, ist mit einer steigenden Fas-Ligandenausbildung, einer erhöhten TGF- $\beta$ 1 Produktion und einer vermehrten respiratorischen Entladung assoziiert. Eine steigende OPN-Expression führt zu einer erhöhten Fas-Rezeptorenausbildung (BARKLA & GIBSON, 1999; OPHASCHAROENSUK *et al.*, 1999; HAGIMOTO *et al.*, 2002; KRUIDENIER *et al.*, 2003; SODEK *et al.*, 2006). Dadurch ist dieses Protein in der Lage, die Integrität des Epithels zu beeinflussen (SODEK *et al.*, 2006). Bei parodontalen Entzündungen steigt die Osteopontin Expression. Ein Mangel oder ein Fehlen von OPN würde zu einer steigenden Gewebedestruktion, einer deutlich erhöhten Aktivität der PMN und einer geringen Epithelregeneration führen (BATISTA-DASILVA, 2005). Durch eingeschränkte Funktion der Makrophagen (LIAW *et al.*, 1998; RITTLING *et al.*, 1998; SODEK *et al.*, 2006), ist ohne das Protein die Aktivierung des Immunsystems gestört. Da Osteopontin die Aktivierung der Makrophagen unterstützt (GIACHELLI & STEITZ, 2000; O'REGAN *et al.*, 2001; ZHU *et al.*, 2004; SODEK *et al.*, 2002, 2006), die Zell-vermittelte Immunantwort fördert (ASHKAR *et al.*, 2000; O'REGAN, 2003; SODEK *et al.*, 2006) und diese zu einer Th1-Antwort polarisiert (ASHKAR *et al.*, 2000; CHABAS *et al.*, 2001; JANSSON *et al.*, 2002; O'REGAN, 2003; SODEK *et al.*, 2006), wäre ohne das Protein das Überleben der Pathogene und die Persistenz der Monozyten wahrscheinlich. Sowohl das angeborene, als auch das adaptive Immunsystem ist in seiner Funktion beeinträchtigt, und der Entzündungszustand existiert weiter (SODEK *et al.*, 2006). Dadurch kommt es zu einer stärkeren Destruktion des parodontalen Gewebes durch gesteigerte Freisetzung von gewebeabbauenden Enzymen. Zusätzlich führt die eingeschränkte Makrophagenfunktion zu größerem Kollagenverlust und Knochenabbau. Außerdem ist ohne Osteopontin die Fibroblastenfunktion und somit die Wundheilung eingeschränkt (LIAW *et al.*, 1998; RITTLING *et al.*, 1998; SODEK *et al.*, 2006). Dies führt zur Einschränkung der Kollagensynthese und der Ablagerung von extrazellulärer Matrix (OVERALL *et al.*, 1991; SODEK *et al.*, 2006; DENHARDT *et al.*, 2001). Dadurch kommt es zu keiner parodontalen Regeneration.

Im Hinblick auf die Aufgaben von Osteopontin in Bezug auf die Epithelintegrität, in der Regulation von immunologischen Mechanismen und in der Wundheilung, wird

deutlich, in welchen möglichen Zusammenhang die Auswirkungen dieses Proteins mit der chronischen Parodontitis steht (*GASSLER et al., 2002; SODEK et al., 2006*). Zusätzlich können diese Proteinfunktionen durch genetische Polymorphismen, abhängig vom Genotyp, beeinflusst werden, und zu einer mangelhaften bzw. überschießenden Aktivität von OPN führen. In einer Assoziationsstudie wird in der Sulkusflüssigkeit von Parodontitis-Patienten die Existenz von Osteopontin nachgewiesen und dessen Konzentration ist mit der parodontalen Progression assoziiert (*KIDO et al., 2001*).

### **7.7. STUDIEN UND UNTERSUCHUNGEN ZU OSTEOPONTIN IN BEZUG AUF VERSCHIEDENE KRANKHEITEN**

Es sind direkte Verbindungen von OPN SNPs zur autoimmunen lymphoproliferativen Erkrankung, ALPS, (*CHIOCCHETTI et al., 2004*), zum systemischen Lupus erythematoses (SLE) (*D'ALFONSO et al., 2005; FORTON et al., 2002*), zur multiplen Sklerose (MS), autoimmunen Encephalomyelitis (EAE) (*CHABAS et al., 2001*) und zur Bildung von Harnsteinen (*GAO et al., 2005*) beobachtet worden. In einer japanischen Kohortenstudie wird zwar keine direkte Assoziation des Polymorphismus OPN 250 (Ala-250) zum Krankheitsbild Urolithiasis festgestellt, aber die Sequenz GCC ist in der Kontrollgruppe und die Variante GCT in der Patientengruppe stärker vertreten. Zusätzlich wurde eine unterschiedliche Transkriptionsgeschwindigkeit der beiden Sequenzen festgestellt (*YAMATE et al., 2000*). Außerdem wurde ein Zusammenhang von Osteopontin mit der chronischen Hepatitis C gefunden (*MOCHIDA et al., 2003*). Polymorphismen in der Promotorregion des Osteopontingens dienen als Marker, die die Wirksamkeit der Interferon-basierenden Therapie bei Patienten mit chronischer Hepatitis C voraussagen (*NAITO et al., 2005*). Der Einfluss des Proteins Osteopontin wird, außer in Assoziationsstudien, auch in Entzündungsmodellen für verschiedene Krankheiten untersucht. In vielen dieser Modelle ist die Intensität der Entzündungsreaktion in Abwesenheit von OPN deutlich vermindert (*O'REGAN et al., 2001; SODEK et al., 2006*). Entzündungskrankheiten, wie fibröse Arthritis (*YUMOTO et al., 2002; SODEK et al., 2006*) und MS (*CHABAS et al., 2001; JANSSON et al., 2002; SODEK et al., 2006*), sind in OPN-Null-Mäusen stark reduziert. Mit diesem Aspekt stimmt auch die steigende Expression von Osteopontin bei Tuberkulose und Silikose (*NAU et al., 1999; O'REGAN et al., 1999; SODEK et al., 2006*) überein.

Eine Arthritis (YAMAMOTO *et al.*, 2003; SODEK *et al.*, 2006) und Hepatitis-A induzierte Entzündung (DIAO *et al.*, 2004; SODEK *et al.*, 2006) kann durch Antikörper gegen die kryptische „SLVVYGLR“-Sequenz von Osteopontin in Mäusen unterdrückt werden. Dies stellt einen wichtigen Beweis für die Rolle von OPN in Entzündungsreaktionen dar.

Eine weitere Untersuchung zeigt, dass die Expression von Osteopontin durch Epithelzellen für die Aufrechterhaltung der Epithelbarriere des Darms (GASSLER *et al.*, 2002; SODEK *et al.*, 2006) und zum Schutz vor tubulo-interstitiellen Destruktionen bei Nierenerkrankungen (SIBALIC *et al.*, 1997; SODEK *et al.*, 2006) benötigt wird. In einem experimentellen Kolitis-Modell steigt die Destruktion intestinalen Gewebes bei OPN-Null-Mäusen stark an (BATISTA-DA-SILVA, 2005). Der Verlust der mukosalen Integrität und die entzündungsbedingte Destruktion bei Patienten mit ulzerierender Kolitis korreliert mit der Produktion von IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, TGF- $\beta$ 1 und aktivierten Granulozyten (FEDARKO *et al.*, 2000; HEUSCHKEL *et al.*, 2000; VON LAMPE *et al.*, 2000; MCKAIG *et al.*, 2003; SODEK *et al.*, 2006). Eine steigende Expression durch tubuläre Epithelzellen der Niere weist auf die kritische Rolle des Proteins in der Vermittlung der Monozyten-Infiltration hin, die zu tubulär-interstitiellen Alterationen und weiter zu einer Glomerulonephritis führt (OKADA *et al.*, 2000; SODEK *et al.*, 2006).

In einem weiteren Entzündungsmodell sind neutralisierende Antikörper für ein kryptisch Integrinbindendes Epitop von OPN, das durch Thrombinspaltung freigelegt wird, in der Lage, die Entwicklung einer Hepatitis bei normalen Mäusen zu reduzieren (DIAO *et al.*, 2004; SODEK *et al.*, 2006). Eine Überexpression an Osteopontin in transgenen Mäusen dagegen resultiert in einer massiven Lebernekrose und führt zu einer Monozyten-Infiltration aufgrund der Polarisierung der Th1-Antwort (MIMURA *et al.*, 2004; SODEK *et al.*, 2006).

## **7.8. ASSOZIATIONSSTUDIEN ZWISCHEN POLYMORPHISMEN ANDERER MEDIATOREN UND DER CHRONISCHEN PARODONTITIS**

Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-10 (IL-10) zählt zu den zentralen Regulatoren der Immunantwort als Reaktion auf eine bakterielle Infektion. Für Polymorphismen im IL-1 Gen-Cluster wird eine hohe endogene IL-10-Produktion festgestellt. IL-10 ist an der Regulation des Gewebekatabolismus und der Knochenresorption beteiligt. Diese stellen die zentralen Pathomechanismen einer chronischen Parodontitis dar. Bei Interleukin-10 (IL-10) handelt es sich um ein

antiinflammatorisch wirkendes Zytokin. In zwei publizierten Studien findet sich eine Assoziation von IL-10-Polymorphismus mit der chronischen Parodontitis (*SCAREL-CAMINAGA et al., 2004; BERGLUNDH et al., 2003; LOOS et al., 2005*). In drei anderen Studien kann dagegen keine Assoziation nachgewiesen werden (*GONZALES et al., 2002; KINANE et al., 1999; YAMAZAKI et al., 2001*). Die gefundenen Unterschiede dürften sich dadurch erklären, dass Studienpopulationen verschiedener ethnischer Herkunft, wie Japaner, Brasilianer und Schweden, analysiert wurden (*ENDO et al. 2001*).

Auch die Zytokine IL1 und IL-6 sind Schlüsselregulatoren in der Wirtsantwort auf eine mikrobiologische Infektion und bedeutende Modulatoren des extrazellulären Matrix-Katabolismus (*HOLLA et al., 2004*). Es zeigen sich einige Assoziationen des IL-1 mit der Parodontitis (*LOOS et al. 2005; HAVEMOSE-POULSEN et al. 2007*). In einer Kohortenstudie in der nordamerikanischen Bevölkerung wird für einen Genotyp (PAG), bestehend aus zwei Polymorphismen des IL-1B-Gens, ein 6-19-faches Risiko ermittelt, an chronischer Parodontitis zu erkranken (*KORNMAN et al., 1997, NEWMAN, 1997*).

Beim Vergleich verschiedener Studien zeigt sich allerdings, dass mehreren Befunden mit einer positiven Assoziation eines Gen-Polymorphismus innerhalb des IL-1B-Gens und der chronischen Parodontitis (*GALBRAITH et al., 1999; MARK et al., 2000*), eine Reihe negativer Ergebnisse gegenüberstehen (*MCDEVITT et al., 2000; PARKHILL et al., 2000*). Dies kann dadurch erklärt werden, dass die chronische Parodontitis als polygenetisches Krankheitsbild, in dem das Zusammenspiel mehrerer Gene von Bedeutung ist, anzusehen ist. In diesem sind die Polymorphismen im IL-1B-Gen von großer Bedeutung, spielen jedoch keine allein entscheidende Rolle (*DIEHL et al., 1999*).

Mehrere Hinweise auf eine Häufung von Parodontitiden in Zusammenhang mit populationsbasierten genetischen Polymorphismen an Genorten, die Proteine mit Immun-Funktion codieren, sind vorhanden. Signifikante Assoziationen zwischen einem Polymorphismus im Fc $\gamma$ RIIB-Gen und einer erhöhten Parodontitis Gefahr wird bei Japanern nachgewiesen (*KOBAYASHI et al., 2000; KOBAYASHI et al., 2001; YASUDA et al., 2003*).

Polymorphismen von Zytokinen, die eine Assoziation zur chronischen Parodontitis besitzen, können als Marker dienen, um das Erkrankungsrisiko zu diagnostizieren (*SUMER et al., 2007*). Allerdings muss beachtet werden, dass in parodontalen

Entzündungsgeschehen zusätzlich andere Risikofaktoren involviert sind (*LOOS et al., 2005*).

## **7.9. SCHLUSSFOLGERUNG**

Die vorliegende Arbeit konnte eine Assoziation des Polymorphismus OPN T+282C: rs4754 mit der chronischen Parodontitis beobachten. Für die anderen acht Osteopontin-Polymorphismen (OPN A-1748G: rs2728127, OPN T-616G: rs2853744, OPN T-443C: rs11730582, OPN delG-156: rs11439060, OPN T-66G: rs28357094, OPN T+750C: rs1126616, OPN A+1083G: rs1126772, OPN A+1239C: rs9138) ergab sich dagegen keine Verbindung zu diesem Krankheitsbild. Dies schließt jedoch nicht aus, dass eine weitere mögliche Assoziation vorhanden ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie liefern den Hinweis, dass die untersuchten neun genetisch gekoppelten Polymorphismen des Osteopontingens einen Einfluss auf die chronische Parodontitis bei mitteleuropäischen Kaukasiern haben könnten. Aufgrund der komplexen Vererbung kann der genetische Hintergrund der chronischen Parodontitis mit diesen Beobachtungen jedoch nicht ausreichend geklärt werden. In weiteren Studien muss zukünftig auch der Einfluss anderer Kandidatengene aufgeklärt werden. Plausibel ist in diesem Zusammenhang vielmehr die Erklärung, dass bei der Entstehung einer chronischen Parodontitis die komplexen Interaktionen sämtlicher potentieller Risikofaktoren miteinzubeziehen sind.

## 8. ZUSAMMENFASSUNG

In der Entstehung der chronischen Parodontitis spielen genetische Faktoren, neben der bakteriellen Mundflora und Umwelteinflüssen eine wichtige Rolle. Das Immunsystem ist maßgeblich an der Abwehr von parodontopathogenen Bakterien und an Prozessen des Gewebeabbaus beteiligt. Das Protein OPN stellt ein multifunktionelles Molekül dar, das als proinflammatorisches Zytokin und T-Lymphozytenaktivierungs-Protein eine zentrale Rolle in der Immunantwort spielt, wodurch es auch maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Integrität des Epithels beteiligt ist. Durch seine Funktion als Knochen-Matrix-Protein und extrazelluläres Matrixprotein ist es außerdem für die Wundheilung und den Knochenmetabolismus von entscheidender Bedeutung, so dass das untersuchte OPN-Gen als funktionelles Kandidatengen für die chronische Parodontitis angesehen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Polymorphismen von OPN an der Entstehung des Krankheitsbildes der chronischen Parodontitis beteiligt sind. Hierzu wurde eine Studienpopulation von 397 Patienten mit chronischer Parodontitis, sowie 781 gesunde, unverwandte Kontrollindividuen zusammengestellt. Mittels PCR, Hybridisierung und Schmelzkurvenanalyse am LightCycler 480 wurden, nach Primeraustestung, Agarosegelelektrophorese und Stichprobensequenzierung, die Allel- und Genotypfrequenzen in der Studienpopulation für acht Einzelnukleotidpolymorphismen und einen Deletionspolymorphismus des Osteopontin-Gens untersucht. Von den neun untersuchten Polymorphismen liegen fünf (OPNA-1748G, OPNT-616G, OPNT-443C, OPN delG-156, OPNT-66G) innerhalb der Promotorsequenz des Osteopontingens, der 5`-Seite. Zwei (OPNT+282C, OPNT+750C) befinden sich im sechsten codierenden und siebten codierenden Exon. Die restlichen zwei SNPs (OPN A+1083G, OPN A+1239c) sind im siebten Exon lokalisiert, stellen aber untranslatierte Bereiche dar.

Die Auswertung ergab eine signifikante Assoziation des Genotypen CC des Polymorphismus OPN T+282C für das Krankheitsbild der chronischen Parodontitis. Für die anderen acht Polymorphismen ergaben sich keine Verbindungen. Auffällig ist, dass alle neun OPN-SNPs gemeinsam im Block vererbt werden. In Bezug auf den Risikofaktor Rauchen zeigen die homozygot mutierten Genotypen von OPN T-443C und T+750C eine Assoziation.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. **Abe T., Hara Y., Aono M.:** Penetration, clearance and retention of antigen en route from the gingival sulcus to the draining lymph node of rats, 1991, J Periodont Res, 26: 429-439
2. **Adonogianaki E., Moughal N.A., Mooney J., Stirrups D., Kinane D.F.:** Acute-phase proteins in gingival crevicular fluid during experimentally induced gingivitis, 1994, J Periodont Res, 29: 196-202
3. **Allais G.:** Der orale Biofilm, 2007, Praktische Zahnheilkunde: 81-94, teamwork media GmbH
4. **Allaker R.P., Aduse-Opoku J., Batten J.E., Curtis M.A.:** Natural variation within the principal arginine-specific protease gene, prpR1, of Porphyromonas gingivalis, 1997, Oral Microbiol Immunol, 12: 298-302
5. **Alstergren P., Zhu B., Glogauer M., Mak T., Ellen R., Sodek J.:** Polarization and directed migration of murine neutrophils is dependent on cell-surface expression of CD44, 2004, J Cell Immunol, 231: 146-157
6. **American Academy of Periodontology (AAP):** Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics. Chicago; The American Academy of Periodontology 1989, I: 23-24
7. **American Academy of Periodontology (AAP):** Periodontal diseases: Pathogenesis and microbial factors. Ann Periodontol 1996, 1: 926-932
8. **American Academy of Periodontology (AAP): Lindhe J, Ranney R, Lamster I, Charles A, Chung Ch, Flemmig T, Kinane D, Listgarten M, Loe H, Schoor R, Seymour G, Somerman M: Consensus Report: Chronic Periodontitis, Ann Periodontol 1999, 4(1): 38-38**
9. **Anaissie E., Samonis G., Kontoyiannis D., Costerton J., Sabharwal U., Bodey G., Raad I.:** Role of catheter colonization and frequent hematogenous seeding in catheter-related infections, 1995, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 14: 134-7
10. **Andrian E., Grenier D., Rouabhia M.:** In vitro models of tissue penetration and destruction by Porphyromonas gingivalis, Infect Immun, 2004, 72(8): 4689-98
11. **Artakan A., Bähring S.:** Nachweis von SNPs mit einem automatischen Kapillarelektrophoresesystem und fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden, 2007, Biospektrum, 4: 309-10
12. **Ashkar S., Weber G.F., Panoutsakopoulou V., Sanchirico M.E., Jansson M., Zawaideh S.:** Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell mediated) Immunity, 2000, Science, 287: 860-864
13. **Baggiolini M. Walz A., Kunkel S.L.:** Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils, 1989, J Clin Invest, 84: 1045-1049
14. **Barkla D.H., Gibson P.R.:** The fate of epithelial cells in the human large intestine, 1999, Pathology, 31: 230-238
15. **Bartold P.M., Walsh L.J., Narayanan A.S.:** Molecular and cell biology of the gingiva, 2000, Periodontol 2000, 24: 28-55
16. **Basu S., Fenton M.J.:** Toll-like receptors: function and roles in lung disease, 2004, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 286: 887-892
17. **Batista-Da-Silva A.P., Polett A., Rittling S.R., Denhardt D.T., Sodek J., Zohar R.:** Impaired inflammatory response and increased tissue destruction in the absence of osteopontin (OPN) in a murine model of inflammatory colitis, 2005, J Cell Physiol
18. **Bayless K.J., Meininger G.A., Scholz J.M., Davis G.E.:** Osteopontin is a ligand for the alpha4beta1 integrin, 1998, J Cell Sci, 111: 1165-1174
19. **Beer R., Baumann M.A., Kielbassa A.M.:** Taschenatlas der Endodontie, Thieme Verlag, 2004, 1. Auflage

20. **Bendeck M.P., Irvin C., Reidy M., Smith L., Mulholland D. Horton M.:** Smooth muscle cell matrix metalloproteinase production is stimulated via alpha(v)beta(3) integrin, 2000, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 1467-1472
21. **Berglundh T., Donati M., Hahn-Zoric M., Hanson L.A., Padyukov L.:** Association of the -1087 IL 10 gene polymorphism with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians, 2003, *J Clin Periodontol*, 30: 249-54
22. **Bergstrom J., Eliasson S., Dock J.:** Exposure to tobacco smoking and periodontal health, 2000, *J Clin Periodontol* 27: 61–68
23. **Bergstrom J., Eliasson S., Dock J.:** A 10-year prospective study of tobacco smoking and periodontal health, 2000, *J Periodontol*, 71: 1338–1347
24. **Bernimoulin J.P.:** Recent concepts in plaque formation, 2003, *J Clin Periodontol*, 30: supp 5: 7-9
25. **Bevilacqua M.P., Prober J.S., Wheller M.E.:** Interleukin-1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes and related leukocyte cell lines, 1985, *J Clin Invest*, 76: 2003-2011
26. **Bickel M.:** The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation, 1993, *J Periodontol*, 64: 456-460
27. **Birkedale-Hansen H.:** Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction, 1993, *J Periodont Res*, 28: 500-510
28. **Boch J.A., Wara-Aswapati N., Auron P.E.:** Interleukin 1 signal transduction-current concepts and relevance to periodontitis, 2001, *J Dent Res*, 80: 400-407
29. **Borell L.N., Papapanou P.N.:** Analytical epidemiology of periodontitis, 2005, *J Clin Periodontol*, 32 Suppl: 210-213
30. **Brown R.A., Wittwer C.T.:** Rapid cycle amplification for construction of competitive templates, in genetic engineering with PCR, 1998, T. R. Horton RM, Norfolk, England, Horizon scientific press: 57-70
31. **Butler W.T.:** The nature and significance of osteopontin, 1989, *Connect Tissue Res*, 23: 123-136
32. **Caillier S., Barcellos L.F., Baranzini S.E., Swerdlin A., Lincoln R.R., Steinman L.:** Osteopontin polymorphisms and disease course in multiple sclerosis, 2003, *Genes Immun*, 4: 312-315
33. **Calladine C.R., Drew H.R., Luisi B.F., Travers A.A.:** Understanding DNA – The Molecule and How it Works, Elsevier, 3.Auflage, 2006
34. **Cate J.M.:** Biofilm, a new approach to the microbiology of dental plaque, 2006, *Odontol*, 94:1-9
35. **Chabas D., Baranzini S.E., Mitchell D., Bernard C.C., Rittling S.R., Denhardt D.T.:** The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease, 2001, *Science*, 294: 1731-1735
36. **Chakravarti A.:** Single nucleotide polymorphism: to a future of genetic medicine, *Nature*, 2001, 409: 822-823
37. **Chang Y.C., Huang F.M., Tai K.W., Yang L.C., Chou M.Y.:** Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro, 2002, *J Periodontal Res*, 37: 279–285
38. **Chellaiah M.A., Kizer N., Biswas R., Alvarez U., Strauss-Schönberger J., Rifas L.:** Osteopontin deficiency produce osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression, 2003, *Mol Biol Cell*, 14: 173-189
39. **Chen X., Wolff L., Aeppli D., Guo Z., Luan W., Baelum V., Fejeskov O.:** Cigarette smoking, salivary/gingival crevicular fluid cotinine and periodontal status. A 10-year longitudinal study, 2001, *J Clin Periodontol*, 28: 331–339
40. **Chiocchetti A., Indelicato M., Bensi T., Mesturini R., Giordano M., Sametti S.:** High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation, 2004, *Immun Biol*, 103: 1376-1382

41. **Chotár M., Vidová B., Godány A.:** Development of specific and rapid detection of bacterial pathogens in dairy products by PCR 2006, *Folia Microbiol* , 51: 639-46
42. **Christensen B., Nielsen M.S., Haselmann K.F., Petersen T.E., Sorensen E.S.:** Post-translationally modified residues of native human osteopontin are located in clusters. Identification of 36 phosphorylation and five O-glycosylation sites and their biological implications, 2005, *Boichem J*, 390: 285-292
43. **Cimasoni G.:** Crevicular fluid updated, 1983, *Monogr Oral Sci*, 12: 1-152
44. **Colhoun H.M.; McKeigue P.M., Davey Smith G.:** Problems of reporting genetic associations with complex outcomes, 2003, *Lancet*, 361: 865-872
45. **Collins F.S., McKusick V.A.:** Implication of the Human Genom Project for medical science, 2001, *JAMA*, 285: 540-544
46. **Corey L.A., Nance W.E., Hofstede P., Schenkein H.A.:** Selfreported periodontal disease in a Verginia twin population, 1993, *J Periodotol*, 64: 1205-1208
47. **Costerton J.W.:** Overview of microbial biofilms, 1995, *J Ind Microbiol*, 15: 137-40
48. **Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M.:** Microbial biofilms, 1995, *Ann Rev Microbiol*, 49: 711-745
49. **Coulthwaite L., Verran J.:** Potential pathogenetic aspects of denture plaque, 2007, *Br J Biomed Sci*, 64: 180-9
50. **Craandijk J., van Krugten M.V., Verweij C.L., van der Velden U., Loos B.G.:** Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in relation to periodontitis, 2002, *J Clin Periodontol*, 29: 28-34
51. **Craig A.M., Nemir M., Mukherjee B.B., Chambers A.F., Denhardt D.T.:** Identification of the major phosphoprotein secreted by many rodent cell lines as 2ar/ osteopontin: enhanced expression in H.ras-transformed 3T3 cells, 1988, *Biochem Biophys Res Commun*, 157:166-173
52. **Crawford J.M.:** Distribution of ICAM-1, LFA-3 and HLA-DR in healthy and diseased gingival tissues, 1992, *J Periodont Res*, 27: 291-298
53. **Cui G.H., Huang L.Q., Li X., Tang X.J., He X.R., Wang M.:** A new molecular identification method: anchored primer amplification polymorphism DNA, 2007, *Yao Xue Xue Bao*, 42: 329-35
54. **Czuszak C.A., Sutherland D.E., Billman M.A., Stein S.H.:** Prostaglandin E2 potentiates interleukin-1 $\beta$  induced interleukin-6 production by human gingival fibroblasts, 1996, *J Clin Periodontol*, 23: 635-640
55. **Dahlen G.G.:** Black-pigmented gram-negative anaerobes in periodontitis, 1993, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 6: 181-92
56. **Dakic A., Shao Q.X., D'Amico A., O'Keeffe M., Chen W.F., Shortman K.:** Development of the dendritic cell system during mouse ontogeny, 2004, *J Immunol*, 172: 1018-1027
57. **D'Alfonso S., Barizzone N., Giordano M. Chiocchetti A., Magnani C., Castelli L.:** Two single-nucleotide Polymorphism in the 5' and 3' Ends of the osteopontin gene contribute to the susceptibility to systemic lupus erythematosus, 2005, *Arthistis Rheum*, 52: 539-547
58. **Darveau R.P., Cunningham M.D., Bailey T., Seachord C., Ratcliffe K., Bainbridge B., Dietsch M., Page R.C., Aruffo A.:** Ability of bacteria associated with chronic inflammatory disease to stimulate E-selectin expression and promote neutrophil adhesion, 1995, *Infect Immun*, 63: 1311-1317
59. **Darveau R.P., Tanner A., Page R.C.:**The microbial challenge in periodontitis, 2000, *Periodontol*, 14: 12-32
60. **Davey M., Liu X., Ukai T., Jain V., Gudino C., Gibson F.C., Golenbock D., Visintin A., Genco C.A.:** Bacterial fimbriae stimulate proinflammatory activation in the endothelium through distinct TLRs, 2008, *J Immunol*, 180: 2187-95
61. **Denhardt D.T., Lopez C.A., Rollo E.E., Hwang S.M., An X.R., Walther S.E.:** Osteopontin-induced modifications of cellular functions, 1995, *Ann NY Acad Sci*, 760: 127-142

62. **Denhardt D.T., Noda M., O'Regan A.W., Pavlin D., Berman J.S.:** Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodelling, and cell survival, 2001, *J Clin Invest*, 107: 1055-1061
63. **Denhardt D.T., Giachelli C.M., Rittling S.R.:** Role of osteopontin in cellular signaling and toxic injury, 2001, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41: 723-749
64. **Dennison D.K., van Dyke T.E.:** The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease, 2000, *Periodontology*, 14: 54-78
65. **Desmoulière A.:** Factors influencing myofibroblasts differentiation during wound healing and fibrosis, 1995, *Cell Biol Int* 19: 471-476
66. **Deutsche Gesellschaft für Parodontologie e.V.:** Klassifikation der Parodontalerkrankungen, Quintessenz Verlags-GmbH, 2002
67. **Diao H., Kon S., Iwabuchi K., Kimura C., Morimoto J., Ito D.:** Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell mediated liver diseases, 2004, *Immunity*, 21: 539-550
68. **Dias I.H., Marshall L., Lambert P.A., Chapple I.L., Matthews J.B., Griffiths H.R.:** Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* increase the chemotactic and respiratory burst priming properties of the 77-amino-acid interleukin-8 variant, 2008, *Infect Immun*, 76: 317-23
69. **Diehl S.R., Wang Y., Brooks C.N., Burmeister J.A., Califano J.V., Wang S., Schenkein H.A.:** Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphisms with early-onset periodontitis, 1999, *J Periodontol*, 70: 418-30
70. **Di Mola F.F., Friess H., Scheuren A., Di Sebastiano P., Graber H., Egger B.:** Transforming growth factor-beta and their signaling receptors are coexpressed in Crohn's disease, 1999, *Ann Surg*, 229: 67-75
71. **Dietrich T., Bernimoulin J.P., Glynn R J. :** The effect of cigarette smoking on gingival bleeding, 2004, *J Periodontol*, 75: 16-22
72. **Duan Y., Fisher E., Malamud D., Golub E., Demuth D.R.:** Calcium-binding properties of SSP-5, the streptococcus gordonii M5 receptor for salivary agglutinin, 1994, *Infect Immun*, 62: 5220-5226
73. **Du Four A., Baran C., Langkamp H.L., Piesco N.P., Agarwal S.:** Regulation of differentiation of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by rhIL-1 $\beta$  and rhTNF- $\alpha$ , 1993, *J Periodont Res*, 28: 566-568
74. **Ebersole L.R., Miyasaki K.T., Christensen R.E.**  
The distribution of the antimicrobial protein, calprotectin, in normal oral keratinocytes, 1993, *Arch Oral Biol*, 37: 1217-1226
75. **Eckman L., Jung H., Yang S.K., Panja A., Fierer J., Morzycka-Wroblewska E., Kagnoff M.F.:** A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion, 1995, *J Clin Invest*, 95: 55-65
76. **Eichner J.E., dunn S.T., Perveen G., Thompson D.M., Stewart K.E., Stroehla B.C.:** Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGe review, 2002, *Am J Epidemiol*, 155: 487-495
77. **Elston R.C.:** Linkage and Association, 1998, *Genetic Epidemiol*, 15: 565-576
78. **Endo M., Thai H., Tabeta K., Kobayashi T., Yamazaki K., Yoshie H.:** Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 5' flanking region of tumor necrosis factor-alpha gene in Japanese patients with early-onset periodontitis, 2001, *J Periodontol*, 72: 1554-9
79. **Erpenstein H., Diedrich P.:** Atlas der Parodontalchirurgie, Urban&Fischer, 2004, 1. Auflage
80. **Eskan M.A., Hajishengallis G., Kinane D.F.:** Differential activation of human gingival epithelial cells and monocytes by *Porphyromonas gingivalis* fimbriae, 2007, *Infect Immun*, 75: 892-8
81. **Fabris A.S., Dirienzo J.M., Wikstrom M., Mayer M.P.:** Detection of cytolethal distending toxin activity and *cdt* genes in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates from geographically diverse populations, 2002, *Oral Microbiol Immunol.*, 17: 231-8
82. **Fang Y., Svoboda K.K.:** Nicotine inhibits human gingival fibroblast migration via modulation of Rac signalling pathways, 2005, *J Clin Periodontol*, 32: 1200-1207

83. **Fedarko N.S., Fohr B., Robey P.G., Young M.G., Fisher L.W.:** Faktor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement- mediated attack, 2000, *J Biol Chem*, 275: 1666-1672
84. **Firestein G.:** A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile, 1989, *J Immunol*, 143: 518-525
85. **Fisher L.W., Fedarko N.S.:** Six genes expressed in bone and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins, 2003, *Connect Tissue Res*, 44(Suppl 1):33-40
86. **Folwaczny M., Hickel R.:** Biofilm – Problem oder Perspektive?, 2003, *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 58: 648-659
87. **Forton A.C., Petri M.A., Goldman D., Sullivan K.E.:** An osteopontin (SPP1) polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus, 2002, *Hum Mut*, 496
88. **Fraser D.A., Loos B.G., Boman U., Van Winkelhoff A.J., Van Der Velden U., Schenck K., Dembic Z.:** Polymorphisms in an interferon-gamma receptor-1 gene marker and susceptibility to periodontitis, 2003, *Acta Odontol Scand*, 61: 297-302
89. **Friedrich M.J.:** Relating genomic research to patient care, 2000, *JAMA*, 284: 2581-2582
90. **Galbraith G.M., Hendley T.M., Sanders J.J., Palesch Y., Pandey J.P.:** Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis, 1999, *J Clin Periodontol*, 26: 705-9
91. **Gao B., Yasui T., Okada A., Tozawa K., Hayashi Y., Kohri K.:** A polymorphism of the osteopontin gene is related to urinary calcium stones, 2005, *J Urology*, 174: 1472-1476
92. **Gao C., Guo H., Wie J., Mi Z., Wai P., Kuo P.C.:** S-nitrosylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B regulates osteopontin transcription in endotoxin-stimulated murine macrophages, 2004, *J Biol Chem*, 279: 1236-1243
93. **Gapski R., Barr J.L., Sarment D.P., Layher M.G., Socransky S.S., Giannobile W.V.:** Effect of systemic matrix metalloproteinase inhibition on periodontal wound repair: a proof of concept trial, *J Periodontol*, 2004, 75: 441-52
94. **Gassler N., Autschbach F., Gauer S, Bohn J., Sido B., Otto H.F.:** Expression of osteopontin (Eta-1) in Crohn disease of terminal ileum, 2002, *Scand J Gastroenterol*, 37: 1286-1295
95. **Gemmell E., Marshall R.I., Seymour G.J.:** Cytokines and prostaglandines in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease, 2000, 14: 112-143
96. **Gemmell E., Walsh L.J., Savage N.W., Seymour G.J.:** Adhesion molecule expression in chronic inflammatory periodontal disease tissue, 1994, *J Periodontol Res*, 29: 46-53
97. **Genco R.J.:** Host responses in periodontal diseases: current concepts, 1992, *J Periodontol*, 63: 338-355
98. **Giachelli C.M., Lombardi D., Johanson R.J., Murry C.E., Almeida M.:** Evidence for a role of osteopontin in macrophages infiltration in response to pathological stimuli in vitro, 1998, *Am J Pathol*, 152: 353-358
99. **Giachelli C.M., Steitz S.:** Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization, 2000, *Matrix Biol*, 19: 615-622
100. **Giacopelli F., Marciano R., Pistorio A., Catarsi P., Canini S., Karsenty G.:** Polymorphisms in the osteopontin affect its transcriptional activity, 2004, *Physiol Genom*, 20: 87-96
101. **Gibbons R.J., Hay D.I., Schlesinger D.H.:** Delineation of a segment of adsorbedsalivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of *Streptococcus gordonii* to apatitic surfaces, 1991, *Infect Immun* 59: 2948
102. **Gibbons R.J., Hay D.I., Cisar J.O., Clark W.B.:** Adsorbed salivary proline-rich protein 1 and statherin: receptors for type 1 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatitic surfaces, 1998, *Infect Immun* 56: 2990
103. **Golub L.M., Iacono V.J., Nicoll G., Ramamurthy N., Kaslick R.S.:** The response of human sulcular leucocytes to a chemotactic challenge. A new in vivo assay, 1981, *J Periodontol Res*, 16: 171-9

104. **Gonzales J.R., Michel J., Dietsch A., Herrmann J.M., Bodeker R.H., Meyle J.:** Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 loci in aggressive and chronic periodontitis, 2002, *J Clin Periodontol*, 29: 816-22
105. **Gordon S.:** Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response, 2002, *Cell* 111: 927-930
106. **Goulet V., Britigan B., Nakayama K., Grenier D.:** Cleavage of human transferrin by *Porphyromonas gingivalis* gingipains promotes growth and formation of hydroxyl radicals, *Infect Immun*, 2004, 72: 4351-6
107. **Grbic J.T., Singer R.E., Jans H.H., Celenti R.S., Lamster I.B.:** Immunoglobulin isotypes in gingival crevicular fluid: possible protective role of IgA, 1995, *J Periodontol*, 66: 55-61
108. **Gregory R.L., Kim D.E., Kindle J.C., Hobbs L.C., Lloyd D.R.:** Immunoglobulin-degrading enzymes in localized juvenile periodontitis, 1992, *J Periodont Res*, 27: 176-183
109. **Grenier D., Belanger M.:** Protective effects of *porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles against bactericidal activity of human serum, 1991, *Infect Immun*, 59: 3004-3008
110. **Gurenlian J.R.:** The role of dental plaque biofilm in oral health, 2007, *J Dent Hyg*, 81: 116
111. **Haanen J.B., de Waal Malefijt R., Res P.C., Kraakman E.M., Ottenhoff T.H., de Vries R.R., Spits H.:** Selection of a human T-helper type 1-like T cell subset by mycobacteria, 1991, *J Exp Med*, 174: 583-592
112. **Haber J., Wattles J., Crowley M., Mandell R., Joshipura K., Kent R.L.:** Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis, 1993, *J Periodontol*, 64: 16-23
113. **Haffajee A.D., Socransky S.S.:** Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles, 2001, *J Clin Periodontol*, 28: 283-295
114. **Hagimoto N., Kuwano K., Inoshima I., Yoshimi M., Nakamura N., Fujita M.:** TGF- $\beta$  as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells, 2002, *J Immunol*, 168: 6470-6478
115. **Hampe J., Cuthbert A., Croucher P.J.P., Mirza M.M., Mascheretti S., Fisher S., Frenzel H., King K., Hasselmeier A., Mc Pherson A.J.S., Bridger S., van Deventer S., Forbes A., Nikolaus S., Lennard-Jones J.E., Foelsch U.R., Krawczak M., Lewis C., Schreiber S., Mathew C.G.:** Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations, 2001, *Lancet*, 357: 1925-1928
116. **Hanioka T., Tanaka M., Takaya K., Matsumori Y., Shizukuishi S.:** Pocket oxygen tension in smokers and non-smokers with periodontal disease, 2000, *J Periodontol*, 71: 550-554
117. **Hart T.C.:** Genetic consideration of risk in human periodontal disease, 1994, *Curr Opin Periodontol*, 3-11
118. **Hart T.C.:** Genetic risk-factors for early-onset periodontitis, 1996, *J Periodontol*, 67: 355-366
119. **Hassell T.M., Harris E.L.:** Genetic influence in caries and periodontal disease, 1995, *Crit Rev Oral Biol Med*, 6: 319-342
120. **Haslett C., Savill J.S., Whyte M.K., Stern M., Dransfield J., Meagher L.C.:** Granulocyte apoptosis and the control of inflammation, 1994, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 345: 327-333
121. **Havemose-Poulsen A., Sørensen L.K., Bendtzen K., Holmstrup P.:** Polymorphism within the IL-1 gene cluster: effects on cytokin profiles in peripheral blood and whole blood cell cultures of patients with aggressive periodontitis, juvenile idiopathic arthritis, and rheumatoid arthritis, 2007, *J Periodontol*, 78: 475-92
122. **Hayden M.J., Nguyen T.M., Waterman A., Chalmers K.J.:** Multiplex-Ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP genotyping, 2008, *BMC Genomics*, 9: 80
123. **Heasman P.A., Collins J.G., Offenbacher S.:** Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1 $\beta$ , leukotriene B<sub>4</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>, thromboxane B<sub>2</sub> and tumor necrosis factor- $\alpha$  in experimental gingivitis in humans, 1993, *J Periodont Res*, 28: 241-247
124. **Hedges S., Agace W., Svensson M., Sjögren A.C., Ceska M., Svanborg C.:** Uroepithelial cells are part of a mucosal cytokine network, 1994, *Infect Immun*, 62: 2315-2321

125. **Heinzelmann M., Mercer-Jones M.A., Passmore J.C.:** Neutrophils and renal failure, 1999, *Am J Kidney Dis*, 34: 384-399
126. **Hellwig E., Klimek J., Attin T.:** Einführung in die Zahnerhaltung, Urban&Fischer Verlag, 3. Auflage, 2003
127. **Hemmerle J., Frank R.M.:** Bacterial invasion of periodontaltissue after experimental immunosuppressions in rats, 1991, *J Biol Buccale*, 19: 271-282
128. **Henderson B., Nair S.P., Ward J.M., Wilson M.:** Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, 2003, *Annu Rev Microbiol.*, 57: 29-55
129. **Hensiek A.E., Roxburgh R., Meranian M., Seaman S., Yeo T., Compston D.A.S., Sawcer S.J.:** Osteopontin gene and clinical severity of multiple sclerosis, 2003, *J Neurol*, 250: 943-947
130. **Heuschkel R.B., MacDonald T.T., Monteleone G., Bajaj-Elliott M. Smith J.A., Pender S.L.:** Imbalance of stromelysin-1 and TIMP-1 in the mucosal lesions of children with inflammatory bowel disease, 2000, *Gut*, 47: 57-62
131. **Higuchi Y., Tamura Y., Uchida T., Matsuura K., Hijiya N., Yamamoto S.:** The roles of soluble osteopontin using osteopontin-transgenic mice in vivo: proliferation of CD4+ T lymphocytes and the enhancement of cell-mediated immune response, 2004, *Pathology*, 71: 1-11
132. **Hirschhorn J.N., Lohmueller K., Byrne E., Hirschhorn K.A.:** Comprehensive review of genetic association studies, 2002, *Genet Med*, 4: 45-61
133. **Hodge P., Michalowicz B.:** Genetic predisposition to periodontitis in children and young adults, 2001, *Periodontol*, 26: 113-134
134. **Hodge S.E.:** Linkage analysis versus association analysis: distinguishing between two models that explain disease-marker associations, 1993, *Am J Hum Genet*, 53: 367-384
135. **Hodge S.E.:** What association analysis can and cannot tell us about the genetics of complex disease, 1994, *Am J Med Genet*, 54: 318-323
136. **Hogrefe H.:** Archaeal dUTPase enhances PCR amplifications with archaeal DNA polymerases by preventing dUTP incorporation, 2002, *Proc Natl Acad Sci*, 99: 596-601
137. **Holla L.I., Fassmann A., Stejskalova A., Znojil V., Vanek J., Vacha J.:** Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis, 2004, *J Periodontol*, 75: 30-6
138. **Hummelshoj T., Ryder L.P., Madsen H., Odum N., Svejgaard A.:** A functional polymorphism in the *Eta-1* promoter is associated with allele specific binding to the transcription factor Sp1 and elevated gene expression, 2006, *Mol Immunol*, 43: 980-986
139. **Hsu S.D., Cisar J.O., Sandberg A.L., Kilian M.:** Adhesive properties of viridans streptococcal species, 1994, *Microb Ecol Health Dis*, 7: 125-137
140. **Ide M., Yamate J., Machida Y., Nakanishi M., Kuwamura M., Kotani T.:** Emergence of different macrophage populations in hepatic fibrosis following thioacetamide-induced acute hepatocyte injury in rats, 2003, *J Comp Pathol*, 128: 41-51
141. **Ina K., Itoh J., Fukushima K., Kusugami K., Yamaguchi T., Kyokane K.:** Resistance of Crohn's disease T cell to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl/Bax mucosal imbalance, 1999, *J Immunol*, 163: 1081-1090
142. **Irwin C., Mullally B., Ziada H., Allen E., Byrne P.J.:** Periodontics: 2. risk factors and susceptibility in periodontitis, 2007, *Dent Update*, 34: 270-2, 275-6
143. **Ishikawa I., Nakashima K., Koseki T., Nagasawa T., Watanabe H., Arakawa S., Nitta H., Nishihara T.:** Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis, 2000, *Periodontology*, 14: 79-111
144. **Itagaki M., Kubota T., Tai H., Shimada Y., Morozumi T., Yamazaki K.:** Matrix metalloproteinase-1 and -3 gene promoter polymorphisms in Japanese patients with periodontitis, *J Clin Periodontol*, 2004, 31: 764-9
145. **Iwasaki A., Medzhitov R.:** Toll-like receptor control of adaptive immune response, 2004, *Nat Immunol*, 5: 987-995

- 146. Jaeschke H., Smith C.W.:** Mechanism of neutrophil-induced parenchymal cell injury, 1997, *J Leukoc Biol*, 61: 647-653
- 147. Janson H.:** Studies on periodontitis and analyses of individuals at risk for periodontal diseases, 2006, *Swed Dent J Suppl*, 180:5-49
- 148. Jansson M., Panoutsakopoulou V., Barker J., Klein L., Cantor H.:** Cutting edge: attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in eta-1/ osteopontin- deficient mice, 2002, *J Immunol*, 168: 2096-2099
- 149. Jarman S.N.:** Amplification: software for designing PCR primers on aligned DNA sequences, 2004, *Bioinformatics*, 20: 1644-5
- 150. Jarvis M.J., Primatesta P., Erens B., Feyerabend C., Bryant A.:** Measuring nicotine intake in population surveys: comparability of saliva cotinine and plasma cotinine estimates, 2003, *Nicotine Tob Res*, 5: 349–355
- 151. Jelaska A., Korn J.H.:** Role of apoptosis and transforming growth factor betq 1 in fibroblasts selection and activation in systemic sclerosis, 2000, *Arthritis Rheum*, 43: 2230-2239
- 152. Jenkins K., Javadi M., Borghaei R.C.:** Interleukin-4 suppresses IL-1-induced expression of matrix metalloproteinase-3 in human gingival fibroblasts, *J Periodontol*, 2004, 75: 283-91
- 153. Jeong Y.J., Choi H.W., Shin H.S., Cui X.S., Kim N.H., Gerton G.L., Jun J.H.:** Optimization of real time RT-PCR methods for the analysis of gene expression in mouse eggs and preimplantation embryos, 2005, *Mol Reprod Dev*, 71: 284-9
- 154. Johnson N.W., Curtis M.A.:** Preventive therapy for periodontal disease, 1994, *Adv Dent Res*, 8: 337-48
- 155. Katagiri Y.U., Sleeman J., Fujii H., Herrlich P., Hotta H., Tanaka K.:** CD44 variants but not CD44s cooperate with beta1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis, 1999, *Cancer Res*, 59: 219-226
- 156. Kawano H., Cody R.J., Graf K., Goetze S., Kawano Y., Schnee J.:** Angiotensin II enhance Integrin and alpha-actinin expression in adult rat cardiac fibroblasts, 2000, *Hypertension*, 35: 273-279
- 157. Kerdvongbundit V., Wikesjo U.M.:** Effect of smoking on periodontal health in molar teeth, 2000, *J Periodontol*, 71: 433–437
- 158. Khoury A.E., Lam K., Ellis B., Costerton J.W.:** Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices, 1992, *Am Soc Artif Intern Organs*, 38:174-178
- 159. Khoury M.J., McCabe E.R.:** Population screening in the age of genomic medicine, 2003, *N Engl J Med*, 348: 50-58
- 160. Kido J., Nakamura T., Asahara Y., Sawa T., Kohri K., Nagata T.:** Osteopontin in gingival crevicular fluid, 2001, *J Periodont Res*, 36: 328-333
- 161. Kikuchi K., Tanaka A., Miyakawa H., Kawashima Y., Kawaguchi N., Matsushita M.:** Eta-1/osteopontin genetic polymorphism and primary biliary cirrhosis, 2003, *Hepat Res*, 26: 87-90
- 162. Kinane D.F.:** Causation and pathogenesis of periodontal disease, 2001, *Periodontol*, 25: 8-20
- 163. Kinane D.F., Adonogianaki E., Monghal N., Winstanley F.P., Mooney J., Thornhill M.:** Immunocytochemical characterization of cellular infiltrate, related endothelial changes and determination of GCF acute phase proteins during humans experimental gingivitis, 1991, *J Periodont Res*, 26: 286-288
- 164. Kinane D.F., Hart T.C.:** Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease, 2003, *Crit Rev Oral Biol Med*, 14: 430-49
- 165. Kinane D.F., Hodge P., Eskdale J., Ellis R., Gallagher G.:** Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 and tumour necrosis factor loci in early-onset periodontitis, 1999, *J Periodontal Res*, 34: 379-86
- 166. Kinane D.F., Shiba H., Hart T.C.:** The genetic basic of periodontitis, 2005, *Periodontolgy*, 39: 91- 117

167. **Kinane D.F., Winstanley F.P., Adonogianaki E., Moughal N.A.:** Bioassay of interleukin-1 (IL-1) in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis, 1992, *Arch Oral Biol*, 37: 153-156
168. **Kobayashi T., Sugita N., Van Der Pol W.L., Nunokawa Y., Westerdaal N.A., Yamamoto K., Van De Winkel J.G., Yoshie H.:** The Fc gamma receptor genotype as a risk factor for generalized early-onset periodontitis in Japanese patients, *J Periodontol*, 2000, 71: 1425-32
169. **Kobayashi T., Westerdaal N.A., Miyazaki A., van der Pol W.L., Suzuki T., Yoshie H., van de Winkel J.G., Hara K.:** Relevance of immunoglobulin G Fc receptor polymorphism to recurrence of adult periodontitis in Japanese patients, 1997, *Infect Immun*, 65: 3556-3560
170. **Kobayashi T., Yamamoto K., Sugita N., Van Der Pol W.L., Yasuda K., Kaneko S., Van De Winkel J.G., Yoshie H.:** The Fc gamma receptor genotype as a severity factor for chronic periodontitis in Japanese patients, *J Periodontol*, 2001, 72: 1324-31
171. **Koguchi Y., Kawakami K., Uezu K., Fukushima K., KonS., Maeda M.:** High plasma osteopontin level and its relationship with interleukin-12-mediated type 1 T helper cell response in tuberculosis, 2003, *Am J Respir Crit Care Med*, 167: 1355-1359
172. **Koh A., da Silva A.P., Bansal A.K., Bansal M., Sun C., Lee H., Glogauer M., Sodek J., Zohar R.:** Role of osteopontin in neutrophil function, 2007, *Immunology*, 122: 466-75
173. **Kornman K.S., Crane A., Wang H.Y., Di Giovine F.S., Newman M.G., Pirk F.W., Wilson T.G., Jr., Higginbottom F.L., Duff G.W.:** The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease, *J Clin Periodontol*, 1997, 24: 72-7
174. **Kornman K.S., di Giovine F.S.:** Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis, 1998, *Ann Periodontol*, 3: 327-38
175. **Kornmann K.S., Page R.C., Tonetti M.S.:** The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players, 2000, *Periodontol*, 14: 33-53
176. **Kornman K.S.:** Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look, 2008, *J Periodontol*, 79: 1560-1568
177. **Kruidenier L., Kuiper I., Lamers C.B., Verspaget H.W.:** Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localisation, and association with mucosal antioxidants, 2003, *J Pathol*, 201: 28-36
178. **Kurita-Ochiai T., Fukushima K., Ochiai K.:** Butyric acid-induced apoptosis of murine thymocytes, splenic T cells, and human jurkat T cells, 1997, *Infect Immun*, 65: 35-41
179. **Kurtovic J., Segal I.:** Recent advances in biological therapy for inflammatory bowel disease, 2004, *Trop Gastroenterol*, 25: 9-14
180. **Langendijk P.S., Hanssen J.T., Van Der Hoeven J.S.:** Sulfate-reducing bacteria in association with human periodontitis, *J Clin Periodontol*, 2000, 27: 943-50
181. **Lao M., Marino V., Barthold P.M.:** Immunohistochemical study of bone sialoprotein and osteopontin in healthy and diseased root surfaces, 2006, *J Periodontol*, 77: 1665-73
182. **Lareu M.V., Ruiz-Ponte C.:** Genotyping SNPs with the LightCycler, 2005, *Methods Mol Biol*, 297: 127-40
183. **Lay M. J., Wittwer C.T.:** Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR, 1997, *Clic Chem*, 43: 2262-2267
184. **Li C., Pan Y.P., Lin L.:** rgpB genetic polymorphism of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque, 2006, *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 41: 674-7
185. **Li L., Michel R., Cohen J., Decarlo A., Kozarov E.:** Intracellular survival and vascular cell-to-cell transmission of *Porphyromonas gingivalis*, 2008, *BMC Microbiol*, 6: 26
186. **Li X., O'Regan A.W., Bermann J.S.:** IFN-gamma induction of osteopontin expression in human monocytoid cells, 2003, *J Interferon Cytokin Res*, 23: 259-265
187. **Liaw L., Birk D.E., Ballas C.B., Whitsitt J.S., Davison J.M., Hogan B.L.:** Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1), 1998, *J Clin Invest*, 101: 1468-1478

188. **Lin Y.H., Yang-Yen H.F.:** The osteopontin-CD44 survival signal involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway, 2001, *J Biol Chem*, 276: 4624-4630
189. **Lindhe J., Karring T., Lang N.P.:** *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 2002, 3. Auflage, Munksgaard
190. **Loesche W.J.:** Chemotherapy of dental plaque infections, 1976, *Oral Sci Rev*, 9:65-107
191. **Loesche W.J.:** The antimicrobial treatment of periodontal disease: changing the treatment paradigm, 1999, *Crit Rev Oral Biol Med*, 10: 245-275
192. **Loos B.G., John R.P., Laine M.L.:** Identification of genetic risk factors for periodontitis and its possible mechanisms of action, 2005, *L Clin Periodontol*, 6: 159-79
193. **Lopnow H., Brade H., Dürrbaum I., Dinarello C.A., Kusukoto S., Rietschel E.T., Flad H.D.:** IL-1 induction-capacity of defined lipopolysaccharide partial structures, 1989, *J Immunol*, 142: 3229-3238
194. **Macheleidt A., Muller H.P., Eger T., Putzker M., Zoller L.:** Clonal diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates from young adults with minimal periodontal disease, 1999, *J Periodontal Res.*, 34: 179-87
195. **Male D.:** *Immunology: An Illustrated Outline*, Elsevier Science Limited, 4. Auflage, 2004
196. **Mark L.L., Haffajee A.D., Socransky S.S., Kent R.L., Jr., Guerrero D., Kornman K., Newman M., Stashenko P.:** Effect of the interleukin-1 genotype on monocyte IL-1beta expression in subjects with adult periodontitis, 2000, *J Periodontal Res*, 35: 172-7
197. **Marroquin C.E., Downey L., Guo H., Kuo P.C.:** Osteopontin increases CD44 expression and cell adhesion in RAW 264.7 murin leukaemia cells, 2004, *Immunol Lett*, 95: 109-112
198. **Marsh P.D.:** Microbial ecology of dental plaque and its significans in health and disease, 1994, *Adv Dent Res*, 8: 263-71
199. **Mathew C.G., Lewis C.M.:** Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects. *Hum Mol Genet*. 2004;13 Spec, 1: 161-168
200. **Mazzali M., Hughes J., Dantas M., Liaw L., Seitz S., Alpers C.E.:** Effects od cyclosporine in Osteopontin null mice, 2002, *Kidney Int*, 62: 78-85
201. **Mcdevitt M.J., Wang H.Y., Knobelmann C., Newman M.G., Di Giovine F.S., Timms J., Duff G.W., Kornman K.S.:** Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice, 2000, *J Periodontol*, 71: 156-63
202. **Mcguire M.K., Nunn M.E.:** Prognosis versus actual outcome. IV. The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival, 1999, *J Periodontol*, 70: 49-56
203. **McKaig B.C., Hughes K., Tighe P.J., Mahida Y.R.:** Differential expression of TGF-beta isoforms by normal and inflammatory bowel disease intestinal myofibroblasts, 2002, *Am J Physiol Cell Physiol*, 282: 172-182
204. **McKaig B.C., McWilliams D., Watson S.A., Mahida Y.R., Brannigan A.E., Watson R.W.:** Expression and regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and metalloproteinases by intestinal myofibroblasts in inflammatory bowel disease, 2003, *Am J Pathol*, 162: 1355-1360
205. **McKnee M.D., Nanci A.:** Secretion of osteopontin by macrophages and its accumulation at tissue surfaces during wound healing in mineralized tissue: a potential requirement for macrophage adhesion and phagocytosis, 1996, *Anat Rec*, 245: 394-409
206. **Meikle M.C., Hembry R.M., Holley J., Horton C., Mc Farlane C.G., Reynolds J.J.:** Immunolocalization of matrix metalloproteinases and TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases) in human gingival tissue from periodontitis patients, 1994, *J Periodont Res*, 29: 118-126
207. **Meuer S., Wittwer C.T.:** Rapid Cycle Real-Time PCR, 2005, *Eur Respir J*, 25: 376-9
208. **Michalowicz B.S.:** Genetic and heritable risk factors in periodontal disease, 1994, *J Periodontol*, 65: 479-488

209. **Michalowicz B.S., Aeppli D.P., Kuba R.K., Bereuter J.E., Conry J.P., Segal N.L., Bouchard T.J. Jr., Pihlstrom B.L.:** A twin study of genetic variation in proportional radiographic alveolar bone height, 1991, *J Dent Res*, 70: 1431–1435
210. **Michalowicz B.S., Diehl S.R., Gunsolley J.C., Sparks B.S., Brooks C.N., Koertge T.E., Califano J.V., Burmeister J.A., Schenkein H.A.:** Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis, 2000, *J Periodonol*, 71: 1699-1707
211. **Michalowicz B.S., Wolff L.F., Klump D., Hinrichs J.E., Aeppli D.M., Bouchard T.J. Jr., Pihlstrom B.L.:** Periodontal bacteria in adult twins, 1999, *J Periodontol*, 70: 263–273
212. **Mimura S., Mochida S., Inao M., Matsui A., Nagoshi S., Yoshimoto T.:** Massive liver necrosis after provocation of imbalance between Th1 and Th2 immune reactions in osteopontin transgenic mice, 2004, *J Gastroenterol*, 39: 867-872
213. **Miyasaki K.T., Bodeau A.L., Pohl J., Shafer W.M.:** Bactericidal activities of synthetic human leukocyte cathepsin G-derived antibiotic peptides and congeners against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Capnocytophaga sputigena*, 1993, *Antimicrob Agents Chemother*, 37: 2710-2715
214. **Miyazaki Y., Tashiro T., Higuchi Y., Setoguchi M., Yamamoto S., Nagai H.:** Expression of osteopontin in macrophage cell line and in transgenic mice with pulmonary fibrosis resulting from the lung expression of a tumor necrosis factor- $\alpha$  transgene, 1995, *Ann NY Acad Sci*, 760: 334-341
215. **Mochida S., Hashimoto M., Matsui A., Naito M., Inao M., Nagoshi S.:** Genetic polymorphism in promoter region of osteopontin gene may be a marker reflecting hepatitis activity in chronic hepatitis C patients, 2004, *Biochem Biophys Res Comm*, 313: 1079-1085
216. **Mombelli A., Casagni F., Madianos P.N.:** Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review, 2002, *J Periodontol*, 29: 10-21
217. **Montgomery J., Wittwer C.T., Palais R., Zhou L.:** Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis, 2007, *Nat Protoc*, 2: 59-66
218. **Mosman T.R., Sad S.:** The expanding universe of T-cell subsets : Th1, Th2 and more, 1996, *Immunol Today*, 17: 138-146
219. **Moughal N.A., Adonogianaki E., Tornhill M.H., Kinane D.F.:** Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM) expression in gingival tissue during health and experimentally-induced gingivitis, 1992, *J Periodont Res*, 27: 623-630
220. **Mowat A.M., Donachie A.M., Parker L.A., Robson N.C., Beacock-Sharp H., McIntyre:** The role of dendritic cells in regulating mucosal immunity and tolerance, 2003, *Novartis Found Symp*, 252: 291-302
221. **Mühlhard C.:** *Molekularbiologie/ Genomics*, Elsevier, 5.Auflage, 2006
222. **Müller H.P.:** *Parodontologie*, Thieme Verlag, 2001
223. **Mukaida N., Harada A., Yasumoto K., Matsushima K.:** Properties of pro-inflammatory cell type specific leukocyte chemotactic cytokines, interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF), 1992, *Microbiol Immunol*, 36: 773-789
224. **Mutschelknauss R.E.:** *Lehrbuch der klassischen Parodontologie*, Quintessenz Verlags-GmbH, 2000
225. **Nagai S., Hashimoto S., Yamashita T., Toyoda N., Satoh T., Suzuki T.:** Comprehensive gene expression profile of human activated T(h)1- and T(h)2-polarized cells, 2001, *Int, Immunol*, 13: 367-376
226. **Nagasawa T., Nitta H., Watanabe H., Ishikawa I.:** Reduced CD8+ peripheral blood lymphocytes in rapidly progressive periodontitis, 1995, *Arch Oral Biol*, 40: 605-608
227. **Nagata E., Kondo T., Ayasaka N., Nagata M., Tanaka T.:** Immunohistochemical study of nerve fibres with substance P- or calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the junctional epithelium of developing rats, 1992, *Arch Oral Biol*, 37: 655-662

- 228. Nagata T., Todescan R., Goldberg H.A., Zhang Q., Sodek J.:** Sulphation of secreted phosphoprotein I (SPPI, osteopontin) is associated with mineralized tissue formation, 1989, *Biochem Biophys Res Commun*, 165: 234-240
- 229. Nagler-Anderson C., Bhan A.K., Podolsky D.K., Terhorst C.:** Control freaks: immune regulatory cells, 2004, *Nat Immunol*, 5: 119-122
- 230. Naito M., Matsui A., Inao M., Nagoshi S., Nagano M., Ito N.:** SNPs in the promoter region of the osteopontin gene as a marker predicting the efficacy of the interferon-based therapies in patients with chronic hepatitis C, 2005, *J Gastro Enterol*, 40: 381-388
- 231. Nakao S., Fuji A., Niederman R.:** Alteration of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in resting and stimulated human neutrophil by short-chain carboxylic acids at neutral pH, 1992, *Infect Immun*, 60: 5307-5311
- 232. Nau G.J., Liaw L., Chupp G.L., Berman J.S., Hogan B.L., Young R.A.:** Attenuated host resistance against *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice lacking osteopontin, 1999, *Infect Immun*, 67: 4223-4230
- 233. Newman M.G.:** Genetic risk for severe periodontal disease, *Compend Contin Educ Dent*, 1997, 18: 881-4
- 234. Niino M., Kikuchi S., Fukazawa T., Yabe I., Tashiro K.:** Genetic polymorphism of osteopontin in association with multiple sclerosis in Japanese patients, 2003, *J Neuro Immun*, 136: 125-129
- 235. Nisengard R.J.:** The role of immunology in periodontal disease, 1977, *J Periodontol*, 48: 505-516
- 236. Nyman S., Lindhe J.:** Examination of patients with periodontal disease, **In: Lindhe J., Karring T., Lang N.P.:** Clinical periodontology and implant dentistry, Munksgaard, Copenhagen, 1997, 383-395
- 237. Offenbacher S.:** Periodontal disease: pathogenesis, 1996, *Ann Periodontol*, 1: 821-78
- 238. Offenbacher S., Barros S.P., Singer R.E., Moss K., Williams R.C., Beck J.D.:** Periodontal disease at the biofilm-gingival interface, 2007, *J Periodontol*, 34: 1911-1925
- 239. Offenbacher S., Farr D.H., Goodson J.M.:** Measurement of prostaglandin E in crevicular fluid, 1981, *J Clin Periodontol*, 8: 319-327
- 240. Ogawa D., Stone J.F., Takata Y., Blaschke F., Chu V.H., Towler D.A.:** Liver X receptor agonists inhibit cytokine-induced osteopontin expression in macrophages through interferences with activator protein-1 signaling pathway, 2005, *Circ Res*, 96: 59-67
- 241. Ohshima S., Yamaguchi N., Nishioka K., Mima T., Ishii T., Umeshita-Sasai M.:** Enhanced local production of Osteopontin in rheumatoid joints, 2002, *J Rheumatol*, 29: 2061-2067
- 242. Okada H., Moriwaki K., Konishi K., Kobayashi T., Sugahara S., Nakamoto H.:** Tubular osteopontin expression in human glomerulonephritis and renal vasculitis, 2000, *Am J Kidney Dis*, 36: 498-506
- 243. Ophascharoensuk V., Giachelli C.M., Gordon K., Hughes J., Pichler R., Brown P.:** Obstructive uropathy in mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis, 1999, *Kidney Int*, 56: 571-580
- 244. O'Regan A.:** The role of osteopontin in lung disease, 2003, *Cytokine Growth Factor Rev*, 14: 479-488
- 245. O'Regan A., Berman J.S.:** Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation, 2000, *Int J Exp Pathol* 81: 373-390
- 246. O'Regan A.W., Chupp G.L., Lowry J.A., Goetschkes M., Mulligan N., Berman J.S.:** Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro, 1999, *J Immunol*, 162: 1024-1031
- 247. O'Regan A.W., Hayden J.M., Body S., Liaw L., Mulligan N., Goetschkes M.:** Abnormal pulmonary granuloma formation in osteopontin-deficient mice, 2001, *Am J Respir Crit Care Med*, 164: 2243-2247
- 248. Osborn L.:** Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation, 1990, *Cell*, 62: 3-6

- 249. Overall C.M., Wrana J.L., Sodek J.:** Transcriptional and posttranscriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparison with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression, 1991, J Biol Chem, 266:1464-1471
- 250. Ozmeriç N., Preus N.R., Olsen I.:** Genetic diversity of *Porphyromonas gingivalis* and its possible importance to pathogenicity, 2000, Acta Odontol Scand, 58: 183-7
- 251. Page R.C., Beatty P., Waldrop T.C.:** Molecular basis for the functional abnormality in neutrophils from patients with generalized prepubertal periodontitis, 1987, J Oeriodont Res, 22: 182-183
- 252. Page R.C., Offenbacher S., Schroeder H.E., Seymour G.J., Kornman K.S.:** Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions, 1997, Periodontology, 14: 216-268.
- 253. Page R.C., Schroeder H.E.:** Current status of the host response in chronic marginal periodontitis; 1981, J Periodontol, 52: 477-491
- 254. Page R.C., Schroeder H.E.:** Pathogenesis of inflammatory periodontal disease: a summary of current work, 1976, Lab Invest, 34: 235-249
- 255. Paliard X., de Waal Malefijt R., Yssel H., Blanchard D., Chretien I., Abrams J., de Vries J., Spits H.:** Simultaneous production IL-2, IL-4, and IF- $\gamma$  by human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell clones, 1988, J Immunol, 141: 849-855
- 256. Papapanou P.N.:** Population studies of microbial ecology in periodontal health and disease, 2002, Ann Periodontol, 7: 54-61
- 257. Parkhill J.M., Hennig B.J., Chapple I.L., Heasman P.A., Taylor J.J.:** Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis, 2000, J Clin Periodontol, 27: 682-9
- 258. Patarca R., Saavedra R.A., Cantor H.:** Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene, Crit Rev Immunol, 1993, 13: 225-246
- 259. Pateolog E.:** The therapeutic potential of TNF-alpha blockade in rheumatoid arthritis, 2003, Expert Opin Investig Drugs, 12: 1087-1095
- 260. Polak B., Vance J.B., Dyer J.K., Bird P.S., Gemmell E., Reinhardt R.A., Seymour G.J.:** IgG antibody subclass response to *Porphyromonas gingivalis* outer membrane antigens in gingivitis and adult periodontitis, 1995, J Periodontol, 66: 363-368
- 261. Preber H., Bergstrom J.:** Occurrence of gingival bleeding in smoker and non-smoker patients, 1985, Acta Odonto Scand, 43: 315- 320
- 262. Preber H., Bergstrom J.:** Cigarette smoking in patients referred for periodontal treatment, 1986, Scand J Dent Res, 94: 102-108
- 263. Ranney R.R.** Immunologic mechanisms of pathogenesis in periodontal disease: an assessment, 1991, J Periodontal Res, 26: 243-254
- 264. Rasmussen R.** Quantification on the LightCycler. in Meuer S. et al.:Rapid cycle real-time PCR, 2001, Springer, Heidelberg: 21-35
- 265. Rateischak K.:** Parodontologie, Thieme Verlag, 2004
- 266. Reich D.E., Lander E.S.:** On the allelic spectrum of human disease, 2001, Trends Genet, 17: 502-510
- 267. Reynolds J.J., Meikle M.C.:** Mechanism of connective tissue Matrix destruction in periodontitis, 2000, Periodontology, 14: 144-157
- 268. Rittling S.R., Matsumoto H.N., McKnee M.D., Nanci A., An X.R., Novick K.E.:** Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro, 1998, J Bone Miner Res, 13:1101-1111
- 269. Rollo E.E., Denhardt D.T.:** Differential effects of osteopontin on the cytotoxic activity of macrophages from young and old mice, 1996, Immunology, 88: 642-647

- 270. Rollo E.E., Laskin D.L., Denhardt D.T.:** Osteopontin inhibits nitric oxide production and cytotoxicity by activated RAW264.7 macrophages, 1996, *J Leukoc Biol*, 60: 397-404
- 271. Salgame P., Abrams J.S., Clayberger C., Goldstein H., Convit J., Modlin R.L., Bloom B.R.:** Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones, 1991, *Science*, 254: 279-282
- 272. Salvi G.E., Lawrence H.P., Offenbacher S., Beck J.D.:** Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis, 2000, *Periodontol*, 14: 173-201
- 273. Sanderink R.B.A., Bernhardt H., Knocke M., Meyer J., Weber C., Weiger R.:** Curriculum orale Mikrobiologie und Immunologie, 2004, Quintessenz Verlags-GmbH, 87-591
- 274. Saxer U.P., Walter C., Bornstein M.M., Klingler K., Ramseier C.A.:** Impact of tobacco use on the periodontium – an update(II) – Part 2: Clinical and radiographic effects on the periodontium and impact on periodontal and implant therapy, 2007, *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 117: 153–163
- 275. Scarel-Caminaga R.M., Trevilatto P.C., Souza A.P., Brito R.B., Camargo L.E., Line S.R.:** Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis, 2004, *J Clin Periodontol*, 31: 443-8
- 276. Scarel-Caminaga R.M., Trevilatto P.C., Suoza A.P., Brito R.B., Line S.R.:** Investigation of an IL-2 polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis, 2002, *J Clin Periodontol*, 29: 587-591
- 277. Schenkein H.A., FKetscher H.M., Bodnar M., Macrina F.L.:** Increased opsonization of a prtH-defective mutant of *Porphyromonas gingivalis* W83 is caused by reduced degradation of complement-derived opsonins, 1995, *J Immunol*, 154: 5331-5337
- 278. Schreiber S, Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Stoll M, Folsch UR.** Genetik und Umwelt. Ist das Bild klarer geworden? *Internist* 2002; 43: 1335-1341
- 279. Schroeder H.E., Graf-de Beer M., Attström R.:** Initial gingivitis in dogs, 1975, *J Periodont Res*, 10: 128
- 280. Schroeder H.E., Munzel-Pedrazzoli S., Page R.C.:** Correlated morphometric and biochemical analysis of gingival tissue in early chronic gingivitis in man, 1973, *Arch Oral Biol*, 18: 899
- 281. Schroeder H.E., Page R.:** The normal periodontium. In: Schlugger S., Yuodelis R., Page R., Johnson R. ed.: *Periodontal disease*, 2nd edn. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990: 11
- 282. Schwartz Z., Goultschin J., Dean D.D., Boyan B.D.:** Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis, 2000, *Periodontology*, 14: 158-172
- 283. Schwenzer N., Ehrenfeld M.:** Zahnärztliche Chirurgie, Band3, Thieme Verlag, 3.Auflage, 2000
- 284. Seymour G.J.:** Possible mechanisms involved in the immunoregulation of chronic inflammatory periodontal disease, 1987, *J Dent Res*, 66: 2-9
- 285. Seymour G.J., Powell R.N., Davies W.I.:** Conversion of a stable T-cell lesion to a progressive B-cell lesion in the pathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease, 1979, *J Clin Periodontol*, 6: 267-277
- 286. Sharma C.G., Pradepep A.R.:** Gingival crevicular fluid osteopontin levels in periodontal health and disease, 2006, *J Periodontol*, 77: 1674-80
- 287. Sharma C.G., Pradepep A.R.:** Plasma and crevicular fluid osteopontin levels in periodontal health and disease, 2007, *J Periodontol*, 42: 450-5
- 288. Shinohara M.L., Lu L., Bu J. Werneck M.F., Kobayashi K.S., Glimcher L.H.:** Osteopontin expression is essential for interferon- $\alpha$  production by plasmacytoid dendritic cells, 2006, *Nat Immunol* (in press)
- 289. Sibalic V., Fan X., Loffing J., Wuthrich R.P.:** Upregulated renal tubular CD44, hyaluronan, and osteopontin in kdkd mice with intestinal nephritis, 1997, *Nephrol Dial Transplant*, 12: 1344-1353
- 290. Siqueira J.F. Jr., Rôças I.N., Lopes H.P.:** Patterns of microbial colonization in primary root canal infections, 2002, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 93: 174-8

291. **Smith L.L., Giachelli C.M.:** Structural requirements for alpha 9 beta 1-mediated adhesion and migration to thrombin-cleaved Osteopontin, 1998, *Exp Cell Res*, 242: 351-360
292. **Socransky S.S., Haffajee A.D., Cugini M.A., Smith C.M., Kent R.L.:** Microbial complexes in subgingival plaque, 1998, *J Clin Periodontol*, 25: 134-144
293. **Sodek J., Ganss B., McKee M.D.:** Osteopontin, 2000, *Crit Rev Oral Biol Med*, 11: 279-303
294. **Sodek J., Zhu B., Huynh M.H., Brown T.J., Ringuette M.:** Novel functions of the matricellular proteins osteopontin, and osteonectin/SPARC, 2002, *Connect Tissue Res*, 43: 308-319
295. **Sodek J., Paes Batista da Silva A., Zohar R.:** Osteopontin and mucosal protection, 2006, *J Dent Res*, 85: 404-415
296. **Sofaer J.A.:** Genetic approaches in the study of periodontal disease, 1990, *J Clin Periodontol*, 17: 401-408
297. **Soga Y., Nishimura F., Ohyama H., Maeda H., Takashiba S., Murayama Y.:** Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF-alpha) -1031/-863-857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese, 2003, *J Clin Periodontol*, 30: 524-531
298. **Stonek F.:** Genetische Variation- eine Einführung, 2006, *geno news special*, 1: 1-4
299. **Stoneking M.:** Single nucleotide polymorphism: From the evolutionary past, *Nature*, 2001, 409: 821-822
300. **Street N.E., Schumacher J.H., Fong T.A., Bass H., Fiorentino D.F., Leverah J.A., Mosmann T.R.:** Heterogeneity of mouse helper T cells. Evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells, 1990, *J Immunol*, 144: 1629-1639
301. **Sugita N., Kobayashi T., Ando Y., Yoshihara A., Yamamoto K., van de Winkel J.G., Miyazaki H., Yoshie H.:** Increased frequency of FcgammaRIIIb-NA1 allele in periodontitis-resistant subjects in an elderly Japanese population, 2001, *J Dent Res*, 80: 914-918
302. **Sumer A.P., Kara N., Keles G.C., Gunes S., Koprulu H., Bagci H.:** Association of interleukin-10 gene polymorphisms with severe generalized chronic periodontitis, 2007, 78: 493-7
303. **Sundqvist G.K., Carlsson J., Herrmann B.F., Höfling J.F. Vaatainen A.:** Degradation in vivo of the C3 protein of guinea pig complement by pathogenic strain of *Bacteroides gingivalis*, 1984, *Scand J Dent Res*, 92: 14-24
304. **Suzuki K., Zhu B., Rittling S.R., Denhardt D.T., Goldberg H.A., McCulloch C.A.:** Colocalization of intracellular osteopontin with CD44 is associated with migration, cell fusion, and resorption in osteoclasts, 2002, *J Bone Miner Res*, 17: 1486-1497
305. **Svanborg C., Agace W., Hedges S., Lindstedt R., Svensson M.L.:** Bacterial adherence and mucosal cytokine production, 1994, *Ann N Y Acad Sci*, 730: 162-181
306. **Tamura A., Shingai M., Aso N., Hazuku T., Nasu M.:** Osteopontin is released from the heart into the coronary circulation in patients with a previous anterior wall myocardial infarction, 2003, *Circ J*, 67: 742-744
307. **Tatakis D.N., Kumar P.S.:** Etiology and pathogenesis of periodontal disease, 2005, *Dent Clin North Am*, 49: 491-516
308. **Taubman M.A., Kawai T., Han X.:** The new concept of periodontal disease pathogenesis requires new and novel therapeutic strategies, 2007, *J Clin Periodontol*, 34: 367-369
309. **Taylor B.C., Schreiner P.J., Doherty T.M., Fornage M., Carr J.J., Sidney S.:** Matrix Gla protein and osteopontin genetic association with coronary artery calcification and bone density: the CARDIA study, 2005, *Hum Genet*, 116: 525-528
310. **Temelsen D.S., McGrath H.E., Kittler E.L., Shaddock R.K., Kister V.K., Crittenden R.B., Turner B.L., Quesenberry P.J.:** Cytokine expression from bone marrow derived macrophages, 1993, *Exp Hematol*, 21: 388-393
311. **Teughels W., Van Eldere J., Van Steenberghe D., Cassiman J.J., Fives-Taylor P., Quirynen M.:** Influence of nicotine and cotinine on epithelial colonization by periodontopathogens, 2005, *J Periodontol*, 76: 1315-1322

- 312. Tonetti M.S., Gerber L., Lang N.P.:** Vascular adhesion molecules and initial development of inflammation in clinically healthy human keratinized mucosa around teeth and osseointegrated implants, 1994, *J Periodont Res*, 29: 386-392
- 313. Tonetti M.S., Imboden M.A., Gerber L., Lang N.P., Laissue J., Mueller C.:** Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections, 1994, *Infect Immun*, 62: 4005-4014
- 314. Tonetti M.S., Imboden M.A., Gerber L., Lang N.P.:** Compartmentalization of inflammatory cell phenotypes in normal gingiva and peri-implant keratinized mucosa, 1995, *J Clin Periodontol*, 22: 735-742
- 315. Tonetti M.S., Straub A.M., Lang N.P.:** Expression of the cutaneous lymphocyte antigen and the alpha IEL beta 7 integrin by intraepitheliallymphocytes in healthy and diseased human gingival, 1995, *Arch Oral Biol*, 40: 1125- 32
- 316. Trueblood N.A., Xie Z., Communal C., Sam F., Ngoy S., Liaw L.:** Exaggerated left ventricular dilatation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin, 2001, *Circ Res*, 88: 1080-1087
- 317. Tsai C.C., Chen H.S., Chen S.L., Ho Y.P., Ho K.Y., Wu Y.M., Hung C.C.:** Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis, 2005, *J Periodontal Res*, 40: 378–384
- 318. Tsai C.C., McArthur W.P., Baehni P.C., Evian C., Genco R.J., Taichman N.S.:** Serum neutralizing activity against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin in juvenile periodontitis, 1981, *J Clin Periodontol*, 8: 338-348
- 319. Tsalenko A, Ben-Dor A, Cox N, Yakhini Z.:** Methods for analysis and visualization of SNP genotype data for complex diseases. *Pac Symp Biocomput*. 2003: 548-61
- 320. Ueno H., Murakami M., Okumura M., Kadosawa T., Uede T., Fujinaga T.:** Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes, 2001, *Biomaterials*, 22: 1667-1673
- 321. Van der Velden U., Abbas F., Armand S., de Graaff J., Timmermann M.F., van der Weijden G.A., van Winkelhoff A.J., Winkel E.G.:** The effect of sibling relationship on the periodontal condition, 1993, *J Clin Periodontol*, 20: 683-90
- 322. Van Dyke T.E.:** Role of the neutrophil in oral disease: receptor deficiency in leukocytes from patients with juvenile periodontitis, 1985, *Rec Infect Dis*, 419-425
- 323. Van Dyke T.E., Sheilesh D.:** Risk factors for periodontitis, 2005, *J Int Acad Periodontol*, 7: 3-7
- 324. Van Heekeren A.M., Rikihisa Y., Park J., Fertel R.:** Tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 alpha, interleukin-6, and prostaglandin E2 production in murine peritoneal macrophage infected with *Ehrlichia risticii*, 1993, *Infect Immun*, 61: 4333-4337
- 325. Van Steenberghe T.J., Loos B.G., Van Der Velden U.:** Typing and transmission of periodontal bacteria, *Ned Tijdschr Tandheelkd*, 1996, 103: 127-31.
- 326. Van Winkelhoff A.J., van Steenberghe T.J., de Graaff J.:** The role of black-pigmented Bacteroides in human oral infections, 1988, *J Clin Periodontol*, 15: 145-55
- 327. Vogt M.H., Lopatinskaya L., Smith M., Polman C.H., Nagelkerken L.:** Elevated Osteopontin levels in active relapsing-remitting multiple sclerosis, 2003, *Ann Neurol*, 53: 819-822
- 328. Von Lampe B., Barthel B., Coupland S.E., Riecken E.O., Rosewicz S.:** Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease, 2000, *Gut*, 47: 63-73
- 329. Walter C., Saxer U.P., Bornstein M.M., Klingler K., Ramseier C.A.:** Impact of tobacco use on the periodontium – an update (I) – Part 1: Epidemiologic und pathogenetic aspects of tobacco-related periodontal diseases, 2007, *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 117: 45–54
- 330. Walters J.D., Miller T.J., Cario A.C., Beck F.M, Marucha P.T.:** Polyamines found in gingival fluid inhibit chemotaxis by human polymorphonuclear leukocytes in vitro, 1995, *J Periodontol*, 66: 274-278

- 331. Wang D., Yamamoto S., Hijiya N., Benveniste E.N., Gladson C.L.:** Transcriptional regulation of the human osteopontin promoter: functional analysis and DNA-protein interactions, 2000, *Oncogene*, 19: 5801-5809
- 332. Warell D., Cox T., Firth J., Benz E.:** *Innate Immune System*, 2004, Oxford Textbook of Medicine –online version
- 333. Watford W.T., Moriguchi M., Morinobu A., O’Shea J.J.:** The biology of IL-12; coordinating innate and adaptive immune response, 2003, *Cytokine Growth Factor Rev*, 14: 361-368
- 334. Weber G.F., Ashkar S., Glimcher M.J., Cantor H.:** Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1), 1996, *Science*, 271:509-512
- 335. Weber G.F., Zawaideh S., Hikita S., Kumar V.A., Cantor H., Ashkar S.:** Phosphorylation-dependent interaction of osteopontin with its receptors regulates macrophage migration and activation, 2002, *J Leukoc Biol* 72: 752-761
- 336. Weiner M.P., Hudson T.J.:** *Introduction to SNPs: Discovery of Markers of Disease*, Biotechniques, 2002, 32
- 337. Weiss J.M., Renkl A.C., Meier C.S., Kimming M., Liaw L., Ahrens T.:** Osteopontin is involved in the initiation of cutaneous contact hypersensitivity by inducing Langerhans and dendritic cell migration to lymph nodes, 2001, *J Exp Med*, 194:1219-1229
- 338. Whittaker C.J., Klier C.M., Kolenbrander P.E.:** Mechanisms of adhesion by oral bacteria, 1996, *Annu Rev Microbiol* , 50:513-552
- 339. Wittwer, C. T.:** *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications*. Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications. S. Mueuer, C. T. Wittwer and K. Nakagawara, 2001, Heidelberg, Springer: 1-8
- 340. Wittwer, C. T., Reed G.B.:** *Rapid Cycle DNA Amplification. The polymerase chain reaction*, 1994, K. Mullis, F. Ferre and R. Gibbs, Springer-Verlag: 174-181
- 341. Wittwer C. T., Ririe K.M.:** The LightCycler: A microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control, 1997, *Biotechniques*, 22: 176-181
- 342. Wohlfahrt J.C., Wu T., Hodges J.S., Hinrichs J.E., Michalowicz B.S.:** No association between selected candidate gene polymorphisms and severe chronic periodontitis, 2006, *J Periodontol*, 77: 426-436
- 343. Wolff L.F., Liljemark W.F., Pihlstrom B.L., Schaffer E.M., Aeppli D.M., Bandt C.L.:** Dark-pigmented *Bacteroides* species in subgingival plaque of adult patients on a rigorous recall program, 1988, *J Periodontol Res*, 23: 170-4
- 344. Ximenez-Fyvie L.A., Haffajee A.D., Socransky S.S.:** Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis, 2000, *J Clin Periodontol*, 27: 648-57
- 345. Ximenez-Fyvie L.A., Haffajee A.D., Socransky S.S.:** Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis, 2000, *J Clin Periodontol*, 27: 722-32
- 346. Yamamoto K., Sakai F., Kon S., Morimoto J., Kimura C., Yamazaki H.:** Essential role of the cryptic SLAYGLR within osteopontin in a murine model of rheumatoid arthritis, 2003, *J Clin Invest*, 112: 181-188
- 347. Yamano R., Ohara M., Nishikubo S., Fujiwara T., Kawamoto T., Ueno Y., Komatsuzawa H., Okuda K., Kurihara H., Suginaka H., Oswald E., Tanne K., Sugai M.:** Prevalence of cytotoxic distending toxin production in periodontopathogenic bacteria, 2003, *J Clin Microbiol.*, 41: 1391-8
- 348. Yamate T., Tsuji H., Amasaki N., Iguchi M., Kurita T., Kohori K.:** Analysis of osteopontin DNA in patients with urolithiasis, 2000, *Urol Res*, 28: 159-166
- 349. Yamazaki K., Tabeta K., Nakajima T., Ohsawa Y., Ueki K., Itoh H., Yoshie H.:** Interleukin-10 gene promoter polymorphism in Japanese patients with adult and early-onset periodontitis, 2001, *J Clin Periodontol*, 28: 828-32
- 350. Yasuda K., Sugita N., Kobayashi T., Yamamoto K., Yoshie H.:** FcγRIIB gene polymorphisms in Japanese periodontitis patients, *Genes Immun*, 2003, 4: 541-6

- 351. Yoshino T., Laine M.L., van Winkelhoff A.J., Dahlén G.:** Genotype variation and capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* from chronic periodontitis and periodontal abscesses, 2007, *FEMS Microbiol Lett*, 270: 75-81
- 352. Young I.S.:** Measurement of total antioxidant capacity, 2001, *J Clin Pathol*, 54: 339
- 353. Yumoto K., Ishijima M., Rittling S.R., Tsuji K., Tsuchiya Y., Kon S.:** Osteopontin deficiency protects joints against destructions in antitype II collagen antibody-induced arthritis mice, 2002, *Proc Nat Acad Sci USA*, 99: 4556-4561
- 354. Zadeh H.H., Nichols F.C., Miyasaki K.T.:** The role of the cell-mediated immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis, 2000, *Periodontol*, 20: 239-88
- 355. Zhang J., Liu Y., Shi J., Larson D.F, Watson R.R.:** Side-stream cigarette smoke induces dose-response in systemic inflammatory cytokine production and oxidative stress, 2002, *Exp Biol Med*, 227: 823–829
- 356. Zhu X.L., Ganss B., Goldberg H.A., Sodek J.:** Synthesis and processing of bone sialoproteins during de novo bone formation in vitro, 2001, *Biochem Cell Biol*, 79: 737-746
- 357. Zhu B., Suzuki K., Goldberg H.A., Rittling S.R., Denhardt D.T., McCulloch C.A.:** Osteopontin modulates CD44-dependent chemotaxis of peritoneal macrophages through G-protein-coupled receptors : evidence of a role for intracellular form of osteopontin, 2004, *J Cell Physiol*, 198: 155-167
- 358. Zimmerman G.A., Prescott S.M., McIntyre T.M.:** Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signalling molecules, 1992, *Immunol Today*, 13: 93-100
- 359. Zohar R., Suzuki K., Arora P., Glogauer M., McCulloch C.A.:** Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration, 2000, *J Cell Physiol*, 184: 118-130
- 360. Zohar R., Zhu B., Liu P., Sodek J., McCulloch C.A.:** Increased cell death in osteopontin-deficient cardiac fibroblasts occurs by a caspase 3-independent pathway, 2004, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287: 1730-1739

# ANHANG

## 1. Daten der Parodontitisgruppe

Nr.	Alter	Ge- schlecht	Raucher	OPN -1748	OPN -616	OPN -443	OPN -156	OPN -66	OPN 282	OPN 750	OPN 1083	OPN 1239
P1	56	männlich	√	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
P2	31	weiblich	V	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AC
P3	50	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P4	37	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
P5	38	männlich	√	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
P6	30	männlich	√	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P7	41	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
P8	24	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
P9	38	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
P10		weiblich		AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
P11	50	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P12	18	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P13	50	weiblich	√	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TT	AA	AC
P14	56	weiblich	√	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
P15	63	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P16	58	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P17	54	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
P18	54	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P19	60	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
P20	61	männlich	√	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
P21	31	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
P22	57	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
P23	28	männlich	√	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
P24				GG	TG	TT	+G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P25	63	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P26	58	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TT	TT	GG	CC
P27	50	weiblich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P28	64	weiblich	√	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AA	AC
P29	58	männlich	√	AA	GG	TC	-G\G	TT	TT	TT	GG	CC
P30	49	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P31	42	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
P32	54	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
P33	58	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
P34	57	weiblich	√	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
P35	48	weiblich	√	GG	TT	TT	+G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P36	61	weiblich	√	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
P37	40	weiblich	√	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC

P38	55	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
P39	69	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P40	33	männlich	√	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
P41	62	männlich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TT	TT	GG	CC
P42	57	männlich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
P43	26	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
P44	61	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
P45	50	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
P46	46	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P47	48	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
P48	66	weiblich	√	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P49		weiblich		AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P50	31		√	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
P51	60	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
P52	70	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P53	69	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	GG	CC
P54	51	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P55	32	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	AG	CC
P56	57	weiblich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P57	38	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P58	58	weiblich	-	AG	TG	TT	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
P59	58	männlich	-	GG	TG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P60	58	weiblich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P61	48	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
P62	58	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P63	37	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
P64	58	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P65	25	männlich	√	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
P66	54	männlich	√	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
P67	64	männlich	-	AA	TG	TT	-G\G	TT	CC	CC	AG	AC
P68	45	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P69	40	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TT	TT	GG	CC
P70	58	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
P71	63	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P72	56	männlich	√	AA	GG	CC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
P73	62	männlich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
P74	43	männlich	√	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
P75	43	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
P76	60	männlich	√	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
P77	49	männlich	√	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
P78	53	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AA	AC
P79	58	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA

P80	36	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P81	61	männlich	-									
P82	50	weiblich	√	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P83	47	männlich	-	AG	GG	TT	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P84	60	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P85	40	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P86	40	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P87	41	männlich	-	GG	GG	TT	+G\ +G	GG	CC	CC	AA	AA
P88	61	weiblich		AG	GG	TC	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AC
P89	39	männlich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AC
P90	52	männlich	√	GG	GG	TT	+G\ +G	GG	CC	CC	AA	AA
P91	41	männlich	√	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P92		weiblich		AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P93	62	männlich	-	AG	TG	TC	-G\ +G	TT	TC	TC	AG	AC
P94	60	männlich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P95	82	männlich	√	AA	GG	TT	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P96	49	weiblich	-	AG	TT	TC	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P97	52	weiblich	-	GG	TG	TT	+G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P98	61	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\ +G	GG	CC	CC	AA	AA
P99	61	männlich	-	AG	GG	TT	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P100	63	männlich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AA	AC
P101	49	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P102	71	männlich	-	AA	GG	TT	-G\ G	TT	TC	TC	AA	AC
P103	70	männlich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TT	TT	GG	CC
P104	64	männlich	√	AG	TG	TT	-G\ +G	TT	TC	TC	AA	AA
P105	61	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P106	60	weiblich	√	GG	GG	TT	+G\ +G	GG	CC	CC	AA	AA
P107	59	männlich	√	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P108	39	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P109	66	männlich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P110	64	männlich	√	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TT	TT	AG	CC
P111	61	männlich	√	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P112	70	weiblich	√	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P113	47	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P114	72	männlich	-	GG	TG	TT	+G\ +G	GT	TC	TC	AA	AC
P115	65	männlich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P116	75	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P117	63	männlich	√	AG	GG	TT	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P118	69	männlich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P119	55	männlich	-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	TC	TC	AG	AC
P120	73	weiblich	√	AG	GG	TT	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P121	58	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC

P122	60	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P123	62	weiblich	√	AA	GG	CC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P124	71	weiblich	√	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TT	TT	GG	CC
P125	38	weiblich	-									
P126	52											
P127	38			AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P128	28		-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P129	?	weiblich		AG	TG	TC	-G\ +G	TT	TC	TC	AG	AC
P130	76		-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P131	?			AA	GG	TT	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P132	45	männlich	√	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P133	56	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P134	73	weiblich	√	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	TC	TC	AG	AC
P135	62	weiblich	-	GG	TG	TT	+G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P136	55	männlich	√	AA	GG	CC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P137	61	männlich	√	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P138	61	männlich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AA	AA
P139	67	weiblich	√	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P140	60	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\ +G	TT	TC	TC	AG	AC
P141	48	männlich	-	GG	GG	TT	+G\ +G	GG	CC	CC	AA	AA
P142	59	männlich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TT	TT	GG	CC
P143	50	weiblich	√	AG	TG	TT	-G\ +G	TT	TC	TC	AG	AA
P144	48	weiblich	√	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P145	47	weiblich	√	AG	TG	TC	-G\ +G	TT	TC	TC	AG	AC
P146	60	männlich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P147				AA	GG	CC	-G\ G	TT	TT	TT	GG	CC
P148	65	männlich	-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	TC	TC	GG	AC
P149	45	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\ +G	TT	CC	CC	AA	AA
P150	40	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P151	58	männlich	-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	TC	TC	AG	AC
P152	63	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\ +G	TT	CC	CC	AA	AA
P153	60	männlich	√	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P154	74	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P155	49	weiblich	√	AA	GG	CC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P156	63	weiblich	-	AG	TG	TT	-G\ +G	TT	CC	CC	AA	AA
P157	58	männlich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P158	60	männlich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P159	63	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AA	AC
P160	37	männlich	√	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P161	54	weiblich	√	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	TC	TC	AG	AC
P162	63	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\ G	TT	TC	TC	AA	AA
P163	59	männlich	√	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AC

P164	64	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	CC	TC	AG	CC
P165	63	männlich	-	GG	GG	TT	+G\ +G	GG	TT	CC	AA	AA
P166	52	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P167	42	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TT	TC	GG	CC
P168	50	männlich	√	AA	TG	TC	-G\ +G	TT	TC	TC	AA	AC
P169	60	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P170	64	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P171	54	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P172	33	männlich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P173	42	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\ G	TT	TC	TC	AA	AC
P174	63	männlich	√	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AA	AC
P175	46	männlich	-	AG	GG	TT	-G\ +G	GT	TC	TC	AA	AC
P176	64	männlich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TT	TT	GG	CC
P177	45	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AA	AC
P178	60	männlich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P179	57	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P180	42	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\ G	TT	TT	TT	GG	CC
P181	64	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	TC	TC	AG	AC
P182	43	männlich	-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	TC	TC	AG	AC
P183	41	männlich	√	AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P184	64	männlich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TT	TT	AG	CC
P185	51	männlich	√	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P186	49	männlich	√	AA	GG	CC	-G\ G	TT	CC	TC	AA	AA
P187	47	weiblich	√	AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P188	35	männlich	√	GG	GG	TT	+G\ +G	GG	CC	CC	AA	AA
P189	60	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P190	34	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P191	68	männlich	-	AG	GG	TT	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P192	44	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	TC	TC	AG	AC
P193	60	männlich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TT	TT	GG	CC
P194	50	männlich	-	AA	GG	TT	-G\ G	GG	TC	TC	AA	AC
P195	56	männlich	√	AA	GG	TT	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P196	59	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P197	57	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TT	TT	AG	CC
P198	64	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P199	42	weiblich	√	AG	TG	TT	-G\ +G	TT	TC	TC	AG	AC
P200	59	männlich	√	GG	TG	TT	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P201	60	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	TC	TC	AG	AC
P202	61	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P203	60	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\ +G	GG	CC	CC	AA	AA
P204	71	männlich	-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P205	49	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA

P206	51	männlich	√	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
P207	38	weiblich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P208	61	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P209	50	männlich	√	AG	TG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AC
P210	44	weiblich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P211	62	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
P212	55	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
P213	36	männlich	√	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
P214	53	weiblich	-	GG	TG	TT	+G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P215	35	weiblich	√	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P216	34	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P217	39	weiblich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P218	38	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P219	44	weiblich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P220	64	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P221	49	weiblich	√	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P222	53	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P223	59	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P224	61	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P225	42	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
P226	62	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
P227	58	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
P228	61	männlich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P229	62	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P230	48	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
P231	55	weiblich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P232	54	weiblich	√	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AG	AA
P233	35	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P234	54	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P235	45	männlich	√	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
P236	56	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
P237	52	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P238	49	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	CC	AA	AC
P239	49	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P240	73	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P241	48	männlich	√	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
P242	51	männlich	√	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P243	54	männlich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
P244	46	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
P245	53	weiblich	√	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P246	56	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P247	48	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA

P248	40	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P249	57	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P250	36	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P251	52	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P252	55	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P253	53	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P254	45	männlich	√	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P255	84	weiblich	-	GG	TG	TT	+G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P256	45	weiblich	√	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
P257	44	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
P258	69	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
P259	53	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
P260	37	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P261	56	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
P262	35	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
P263	55	weiblich	√	AG	TT	TC	-G\+G	TT	CC	TC	AA	AA
P264	65	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
P265	58	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
P266	61	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
P267	50	weiblich	√	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
P268	56	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P269	63	weiblich	-	GG	GG	TT	-G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
P270	69	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TT	TT	GG	CC
P271	71	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
P272	80	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
P273	63	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
P274	44	weiblich	√	GG	TG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P275	52	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC		AA
P276	54	weiblich	√	AG	GG		-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P277	68	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
P278	70	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P279	60	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P280	73	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC		AC
P281	56	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P282	57	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P283	56	weiblich		GG	GG		-G\+G	TT	TC	CC		CC
P284	36	männlich		AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
P285	57	männlich		AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P286	44	weiblich		AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
P287	52	männlich		AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	AG	CC
P288	62	männlich										
P289	65	weiblich		AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA

P290	?			AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
P291	?			AA	GG	CC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P292	?			AG	TG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P293	?			AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P294	?			AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P295	?			AA	TG	CC	-G\ G	TT	TT	TT	GG	CC
P296	48	weiblich		AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AA	AC
P297	45	weiblich		AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AA	AC
P298	59	weiblich		GG	GG	TT	-G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
P299	48	weiblich		GG	TG	TT	+G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P300	58	männlich		AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
P301	53	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P302	78	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TT	TT	GG	CC
P303	35	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\ G	TT	TT	TT	AG	CC
P304	61	männlich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P305	53	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P306	70	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AA	AC
P307	51	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
P308	58	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P309	31	weiblich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P310	43	männlich	-	GG	TG	TT	+G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P311	72	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
P312	44	männlich	-	GG	TG	TT	+G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P313	42	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P314	71	männlich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P315	38	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P316	64	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P317	66	männlich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P318	62	männlich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AA	AC
P319	64	männlich		AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P320	64	weiblich		AA	GG	CC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P321	64	weiblich		AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P322	55	männlich		AG	GG	TC	-G\ G	GT	TC	TC	AG	AC
P323	56	männlich		AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P324	56	männlich		AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P325	54	männlich	√	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P326	67	männlich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P327	62	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
P328	45	männlich	√	AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P329	57	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
P330	56	männlich	√	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TT	TT	GG	CC
P331	50	weiblich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA

P332	45	männlich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P333	43	weiblich	-			t						
P334	58	männlich	-	AG	TG	TC	-G\ +G	TT	CC	CC	AA	AA
P335	55	männlich	-	AG	TG	TC	-G\ +G	TT	TC	TC	AA	AC
P336	54	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TT	TT	GG	CC
P337	56	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\ G	TT	TT	TT	AA	CC
P338	50	männlich	-	AA	GG	TT	-G\ G	TT	TC	TC	AA	AC
P339	63	männlich	-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P340	64	männlich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P341	40	weiblich	-	AG	TG	TT	-G\ +G	TT	CC	CC	AA	AA
P342	50	männlich	-	AA	GG	TT	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P343	70	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TT	TT	AG	CC
P344	64	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P345	65	weiblich	-	GG	TG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P346	58	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P347	63	weiblich	-	AG	TG	TT	-G\ +G	TT	CC	CC	AA	AA
P348	47	weiblich	√	AG	GG	TT	-G\ +G	GT	CC	TC	AA	AC
P349	54	weiblich	√	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P350	36	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AA	AC
P351	54	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P352	41	männlich	-	AA	GG	TT	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P353	65	männlich	-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P354	48	weiblich	-	AG	TG	TT	-G\ +G	GT	TC	TC	AA	AA
P355	72	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P356	55	weiblich	√	AG	GG	TT	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P357	64	männlich	√	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P358	67	männlich	√	AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC		AA
P359	44	männlich	-	AG	GG	TT	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P360	53	männlich	√	AA	GG	CC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P361	52	männlich	√	AG	GG	TT	-G\ +G	GT	TC	TC	AA	AC
P362	67	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\ +G	TT	CC	CC	AA	AA
P363	60	männlich	-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	TC	TC	AG	AC
P364	45	männlich	√	AG	GG	TT	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AC
P365	52	männlich	√	AA	GG	TT	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P366	65	männlich	-	GG	TG	TT	+G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P367	59	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	CC	CC		AA
P368	59	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TT	TT	GG	CC
P369	64	männlich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P370	41	männlich	-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	TC	TC	AG	AC
P371	64	männlich	√	AG	TG	TC	-G\ +G	TT	CC	CC	AA	AA
P372	46	männlich	-	AG	TG	TC	-G\ +G	TT	TT	TT	AG	CC
P373	43	weiblich	-	GG	TG	TT	+G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA

P374	56	weiblich	√	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TT	TT	AG	CC
P375	52	männlich	√	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	TC	TC	AG	AC
P376	54	männlich	√	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P377	71	männlich	-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P378	55	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P379	51	männlich	-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	TC	TC	AG	AC
P380	49	männlich	-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	TC	TC	AG	AC
P381	40	männlich	√	AG	TG	TT	-G\ +G	TT	CC	CC	AA	AA
P382	66	männlich	-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P383	65	männlich	√	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
P384	65	männlich	√	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AA	AC
P385	52	männlich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P386	53	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P387	51	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P388	64	männlich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P389	57	männlich	√	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	TC	TC	AG	AC
P390	71	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P391	73	männlich	√	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	TC	TC	AG	AC
P392	39	männlich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P393	42	männlich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P394	51	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P395	61	weiblich	-	GG	TG	TT	+G\ +G	GT	TC	TC	AG	AC
P396	35	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P397	55	männlich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
P398	50	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\ +G	TT	CC	CC	AA	AA
P399	73	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AA	AC
P400	41	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\ +G	GG	CC	CC	AA	AA
P401	76	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
P402	37	männlich	√	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	TT	TT		CC

## 2. Daten der Kontrollgruppe

Nr.	Alter	Ge- schlecht	Raucher	OPN -1748	OPN -616	OPN -443	OPN -156	OPN -66	OPN 282	OPN 750	OPN 1083	OPN 1239
B1	63	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
B2	67	männlich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
B3	55	männlich	√	AG	GG	TT	-G\ +G	GT	CC	CC	AA	AA
B4	43	männlich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
B5	44	männlich	-	AG	TG	TC	-G\ +G	TT	TC	TC	AG	AC
B6	46	männlich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA
B7	40	männlich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
B8	45	männlich	-	AA	GG	TC	-G\ G	TT	TC	TC	AG	AC
B9	61	männlich	-	AA	GG	CC	-G\ G	TT	CC	CC	AA	AA

B10	54	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B11	51	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B12	48	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B13	63	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TT	CC	AA	AA
B14	42	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	CC	TT	GG	CC
B15	40	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\G	TT	CT	TC	AA	AC
B16	66	männlich	-	AG	GG	TC	-G\G	TT	TT	CC	AA	AA
B17	57	weiblich	√	AA	GG	TC	-G\G	TT	TT	CC	AA	AA
B18	39	männlich	-	AG	GG	TT	-G\G	TT	TT	CC	AA	AA
B19	67	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TT	CC	AA	AA
B20	37	männlich	√	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B21	37	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CT	TC	AG	AC
B22	54	männlich	-									
B23	49	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TT	CC	AA	AA
B24	40	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CT	TC	AA	AC
B25	53	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B26	37	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TT	TT	AG	CC
B27	39	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B28	68	männlich	-	AA	GG	CC	-G\G	GT	TC	TC	AG	AC
B29	49	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B30	40	männlich	-	AG	GG	CC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B31	45	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B32	49	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B33	40	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B34	43	männlich	-	AA	GG	TT	-G\G	TT	TC	TC	AA	AC
B35	63	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AA
B36	65	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B37	44	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B38	38	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B39	46	männlich	√	AA	GG	CC	-G\G	TT	TT	TT	GG	CC
B40	37	männlich	-	GG	TG	TT	+G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B41	42	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B42	46	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B43	65	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B44	42	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B45	46	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B46	49	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B47	54	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TT	TT	GG	CC
B48	43	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B49	36	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AA	AC
B50	39	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B51	40	männlich	√	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AA	AC

B52	60	männlich	√	AA	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B53	46	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B54	37	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B55	55	männlich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B56	56	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B57	35	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B58	47	weiblich	-	GG	TG	TT	+G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B59	50	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B60	66	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B61	60	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B62	38	weiblich	-	GG	TG	TT	+G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B63	65	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B64	68	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B65									t	t		
B66	60	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B67	44	männlich	√	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B68	38	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B69	48	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B70	43	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B71	38	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B72	45	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B73	37	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B74	41	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B75	45	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B76	66	männlich	-	AG	TG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B77	44	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B78	53	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B79	36	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B80	65	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B81	49	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B82												
B83	51	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B84	54	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B85	41	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B86	52	männlich	√	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B87	36	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B88	36	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
B89	50	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B90	42	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B91	40	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B92	35	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B93	36	weiblich	-	GG	TG	TT	+G\+G	GT	CC	CC	AA	AA

B94	37	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B95	60	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B96	49	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B97	44	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B98	60	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B99	64	männlich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B100	49	männlich	√	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B101	52	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B102	50	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B103	56	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B104	64	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B105	46	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B106	60	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B107	46	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B108	36	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B109	44	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B110	66	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TT	CC	AA	AA
B111	47	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B112	57	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B113	67	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B114	38	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	TT	CC	AA	AA
B115	46	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B116	55	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B117	48	männlich	√	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
B118	52	männlich	√	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B119	42	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	TT	CC	AA	AA
B120	48	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B121	38	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B122	55	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B123	61	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B124	35	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B125	41	weiblich	-	GG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B126	44	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	TC	AG	AC
B127	67	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B128	50	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	AG	CC
B129	41	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B130	42	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B131	40	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	AG	CC
B132	35	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B133	51	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B134	55	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TT	CC	AA	AA
B135	54	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	TT	AG	CC

B136	45	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B137	47	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	TT	CC	AA	AA
B138	54	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TT	CC	AA	AA
B139	63	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TT	CC	AA	AA
B140	53	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	TC	AG	AC
B141	48	männlich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B142	38	männlich	-	AG	TG	TT	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B143	52	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CT	TC	AG	AC
B144	46	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CT	TC	AG	AC
B145	50	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B146	46	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
B147	51	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B148	39	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B149	38	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
B150	45	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B151	47	männlich	√	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B152	61	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B153	55	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B154	35	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B155	42	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B156	57	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B157	45	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B158	47	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B159	37	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	GG	AC
B160	57	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B161	60	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B162	37	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	TT	CC	AA	AA
B163	35	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B164	51	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B165	36	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B166	58	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B167	36	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	AG	CC
B168	48	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B169	62	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B170	64	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B171	56	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B172	43	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B173	54	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	AG	CC
B174	40	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B175	35	weiblich	-	GG	TG	TT	+G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B176	53	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B177	42	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA

B178	54	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B179	63	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B180	49	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	AA	CC
B181	56	männlich	-	AG	TG	TT	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B182	47	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	TG	TT	CC	AA	AA
B183	56	männlich	√	GG	GG	TT	+G\+G	GG	TT	CC	AA	AA
B184	48	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B185	52	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	TT	CC	AA	AA
B186	67	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B187	52	weiblich	-	GG	TG	TT	+G\+G	GT	TT	CC	AA	AA
B188	66	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	AG	CC
B189	67	männlich	√	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	TT	AG	CC
B190	53	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B191	57	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B192	65	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B193	42	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B194	44	weiblich	-	GG	TG	TT	+G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B195	67	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B196	56	männlich	√	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B197	49	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B198	37	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B199	48	männlich	√	AA	GG	CC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B200	44	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
B201	37	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B202	35	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B203	37	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B204	35	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B205	52	männlich	√	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B206	37	männlich	-	AG	TG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B207	48	männlich	√	AG	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B208	42	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
B209	35	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B210	48	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B211	44	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B212	45	männlich	-	AG	TG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B213	44	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B214	39	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B215	54	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B216	45	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B217	52	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AG	AA
B218	60	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B219	35	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC

B220	35	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B221	58	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B222	49	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B223	38	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\G	TT	TT	TT	AA	CC
B224	45	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AA	AC
B225	60	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B226	56	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GG	TC	TC	AA	AC
B227	55	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AA
B228	35	weiblich	-	AG	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B229	39	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B230	43	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B231	50	männlich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TT	TC	AG	AC
B232	42	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B233	56	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AA	AC
B234	38	männlich	-	AA	GG	TT	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B235	37	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TT	TT	GG	AA
B236	36	männlich	-	AA	GG	TT	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B237	64	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	TC	AA	AC
B238	42	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B239	36	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B240	51	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TT	AG	AC
B241	48	weiblich	-	AG	TG	TT	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B242	43	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B243	47	männlich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B244	36	männlich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TT	TT	GG	CC
B245	38	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B246					GG	TT	+G\+G	TT	CC		AA	
B247	64	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B248	57	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B249	52	männlich	-	AG	TG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B250	45	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B251	65	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B252	40	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B253	53	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B254	44	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B255	60	männlich	-	AA	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B256	35	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B257	46	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B258	43	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B259	46	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TT	TT	AG	CC
B260	36	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B261	57	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC

B262	57	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B263	48	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B264	43	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B265	53	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B266	44	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B267	37	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B268	52	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B269	46	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TT	TT	GG	CC
B270	62	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B271	46	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B272	45	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B273	37	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	GT	TC	TC	AG	AC
B274	38	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B275	42	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B276	38	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AG	AA
B277	48	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B278	55	männlich	-	AA	GG	CC	-G\G	GT	TT	TT	GG	CC
B279	38	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B280	42	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B281	66	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B282	65	weiblich	-	AG	TG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B283	35	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B284	65	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B285	43	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AG	AA
B286	55	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	GT	CC	CC	AA	AA
B287	46	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AA	AC
B288	40	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B289	36	männlich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B290	42	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TT	TT	AG	CC
B291	63	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AG	AA
B292	66	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AG	AA
B293	43	männlich	-	AA	GG	TT	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B294	51	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B295	37	männlich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B296	40	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B297	62	männlich	√	AA	GG	CC	-G\G	TT	TT	TT	GG	CC
B298	67	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B299	43	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AA	AC
B300	49	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	GG	CC	CC	AA	AA
B301	59	weiblich	-	GG	TG	TT	+G\+G	GT	TT	CC	AA	AA
B302	49	männlich	√	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	TC	AG	AC
B303	56	männlich	√	AG	TG	TT	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC

B304	42	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B305	35	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B306	44	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B307	47	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AC
B308	40	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B309	46	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B310	37	weiblich	-	GG	TG	TT	+G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B311	57	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B312	47	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B313	61	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B314	56	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B315	43	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B316	57	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B317	37	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B318	35	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B319	66	männlich	-	GG	TG	TT	+G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B320	57	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B321	60	männlich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B322	40	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B323	54	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B324	36	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B325	58	männlich	√	AG	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AG	AA
B326	46	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	AG	CC
B327	43	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B328	42	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B329	43	weiblich	-	AG	TG	TT	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B330	64	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
B331	45	männlich	√	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B332	38	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B333	63	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B334	59	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B335	61	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
B336	61	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B337	48	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B338	40	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B339	35	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT		TC	AG	AC
B340	41	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	AG	CC
B341	65	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
B342	43	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B343	61	männlich	-	AG	TG	TC	+G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B344	68	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B345	40	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA

B346	44	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B347	38	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B348	42	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B349	37	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B350	53	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B351	59	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TT	CC	AA	AA
B352	49	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B353	35	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TT	CC	AA	AA
B354	54	männlich	√	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B355	43	männlich	-	AG	TG	TT	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B356	49	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B357	37	männlich	√	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	AG	CC
B358	38	weiblich	-	AG	TG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B359	54	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B360	40	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B361	39	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B362	56	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B363	36	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B364	41	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	GG	TC	TC	AG	AC
B365	41	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B366	52	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GT	CC	CC	AA	AC
B367	41	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AA
B368	52	männlich	√	AG	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B369	49	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B370	46	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B371	46	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B372	48	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B373	41	männlich	-	AG	TG	TT	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B374	39	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B375	41	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TT	CC	AA	AA
B376	66	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	TT	CC	AA	AA
B377	60	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B378	55	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B379	49	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B380	48	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B381	35	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	TC	AA	AC
B382	36	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B383	48	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B384	47	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B385	43	männlich	√	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B386	48	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B387	41	männlich	-									

B388	36	männlich	√	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B389	37	männlich	-	AA	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B390	45	weiblich	-	GG	GG	TT	-G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B391	43	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B392	44	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B393	49	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B394	39	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B395	47	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B396	45	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B397										t		
B398	46	männlich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B399	58	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B400	42	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B401	58	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
B402	46	weiblich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B403	64	männlich	-				t					
B404	56	weiblich	-									
B405	37	weiblich	-	GG	TG	TT	+G\+G	GT	CC	TT	AA	AA
B406				AA	TG		-G\+G	GT		CC	AG	CC
B407	36	männlich	√	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
B408	53	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B409	35	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B410	35	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B411	45	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B412												
B413	35	männlich	√	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B414	53	männlich	√	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B415	46	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B416	39	männlich	-	AA	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B417	39	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B418	37	männlich	√	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B419	46	männlich	√	AG	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	GG	AA
B420	41	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
B421	44	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B422	54	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B423	44	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	GG	AC
B424	45	männlich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B425	43	männlich	-	GG	TG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AA
B426	55	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B427	55	männlich	√	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B428	40	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B429	44	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	AA	CC

B430	62	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B431	35	männlich	-	AG	TT	CC	-G\+G	GG	TT	TT	AG	AC
B432	39	männlich	√	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	CC	AG	AA
B433	56	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B434	37	weiblich	-	AA	TG	TC	+G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B435	38	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B436	51	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B437	39	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B438	50	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B439	63	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B440	45	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B441	61	männlich	√									
B442	68	männlich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	TT	TT	AA	CC
B443	41	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
B444	42	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B445	53	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B446	37	männlich	-	AA		TC	-G\+G	TT	TT	TT	AG	CC
B447	43	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	AG	CC
B448	35	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B449	35	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B450	58	männlich	-	AG	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B451	59	männlich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B452	63	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AC
B453	37	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	TT	GG	CC
B454	45	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B455	35	männlich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	TT	TT	AG	CC
B456	49	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B457	35	männlich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B458	42	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B459	47	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B460												
B461	63	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B462	38	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	AG	CC
B463	59	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B464	49	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B465												
B466	43	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B467	64	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B468	60	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B469	55	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B470	37	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B471	47	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC

B472	47	männlich	√	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B473												
B474	37	männlich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B475	53	männlich	√	GG	TG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B476	40	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B477	44	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B478	46	weiblich	√	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	TT	AA	AA
B479	36	männlich	√	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B480	41	männlich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AA	AC
B481	40	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B482	53	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B483	41	männlich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B484	57	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B485	46	männlich	-	AG	TG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B486	42	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B487	35	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B488	36	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B489	44	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B490	43	weiblich	√	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B491	64	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B492	52	männlich	-	AG	TG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B493	36	männlich	-	AG	TG	CC	-G\+G	TT	CC	TT	GG	CC
B494	37	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B495	39	männlich	-	AG	TG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B496	56	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B497	40	weiblich	√	GG	TG	TT	+G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B498	36	männlich	√	AA	GG	CC	-G\G	TT	TT	TT	GG	CC
B499	58	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B500	46	männlich	√	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B501	38	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B502	40	männlich	√	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B503	42	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B504	48	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TT	TT	GG	CC
B505	63	weiblich	√	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B506	49	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B507	63	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B508	40	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B509	54	männlich	√	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AG	AA
B510	62	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B511	48	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B512	43	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TT	TT	AG	CC
B513	37	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AA	AC

B514	35	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AA	AC
B515	36	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TT	TT	AG	CC
B516	45	männlich	-	AA	GG	TT	-G\G	TT	TC	TC	AA	AC
B517	48	männlich	√	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B518	42	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AG	AA
B519	46	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AA	AC
B520	37	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	GG	AC
B521	46	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AA	AC
B522	52	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B523	38	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B524	40	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AG	AA
B525	45	männlich	-	AG	TG	TT	+G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B526	37	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B527	60	männlich	√	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B528	41	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B529	41	männlich	√	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B530	42	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B531	39	weiblich	-	AA	TG	CC	-G\G	GT	TT	TC	AG	AC
B532	51	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B533	36	männlich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B534	36	männlich	√	AA	GG	CC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B535	54	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B536	38	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B537	47	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B538	44	männlich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TC	TC	AG	AC
B539	41	weiblich	√	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B540	44	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B541	51	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	GG	AC
B542	42	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	TT	TT	GG	CC
B543	39	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B544	41	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B545	48	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B546	55	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	TC	TC	AA	AC
B547	40	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B548	46	männlich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B549	48	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\G	TT	CC	CC	AA	AA
B550	50	männlich	-	AG	GG	CC	-G\G	TT	TT	TT	GG	AA
B551	38	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\G	TT	CC	CC	AA	CC
B552	38	männlich	√	AG	TG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B553			-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B554	35	männlich	√	GG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TT	AA	AC
B555	40	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TT	CC	AA	AA

B556	59	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B557	46	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B558	65	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B559	48	männlich	-	GG	TG	TT	+G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B560	46	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B561	40	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B562	66	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B563	48	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B564	67	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B565	54	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B566	51	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
B567	65	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B568	35	männlich	-	GG	TG	TT	+G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B569	65	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B570	52	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B571	59	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B572	38	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B573	39	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
B574	47	weiblich	√	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B575	65	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B576	31	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B577	54	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TT	CC	AA	AA
B578	39	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B579	40	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B580	53	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TT	CC	AA	AA
B581	62	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B582	51	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TT	CC	AA	AA
B583	35	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B584	47	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B585	47	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B586	49	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B587	59	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TT	CC	AA	AA
B588	33	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B589	53	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TT	CC	AA	AA
B590	45	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B591	35	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	TT	CC	AA	AA
B592	41	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B593	35	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B594	44	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B595	37	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B596	49	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	TT	CC	AA	AA
B597	46	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA

B598	50	männlich	-	GG	TG	TT	+G\+G	GT	TT	CC	AA	AA
B599			-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B600	40	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B601	40	weiblich	√	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B602	37	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B603	53	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B604	42	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B605	48	männlich	√	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B606	65	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B607	38	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B608	39	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B609	56	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B610	52	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B611	38	männlich	√	AG	TG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B612	58	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B613	33	männlich	-	AG	TG			TT	CC	TC	AG	AC
B614				AA	TG		-G\+G	GG		TT	AG	AC
B615	62	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	AG	CC
B616	36	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B617	37	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	AG	CC
B618	45	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B619	57	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B620	44	männlich	-	GG	TG	TT	+G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B621	46	männlich	√	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B622	43	weiblich	√	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B623	63	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B624	53	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B625	48	weiblich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B626	41	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B627	48	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B628	39	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B629	36	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	AG	CC
B630	57	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	AG	CC
B631	34	männlich	-	GG	TG	TT	+G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B632	51	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B633	60	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B634	51	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B635	55	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B636	60	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
B637	59	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B638	43	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B639	39	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC

B640	38	weiblich	-	AG	TG	TT	+G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B641	60	männlich	-	GG	TG	TT	+G\+G	GT	TT	CC	AA	AA
B642	37	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B643	46	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B644	63	männlich	√	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B645	60	weiblich	-	AG	TG	TC	+G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B646	43	männlich	-	AG	TG	TC	+G\+G	TT	CC	CC	AA	AC
B647	41	weiblich	-	AA	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AA
B648	38	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B649	51	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B650	64	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B651	57	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
B652	53	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B653	55	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B654	37	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B655	37	männlich	-	AG	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B656	51	männlich	-	AG	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B657	46	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B658	48	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B659	45	männlich	√	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B660	45	männlich	√	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B661	39	weiblich	√	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B662	44	männlich	-	GG	GG	TT	+G\+G	GG	CC	CC	AA	AA
B663	43	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B664	41	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B665	38	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B666	62	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B667	43	männlich	√	AG	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B668	45	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B669	37	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AA
B670	42	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	AG	CC
B671	40	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AG	AA
B672	42	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B673	32	männlich	√	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B674	35	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B675	54	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TT	CC	AA	AA
B676	40	weiblich	-					TT	TT	CC	AA	
B677	66	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B678	43	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B679				AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B680	56	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B681	45	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC

B682	57	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B683	47	männlich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B684	38	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B685	35	männlich	√	AG		TC	-G\+G	TT	CT	TC	AG	AC
B686				AG	TG	TC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B687	50	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B688	46	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B689	47	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	CC	AA	AA
B690	45	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B691	35	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B692	53	männlich	-	AA				TT			AA	
B693	49	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B694	50	weiblich	-	AG	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B695	61	männlich	√	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B696	37	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TT	CC	AA	AA
B697	40	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B698	51	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B699	46	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B700	61	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B701	42	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B702	50	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B703	37	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B704	36	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
B705	34	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B706	37	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B707	54	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B708	60	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	CC	AG	AC
B709	62	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B710	67	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B711	43	weiblich	√	AG	TG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B712	37	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TC	TC	AA	AC
B713	58	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B714	38	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B715	45	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B716	58	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B717	43	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B718	36	weiblich	-	AG	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
B719	58	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B720	43	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B721	54	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B722	53	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B723	50	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC

B724	39	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	AG	CC
B725	55	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B726	50	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B727	38	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B728	65	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B729	42	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B730	55	männlich	-	AA	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AG	AA
B731	51	männlich	-	AG	TG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B732	43	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B733	50	männlich	-	GG	TG	TT	+G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B734	45	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B735	37	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B736	47	männlich	√	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B737	46	männlich	√	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B738	41	männlich	-	AG	TG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B739	43	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B740	42	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B741	43	männlich	-	AG	TG	TT	+G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B742	36	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	TC	TC	AG	AC
B743	51	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B744	55	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B745	64	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B746	44	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TT	GG	CC
B747	49	männlich	√	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B748	43	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B749	45	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B750	67	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B751	45	weiblich	√	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B752	38	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B753	59	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B754	40	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B755	51	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B756	34	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B757	42	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B758	43	weiblich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B759	39	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B760	61	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B761	50	weiblich	-	AG	TG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B762	41	männlich	√	AA	GG	TT	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B763	40	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B764	37	weiblich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TT	TT	AG	CC
B765	63	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA

B766	58	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B767	44	weiblich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B768	67	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B769	46	weiblich	-	AG	TG	TT	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B770	65	männlich	√	AA	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B771	34	männlich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B772	43	weiblich	-	AA	GG	TT	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B773	38	weiblich	√	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B774	52	männlich	√	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B775	42	weiblich	√	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	TC	AA	AC
B776	37	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B777	41	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B778	60	männlich	√	AA	nix	CC	-G\+G	TT	TC	TT	AG	AC
B779	66	männlich	√	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B780	44	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	CC	TC	AA	AA
B781	47	weiblich	-	AG	GG	TC	-G\+G	GT	CC	CC	AA	AA
B782	42	männlich	-	AG	GG	TC	-G\+G	TT	CC	TC	AA	AA
B783	43	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	TC	CC	AG	AC
B784	42	männlich	-	AA	GG	TC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B785	40	weiblich	-	GG	TG	TC	-G\+G	GT	CC	TC	AA	AA
B786	38	männlich	-	AG	TG	TC	+G\+G	TT	TC	CC	AG	AC
B787	45	männlich	-	AG	GG	CC	-G\+G	TT	TC	TC	AG	AC
B788	35	männlich	-	AG	TG	CC	-G\+G	TT	TC	CC	AG	AC
B789	44	weiblich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B790	42	männlich		AA	GG	CC	-G\+G	TT	TT	TC	GG	CC
B791	51	männlich	-	AA	GG	CC	-G\+G	TT	CC	CC	AA	AA
B792	65	männlich	-	AG	TG	TC	-G\+G	TT	TC	CC	AA	AC
B793	59	männlich	-	AG	GG	TT	-G\+G	GT	TT	CC	AA	AA