

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

# **Untersuchungen zum Einfluss von Polymorphismen im humanen Interleukin 23R-Gen auf die Pathogenese der chronischen Parodontitis**

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

vorgelegt von  
Christine Graßl  
aus Dachau

2013

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

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

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Pamela Zengel,

Prof. Dr. Manfred Zimmermann

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2013

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>7</b>
1.1 Epidemiologie.....	8
1.2 Klassifikation.....	9
1.3 Chronische Parodontitis.....	10
1.4 Ätiologie .....	12
1.4.1 Mikroorganismen der Mundhöhle .....	12
1.4.2 Suszeptibilität des Wirtsorganismus.....	13
1.5 Pathogenese .....	15
1.5.1 Plaque .....	15
1.5.2 Stimulation der Immunantwort.....	15
1.5.3 Attachmentverlust.....	16
1.6 Identifikation genetischer Determinanten .....	17
1.7 Funktion und Bedeutung des Interleukin 23 und seines Rezeptors.....	20
<b>2 Zielsetzung der Studie und allgemeine Vorgehensweise.....</b>	<b>22</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
3.1 Auswahl der Studienpopulationen.....	23
3.1.1 Münchner Studienpopulation .....	23
3.1.2 Kieler Studienpopulation .....	25
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	26
3.2.1 Blutabnahme und Isolierung der DNA .....	26
3.2.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren .....	26
3.2.3 Polymerasekettenreaktion.....	27
3.2.4 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET).....	27
3.2.5 Agarosegelektrophorese .....	28
3.3 Durchführung .....	28
3.3.1 Etablierung der Primer und Sonden.....	28
3.3.2 Durchführung der Genotypisierung mit dem LightCycler® .....	33
<b>4 Statistische Auswertung .....</b>	<b>35</b>
4.1 Hardy-Weinberg-Equilibrium .....	35
4.2 Chi-Quadrat-Test .....	36
4.3 Quotenverhältnis.....	36
4.4 Bonferroni-Korrektur für multiples Testen .....	36

<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
5.1 Allgemeine Vorbemerkungen .....	37
5.2 Bestimmung der Genotypen .....	37
5.3 Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Equilibrium .....	42
5.4 Verteilung der Allele und Genotypen.....	43
5.4.1 rs1004819 .....	44
5.4.2 rs7517847 .....	46
5.4.3 rs10489629 .....	48
5.4.4 rs2201841 .....	50
5.4.5 rs11465804 .....	52
5.4.6 rs11209026 .....	54
5.4.7 rs1343151 .....	56
5.4.8 rs10889677 .....	58
5.4.9 rs11209032 .....	60
5.4.10 rs1495965 .....	62
5.4.11 rs1884444 .....	64
5.4.12 rs7530511 .....	65
5.5 Haplotypen .....	66
5.5.1 Haplotypen in der Münchener Studiengruppe.....	66
5.5.2 Haplotypen in der Kieler Studiengruppe .....	68
<b>6 Diskussion.....</b>	<b>71</b>
6.1 Studiendesign und Methode .....	71
6.1.1 Auswahl der Studienkollektive.....	72
6.1.2 Auswahl der genetischen Marker .....	73
6.1.3 Validität der verwendeten Genotypisierungsmethoden.....	74
6.2 Vergleich der Kontrollgruppen mit Referenzpopulationn .....	74
6.3 Bewertung der Ergebnisse aus genetischer Sicht .....	77
6.4 Einflüsse genetischer Varianten auf die Funktion des IL23-Rezeptors .....	79
6.5 Schlussfolgerung .....	81
<b>7 Zusammenfassung .....</b>	<b>82</b>
<b>8 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>9 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>95</b>
<b>10 Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>96</b>
<b>11 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>99</b>
<b>12 Anhänge.....</b>	<b>101</b>
12.1 Geräte .....	101

12.2 Software .....	102
<b>13 Danksagung .....</b>	<b>103</b>

# 1 Einleitung

Die chronische Parodontitis (CP) stellt eine der weltweit häufigsten Erkrankungen dar. Sie greift das parodontale Weichgewebe und den alveolären Knochen an und ist eine der Hauptursachen für Zahnverlust bei Erwachsenen.<sup>1</sup> Des Weiteren gilt sie als Risikofaktor für systemische Erkrankungen.<sup>2</sup>

Die Ätiologie der häufig in Schüben verlaufenden chronischen Entzündung ist bisher nur teilweise aufgeklärt. Man geht von einer multifaktoriellen Genese aus, die sowohl die Infektion mit Mikroorganismen als auch umweltbedingte, erworbene und genetische Komponenten einschließt.<sup>3</sup>

Insbesondere durch die Erforschung der immunologischen Zusammenhänge erhofft man sich neue therapeutische Strategien. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden hierzu Mutationen im Interleukin-23-Rezeptor-Gen (IL23R) auf Assoziationen zur CP untersucht. Dieses Gen war von Duerr et al. 2006 als Risikogen für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen identifiziert worden.<sup>4</sup> Aufgrund vieler Gemeinsamkeiten der beiden Krankheitsbilder wurde auch ein Zusammenhang zur Parodontitis vermutet.

## 1.1 Epidemiologie

Eindeutige Aussagen über die weltweite Prävalenz und den Schweregrad der parodontalen Erkrankungen zu treffen, ist nur eingeschränkt möglich. Zwar existiert eine Datenbank der WHO (World Health Organization)<sup>5</sup>, in der die Ergebnisse zahlreicher nationaler und internationaler Studien zusammengeführt sind, jedoch kann diese aufgrund mangelnder Vergleichbarkeit und Validität nur in Auszügen für wissenschaftliche Aussagen herangezogen werden. Grundsätzlich ist diesen zu entnehmen, dass die Parodontitis eine hohe Prävalenz aufweist, sowohl in den Industrieländern, als auch in den weniger entwickelten Ländern. Ebenso ist eine eindeutige Steigerung der Inzidenz und des Schweregrades mit zunehmendem Lebensalter zu beobachten.<sup>5</sup>

Die weltweit höchste Prävalenz für parodontale Erkrankungen scheint in der afrikanischen Ethnie vorzuliegen, gefolgt von Hispanics und Asiaten. Als Gründe hierfür werden ein niedriger sozioökonomischer Standard, der eine zahnärztliche Behandlung unmöglich macht, mangelndes Mundhygieneverhalten und unzureichendes Gesundheitsbewusstsein ebenso diskutiert wie die Varianz mikrobieller Risikofaktoren.<sup>6</sup> Des Weiteren wurde in Zwillingsstudien bewiesen, dass die Genetik Auswirkungen auf die individuelle Erkrankungswahrscheinlichkeit hat,<sup>28</sup> eine Tatsache, die auch die Prävalenz innerhalb einer Bevölkerungsgruppe beeinflusst.

Über die Situation in Deutschland gibt die vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV) aus dem Jahr 2006<sup>7</sup> Auskunft: Während die Prävalenz parodontaler Erkrankungen bei Jugendlichen relativ niedrig ist – 12,6 % sind von einer mittelschweren und 0,8 % von einer schweren Form betroffen – tritt die Erkrankung bei Erwachsenen wesentlich häufiger auf. 52,7 % der 35- bis 44-Jährigen leiden bereits an einer mittelschweren, 20,5 % an einer schweren Parodontitis. Die höchste Prävalenz ist bei den Senioren zu finden. Hier liegt die Häufigkeit der mittelschweren Form bei 48,0 % und die der schweren Form bei 39,8 %.

Bei zusätzlicher Betrachtung älterer Studien, z.B. der DMS III aus dem Jahr 1997,<sup>8</sup> ist eine steigende Tendenz der Parodontitiden unter Erwachsenen und Rentnern auffallend, die auf eine sinkende Zahnverlustrate einerseits und eine gesteigerte Lebenserwartung andererseits zurückgeht. Durch moderne Verfahren in der konservierenden Behandlung und durch verbessertes Mundhygienebewusstsein verbleiben durchschnittlich mehr Zähne länger im Mund. Es sind also im hohen Alter noch mehr Parodontien erhalten, die wegen

abnehmender Mundhygienefähigkeit der Patienten für die Ansiedelung von Mikroorganismen prädestiniert sind.

Im europäischen Vergleich weist die deutsche Bevölkerung einen verhältnismäßig hohen Prozentsatz an schweren und mittelschweren Parodontitiden auf.<sup>9</sup>

## 1.2 Klassifikation

Die Bezeichnung „parodontale Erkrankungen“ umfasst sowohl inflammatorische als auch rezessive Erkrankungen der Gingiva und des Parodonts.<sup>10</sup> Nach der momentan gültigen Einteilung, welche 1999 beim „*International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions*“ (ICD) erarbeitet wurde, unterscheidet man acht verschiedene Haupttypen.<sup>11</sup> An dieser international anerkannten Klassifikation waren führende Mitglieder der American Academy of Periodontology (AAP) und der European Federation of Periodontology (EFP) beteiligt. Die Zusammenfassung wurde von Gary C. Armitage veröffentlicht und von der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DGP) übernommen.<sup>12</sup> Die Grundstruktur der sehr detaillierten Einteilung ist im Folgenden wiedergegeben:

### ***Klassifikation parodontaler Erkrankungen und Zustände (AAP 1999)***

*Gingivopathien*

*Chronische Parodontitis*

*Aggressive Parodontitis*

*Parodontitis als Manifestation von systemischen Erkrankungen*

*Nekrotisierende parodontale Erkrankungen*

*Abszesse des Parodonts*

*Parodontitis im Zusammenhang mit endodontalen Läsionen*

*Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformitäten und Zustände*

In der vorliegenden Studie wurde ausschließlich die marginale CP untersucht. Daher beziehen sich auch alle folgenden Kapitel dieser Arbeit auf die CP, sofern nicht ausdrücklich anders angegeben.

### 1.3 Chronische Parodontitis

Die chronische Parodontitis, die häufigste Form der parodontalen Entzündungen, hat um das 30. Lebensjahr die höchste Inzidenz. Vorausgehend ist stets eine Gingivitis, die den Anfang des langsamem, oft schubweisen Verlaufs bildet. Meist sind einzelne, unregelmäßig verteilte Bereiche des Parodonts betroffen, seltener tritt ein generalisierter Befall des gesamten Gebisses auf. Die entzündete Gingiva ist entweder geschwollen oder geschrumpft und der Alveolarknochen weist lokal unterschiedlich ausgeprägte Formen von Resorptionen auf. In den aktiven Taschen findet sich eine Mischflora, die Keime wie *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* enthält.<sup>14</sup>

Zur Diagnostik der Parodontitiden werden verschiedene Befunde erhoben. Nach der allgemeinen und speziellen Anamnese erfolgt im klinischen Alltag routinemäßig eine Voruntersuchung, in der Regel anhand des „Parodontalen Screening Index“ (PSI).<sup>13</sup> Stellt sich heraus, dass eine Erkrankung vorliegt, wird mit dem klassischen Parodontalfbefund fortgefahrene. Dieser umfasst die Untersuchung, Quantifizierung und Dokumentation folgender Parameter:

**Tabelle 1: Parodontale Untersuchungsparameter<sup>14</sup>**

Gingivale Entzündung	(PBI, BOP)
Plaquebefall	(API, PI)
Klinischer Attachmentverlust (= Sondierungstiefe + Rezession)	
Furkationsbefall	F1 – F3
Klinisches Knochenniveau	
Taschenaktivität	Exsudat, Pus
Zahnbeweglichkeit	ZB

Außerdem wird eine Funktionsanalyse durchgeführt und der Attachmentverlust anhand der Röntgenbefunde beurteilt.<sup>14</sup>

In der Regel kann auf der Basis dieser Informationen eine Diagnose gestellt werden. Sind die Befunde nicht ausreichend oder spezielle Auffälligkeiten vorhanden, besteht die Möglichkeit, weitergehende – wie z.B. mikrobielle oder immunologische – Untersuchungen zu veranlassen.

Die meisten heutzutage gebräuchlichen Therapien zur Entzündungsbekämpfung zielen auf die Prävention der Anlagerung oder die mechanische Entfernung des Biofilms ab. Dies geschieht mittels professioneller Zahnreinigung und Wurzelreinigung (subgingivales Scaling). Im fortgeschrittenen Stadium können auch chirurgische Eingriffe indiziert sein, sowie in Spezialfällen ergänzende pharmakologische, funktionelle, orthodontische und prothetische Therapien.<sup>15</sup> Teil der Behandlung ist auch die Kontrolle der beeinflussbaren Risikofaktoren beispielsweise durch Motivation und Instruktion des Patienten zur besseren Mundhygiene, Aufklärung über die Folgen des Rauchens und Alkoholkonsums sowie Ernährungsberatung. Nach der initialen Therapie wird der Patient zur Reevaluation und anschließend in angemessenen Zeitabständen zur unterstützenden PA-Therapie (UPT) wiedereinbestellt.

Was die Zukunft der Parodontitistherapie betrifft, so gibt es auf dem Gebiet der Pharmakologie neue Ansätze, die das Spektrum der Antibiotika und der Substanzen mit antimikrobieller Wirkung erweitern. Aufgrund der Erkenntnis der Bedeutsamkeit der Wirtsantwort wird an Medikamenten geforscht, welche die proinflammatorischen Prozesse hemmen oder die entzündungsauf lösenden verstärken sollen.<sup>16,17</sup>

Der Vollständigkeit halber seien hier auch die regenerativen Verfahren erwähnt. Diese haben keinen Einfluss auf die Entzündung und sollten erst nach Ausheilung der bakteriellen Infektion angewendet werden. Außer Knochen- und Weichgewebstransplantationen und dem Einsatz von Barrieremembranen ist in den letzten Jahren die Möglichkeit hinzugekommen, in bestimmten Fällen mittels Schmelz-Matrix-Proteinen die Neubildung aller beteiligten parodontalen Gewebe zu forcieren.<sup>18</sup>

## 1.4 Ätiologie

Die Parodontitis ist eine pathologische Entzündungsreaktion auf eine polymikrobielle Infektion. Durch die Entgleisung des Gleichgewichts zwischen subgingivalem mikrobiellem Milieu und Immunabwehr kommt es bei suszeptiblen Personen zur Zerstörung parodontalen Gewebes.<sup>19</sup>

### 1.4.1 Mikroorganismen der Mundhöhle

Die Anzahl der oralen Prokaryonten wird auf ca. 600 geschätzt.<sup>20</sup> Eine beeindruckende Zahl, die die Frage aufkommen lässt, welche davon nun schuld an der Parodontitis sind.

Lange Zeit standen sich zwei Hypothesen gegenüber: Die nichtspezifische Plaquehypothese, die davon ausging, dass allein die Menge an Plaque ausschlaggebend sei für eine Entzündung,<sup>21,22</sup> und die spezifische Plaquehypothese, welche die Anwesenheit spezieller parodontalpathogener Bakterien nach den Postulaten von Henle und Koch als Voraussetzung für eine Infektion ansah<sup>23,24</sup>.

Heutzutage geht man von der sogenannten ökologischen Plaquehypothese aus. Ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Spezies wird vermutet, welches beim gesunden Individuum im Gleichgewicht ist. Die Erkrankung entsteht erst, sobald dieses Gleichgewicht durch Änderungen der mikrobiologischen Lebensbedingungen, wie z.B. des pH-Wertes, des Redoxpotentials oder der Verfügbarkeit von Nährstoffen verschoben und die Proliferation pathogener Bakterien-Spezies begünstigt wird.<sup>25</sup>

Die Erforschung dieser Zusammenhänge wird durch verschiedene Tatsachen erschwert: einerseits sind noch nicht alle pathogenen Bakterien charakterisiert, andererseits treten die Mikroorganismen aufgrund genetischer Variabilität selbst innerhalb ihrer Art in zahlreichen genetischen Klonen mit zum Teil divergenten Eigenschaften auf.

Dass es allerdings unterschiedliche Grade von Pathogenität gibt, ist schon länger bekannt: Tabelle 2 zeigt die von Haffajee und Socransky im Jahr 1994 ermittelten Assoziationsstärken verschiedener Bakterienarten mit der Parodontitis.<sup>26</sup> Weitere assoziierte Spezies wurden erst nach der Einführung molekularer Methoden entdeckt, u.a.: *Eubacterium nodatum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella tannerae*, *Filifactor alocis* und *Treponema denticola*.<sup>22</sup>

**Tabelle 2: Hierarchie der Pathogenität parodontaler Mikroorganismen nach Haffajee und Socransky<sup>26</sup>**

Assoziation	Sehr stark	Stark	Moderat
Spezies	A. actinomycetemcomitans Spirochäten der ANUG P. gingivalis	B. forsythus (= T. forsythia) P. intermedia C. rectus E. nodatum Treponema sp.	S. intermedius P. nigrescens P. micros F. nucleatum Eubacterium sp. E. corrodens

Die hier gezeigte unterschiedliche Pathogenität der Keime beruht auf verschiedenen Virulenzfaktoren, die jeweils spezifische biologische Wirkungen bedingen. Die Spezies, die am stärksten mit der Parodontitis assoziiert sind, gehören allesamt zur Gruppe der gramnegativen Anaerobier. Die anaerobe Lebensweise prädestiniert sie für den subgingivalen Lebensraum am Boden der parodontalen Tasche. Ebenso besitzen gramnegative Bakterien durch die Bestandteile ihrer äußeren Membran – wie z.B. das LPS – besonders starke Virulenz, die den Keimen ermöglicht, sich fest anzusiedeln und das Gewebe weiter zu schädigen.<sup>14</sup>

#### 1.4.2 Suszeptibilität des Wirtsorganismus

Die Gründe für die Empfänglichkeit eines Individuums für Parodontitis liegen sowohl in der genetischen Ausstattung als auch in umweltbedingten oder erworbenen Faktoren.

Zu Beginn der Forschung nach genetischen Risikomarkern der Parodontitis wurde vorwiegend bei der früh einsetzenden Form, die nach der Klassifikation von 1999 als „*aggressive Parodontitis*“ bezeichnet wird, ein Zusammenhang mit erblichen Faktoren vermutet. Familiäre Häufung diente damals als ein Unterscheidungsmerkmal zwischen der chronischen und der aggressiven Form. Erst 1993 gaben die Studien von *van der Velden et al.*, in denen er verschiedene schwere Formen von Parodontitis bei jungen erwachsenen indonesischen Geschwistern untersuchte, erste Hinweise darauf, dass auch die Pathogenese weniger aggressiver Parodontitiden eine genetische Komponente aufweist.<sup>27</sup> Die Erkenntnisse aus den Zwillingsstudien von Michalowicz stellten sogar eine Erblichkeit von bis zu 50 % an der Ätiologie der CP fest.<sup>28</sup> Welche Mechanismen dieser Prädisposition zugrunde liegen und welche Gene dafür relevant sind, war damit aber noch nicht geklärt. Die Forschungsansätze zur Klärung dieser Frage werden im Kapitel 1.6 erläutert.

Zusätzlich zu den genetischen Risikofaktoren wirken sich einige systemische Faktoren auf die Prävalenz und den Schweregrad der Erkrankung aus. Dies betrifft einerseits

systemische, das Immunsystem beeinträchtigende Krankheiten wie Diabetes und HIV, und andererseits verschiedene Medikamentenklassen, allen voran die Immunsuppressiva.<sup>29</sup>

Dennoch kann die Krankheit auch durch die Art der Lebensführung verhindert bzw. gemildert oder aber auch verursacht bzw. verschlechtert werden. Eine herausragende Rolle spielen dabei folgende Faktoren:

Risikoerhöhende Effekte hat das Rauchen von Tabak auf die Entwicklung einer Parodontitis. Raucher haben gegenüber Nichtrauchern nicht nur ein ca. zwei- bis dreifach erhöhtes Erkrankungsrisiko, sondern auch einen dosisabhängig schwereren Krankheitsverlauf und eine höhere durchschnittliche Zahnverlustrate.<sup>30</sup> Es ist noch unklar, ob dies neben der Minderdurchblutung auf eine Steigerung der Pathogenität in der subgingivalen Mikroflora zurückzuführen ist, und / oder darauf, dass das Rauchen die Immunantwort des Wirts abschwächt.<sup>31,32</sup>

Den zweiten wichtigen modulierenden Faktor stellt die Stärke der Infektion – messbar an der Menge der Plaqueanlagerung – dar. Es ist allgemein anerkannt und durch Studien belegt, dass eine gute Mundhygiene und regelmäßige zahnärztliche präventive Maßnahmen zu einer niedrigeren Inzidenz parodontaler Krankheiten führen.<sup>33,34</sup> Umgekehrt wiesen *Löe et al.* schon 1965 den Zusammenhang zwischen Plaqueanlagerung und der Ausbildung von Gingivitiden nach.<sup>21</sup>

Weniger offensichtlich und schwieriger zu quantifizieren ist der Einfluss, den die Psyche auf das Krankheitsgeschehen hat. Dennoch gibt es neben der klinischen Evidenz auch Studien, die chronischen psychischen Stress als Risikofaktor ansehen.<sup>35</sup> Man kann vermuten, dass diese Befunde auf vernachlässigte Mundhygiene in stressigen Lebensphasen zurückgehen, dagegen spricht jedoch, dass auch in Studien, in denen Co-Risikofaktoren wie Rauchen, Geschlecht, Alter und Mundhygiene kontrolliert wurden, signifikante Assoziationen mit psychosozialem Stress detektiert wurden.<sup>36,37</sup>

## 1.5 Pathogenese

### 1.5.1 Plaque

Das Vorspiel der parodontalen Erkrankung stellt die Anlagerung von Plaque an das Schmelzoberhäutchen der Kronenoberfläche dar. Schon nach kurzer Zeit organisieren sich die in der Plaque enthaltenen Mikroorganismen zu einem Biofilm, innerhalb dessen sie sich gegenseitig stabilisieren und metabolisch interagieren. Durch eine extrazelluläre Polysaccharidschicht sind die Bakterien gegen Fresszellen und Bakterizide gut geschützt.<sup>38</sup> Sofern der Biofilm in diesem Stadium nicht durch Reinigungsmaßnahmen entfernt wird, heften sich neben den erstbesiedelnden, meist grampositiven Mikroorganismen (v.a. Streptokokken und Actinomyceten) in den folgenden Tagen neue, insbesondere gram-negative Kokken, Stäbchen und Filamente an die Zahnoberfläche an. Die Zusammensetzung der Kolonie verschiebt sich in Richtung der gramnegativen Bakterien.<sup>39</sup>

### 1.5.2 Stimulation der Immunantwort

Die Vorgänge, welche anschließend folgen, werden, solange sie sich ausschließlich auf die Gingiva beziehen und reversibel sind, als Gingivitis bezeichnet. Aus einer Gingivitis kann eine Parodontitis entstehen, die definitionsgemäß alle parodontalen Gewebe betrifft und mit Gewebedestruktion einhergeht.

Zytotoxische Stoffe, die im Plaqueexsudat enthalten sind, wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS), Fettsäuren und Peptide aus dem Stoffwechsel gramnegativer Bakterien werden in den Sulcus geschwemmt. Auf diese Weise zugeführte Hyaluronidase zerstört die Zell-Zell-Kontakte und schafft so eine Eintrittspforte ins Saumepithel. Dort werden die Mikroorganismen und ihre Endo- und Exotoxine von ortsständigen Zellen und Leukozyten in der Umgebung über Toll-like Rezeptoren (TLRs) und Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomänen (NODs) erkannt und aktivieren auf diese Weise das angeborene Immunsystem. Über eine intrazelluläre Signalkaskade kommt es zur Freisetzung inflammatorischer Zytokine (IL1, IL6, Tumornekrosefaktor  $\alpha$  und weitere), sowie zur Leukozyteneinwanderung und Osteoklastogenese.<sup>40,41,42</sup>

Nicht nur das angeborene, sondern auch das erworbene Immunsystem ist an der Reaktion des Wirtes beteiligt. Auch hier werden die Antigene über TLRs und NODs von antigenpräsentierenden Zellen wie den dendritischen Zellen erkannt. In der Folge werden von den

dendritischen Zellen co-stimulatorische Moleküle und unterschiedliche Zytokine exprimiert, mittels derer die nachfolgende Polarisierung und Aktivierung der antigenspezifischen T-Helferzellen erfolgt.<sup>43</sup> Spezialisierte T-Helfer-Zell-Untereinheiten wandern zum Reaktionsort und produzieren dort wiederum Zytokine, die unter anderem B-Zellen zur Umwandlung in Antikörper-produzierende Plasmazellen anregen.<sup>44</sup>

Das aufgelockerte, entzündete Sulcusepithel hat nun seine Barrierefunktion verloren. Es haftet nicht mehr am Zahn, wodurch es zur Bildung einer parodontalen Tasche kommt. Einer Ausbreitung nach apikal steht jetzt nichts mehr im Wege, zumal sich am Boden der Tasche wegen der idealen Bedingungen vorzugsweise die besonders aggressiven anaeroben, gramnegativen Mikroorganismen befinden.<sup>14</sup>

### 1.5.3 Attachmentverlust

Die zunächst lokale Entzündungsreaktion breitet sich durch Zytokine und andere Entzündungsmediatoren in der Gingiva aus. Gelingt es nicht, diese „Entzündungsfront“ einzuschränken, wandert sie weiter bis in den alveolären Knochen.<sup>45</sup> Dort kommt es zu einer Zerstörung parodontalen Gewebes, die auf mehreren Mechanismen beruht, welche untereinander interagieren. Die Entzündung schädigt einerseits Kollagen und extrazelluläre Matrix direkt und bringt andererseits den Metabolismus des Knochens aus dem Gleichgewicht.<sup>46,47</sup>

In der extrazellulären Matrix des gesunden Bindegewebes wird der Gewebeauf- und abbau durch eine Gruppe von Proteasen, die Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und ihre Gegenspieler, die Gewebeinhibitoren der Metalloproteasen (TIMPs) reguliert.<sup>48</sup> Da in erkrankten parodontalen Geweben eine Verschiebung des regulären Verhältnisses von MMPs zu TIMPs zugunsten der MMPs festgestellt wurde, geht man davon aus, dass sie an der Zerstörung von Weichgewebe und Alveolarknochen beteiligt sind.<sup>49</sup>

Die Osteoklasten, also jene Zellen, die physiologischerweise für den Abbau des Knochens zuständig sind, werden vom RANK/RANKL-System reguliert. RANK (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B) ist ein Oberflächenrezeptor auf Prä-Osteoklasten und kann entweder vom RANK-Liganden (RANKL) oder durch Osteoprotegrin (OPG) besetzt werden. RANKL wird von T-Zellen exprimiert und gehört zu den Tumor-Nekrose-Faktoren. Bei Bindung an RANK wird der entsprechende Prä-Osteoklast aktiviert und zur Reifung

angeregt und damit indirekt der Knochenabbau befördert. Counterpart ist hier das OPG. Es blockiert als kompetitiver Antagonist die Bindungsstelle und schützt somit vor Knochenabbau.<sup>50</sup> Auch für RANKL wurden bei Parodontitispatienten erhöhte Werte im erkrankten Gewebe festgestellt.<sup>51,52</sup>

In den Signalwegen dieser gewebeabbauenden Mechanismen spielen Zytokine wie TNF- $\alpha$ , und IFN- $\gamma$  (Gamma-Interferon) eine aktive Rolle. Daher ging man in den letzten Jahren davon aus, dass die parodontale Gewebezerstörung – beruhend auf diesen vermeintlich schädlichen Mediatoren – das Resultat einer unangemessenen Immunabwehr sei. Nicht übersehen darf man dabei jedoch, dass genau diese Zytokine an der erfolgreichen Infektabwehr und Entzündungseingrenzung im Parodontium beteiligt sind, so dass ihre Rolle differenziert beurteilt werden muss.<sup>53</sup>

## 1.6 Identifikation genetischer Determinanten

Wie im Kapitel 1.4.2 erläutert, sind genetische Faktoren mitverantwortlich für das Risiko, an Parodontitis zu erkranken. Um herauszufinden, von welchen Genloci diese Suszeptibilität abhängig ist, kann prinzipiell auf verschiedene Arten vorgegangen werden.

In diesem Fall bestand ein Anhaltspunkt für die Suche nach einem Kandidatengen darin, dass *Lester et al.* 2007 in einer Vergleichsstudie erhöhte Werte von IL23 und IL17 im entzündeten parodontalen Gewebe messen konnten. Die Hypothese lag nahe, dass die Pathogenese der Parodontitis mit dem kurz zuvor entdeckten IL23-IL17-Signalweg in Zusammenhang steht.<sup>54,55</sup> Hinzu kam die Beschreibung des IL23R-Gens als Krankheitsgen für entzündliche Darmerkrankungen von *Duerr et al.*<sup>4</sup> Viele Ähnlichkeiten, wie die Lokalisation in der Schleimhaut, die Assoziation zu Mikroorganismen, die Chronizität und der gemeinsame Risikofaktor Rauchen, ließen eine Verwandtschaft in der Ätiologie der beiden Krankheiten vermuten.<sup>19</sup>

Innerhalb eines Gens sind vor allem polymorph besetzte Basenpositionen an definierten Genorten, die eine Häufigkeit > 1% aufweisen, sogenannte Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs: single nucleotide polymorphisms)<sup>56</sup> von Interesse. Indem die Häufigkeit des selteneren Minor-Allels in einem Patientenkollektiv mit der Häufigkeit innerhalb einer gesunden Kontrollgruppe verglichen wird, werden die tatsächlich relevanten Polymorphismen herausgefiltert. Solche Polymorphismen können Änderungen in der Primärstruktur

des Genprodukts bedingen oder sich auf die Regulation der Expression auswirken. Im Hinblick auf eine Erkrankung sind hier sowohl prädisponierende als auch protektive Varianten möglich.<sup>57</sup>

Unter den SNPs bestehen Unterschiede hinsichtlich ihrer Lokalisation. Man differenziert zwischen Polymorphismen, die innerhalb einer kodierenden Region, also innerhalb eines Exons lokalisiert sind, und solchen, welche in nichtkodierenden Regionen, also intronisch liegen. Auch letztere, beispielsweise in der Promotorregion gelegen, können jedoch regulierende Auswirkungen auf die Expression haben.<sup>58</sup>

Des Weiteren kann zwischen synonymen und nicht-synonymen SNPs unterschieden werden. Nur die nicht-synonymen Varianten innerhalb der kodierenden Regionen wirken sich auf die Aminosäuresequenz des Genprodukts aus. Die synonymen, oder auch „stillen“ Mutationen verändern die Primärstruktur des Proteins aufgrund der Degeneration des genetischen Codes nicht.<sup>59</sup> Trotzdem können sie Konsequenzen für den Phänotyp haben, wie aus Kapitel 6.4 ersichtlich.

Einzelne Gene oder Polymorphismen haben aber nur beschränkten Einfluss auf komplexe multifaktorielle Erkrankungen wie die CP. Es wird von einem polygenetischen Modell ausgegangen, in dem verschiedene Genvarianten gemeinsam das Erkrankungsrisiko beeinflussen. Außer SNPs können dabei auch Minisatelliten, (engl: Variable Number Tandem Repeats, VNTRs) und Kopienzahlvariationen (engl: Copy Number Variations, CNVs) von Bedeutung sein. Bei VNTRs handelt es sich um sehr kurze Basenpaarsequenzen, die sich oft nacheinander wiederholen und sich in der Anzahl der Wiederholungen unterscheiden können.<sup>60</sup> CNVs sind definiert als DNA-Segmente zwischen 1000 Basenpaaren und mehreren Megabasenpaaren, die ebenfalls in einer variablen Kopienanzahl im Vergleich zu einem Referenzgenom vorliegen.<sup>61</sup>

Um Näheres über die Zusammenhänge von Strukturvarianten zu erfahren, werden zusätzlich sogenannte Haplotypen – Kombinationen von Allelkonstellationen an einem oder mehreren Genorten, detektiert und analysiert.<sup>62</sup> Die Zusammensetzung und Frequenz solcher Haplotypen kann zwischen den verschiedenen ethnischen Gruppen differieren.<sup>57</sup>

Eine Möglichkeit, um ohne vorbestehende Hypothese krankheitsrelevante Polymorphismen zu identifizieren, sind die genomweiten Assoziationsstudien (GWAS oder auch

Indirekte Assoziationsstudien). Hierbei wird das gesamte Genom nach assoziierten Polymorphismen abgesucht und ebenso die Häufigkeiten innerhalb eines Patientenkollektivs mit denen einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Ein Problem der GWAS sind häufige falsch positive Assoziationen durch multiples Testen, die eine mangelnde Reproduzierbarkeit bedingen. Aktuell wird versucht, dieses Problem durch mathematisch-statistische Methoden zu beseitigen.<sup>63</sup> Ungelöst bleibt dabei jedoch die Problematik von Gen-Gen-Wechselwirkungen. Die bisher in GWAS entdeckten genetischen Varianten können nämlich nur für einen kleinen Teil der Erblichkeit komplexer Erkrankungen herangezogen werden. Man vermutet daher, dass Gen-Gen-Wechselwirkungen einen gewichtigen Anteil der Heredität ausmachen.<sup>64</sup> Weitere Schwierigkeiten liegen in der möglichen Stratifikation der Population durch Unterschiede in der Zusammensetzung von Patienten- und Kontrollgruppe hinsichtlich Allelhäufigkeit und Erkrankungsrisiko,<sup>65</sup> sowie dem Erreichen einer ausreichenden statistischen Power, die Populationen in einer Größenordnung von mindestens 10.000 Individuen<sup>66</sup> erforderlich macht.

Inzwischen wurden im Rahmen vieler Kandidatengenstudien (direkte Assoziationsstudien) vor allem immunologisch relevante Gene wie IL1, IL6, IL10, TNF $\alpha$ , CD14, TLR, Caspase recruitment domain 15, E Selectin, Fc $\gamma$ -Rezeptor und der Vitamin-D-Rezeptor auf assoziierte SNPs hin untersucht. Auch wenn sich einzelne Ergebnisse als signifikant erwiesen, waren die meisten nicht beweiskräftig oder ließen sich durch weitere Studien nicht bestätigen.<sup>92</sup> Ebenso ist eine Differenzierung der genetischen Determinanten zwischen der chronischen und der aggressiven Form bisher noch nicht zufriedenstellend gelungen.<sup>67</sup>

## 1.7 Funktion und Bedeutung des Interleukin 23 und seines Rezeptors

Das Zytokin Interleukin 23 ist ein Heterodimer, bestehend aus einer p40- und einer p19-Untereinheit. Die p40-Untereinheit ist identisch mit der p40-Untereinheit des IL12, zu dessen Familie das IL23 gehört.<sup>68</sup> Seine Aufgabe ist es, Pathogene zu differenzieren und die passende Antwort des adaptiven Immunsystems in Gang zu setzen. IL23-produzierende Zellen sind vorwiegend aktivierte dendritische Zellen (DCs) und Phagozyten. Diese erkennen durch ihre „*pattern recognition receptors*“ (PRR) mikrobielle Antigene und endogene Signale.<sup>69</sup> Um biologisch wirksam zu werden, muss das IL23 an einen membranständigen Rezeptorkomplex binden, der sich aus IL-12R $\beta$ 1, einem Bestandteil des IL12-Rezeptors und IL23R, einer IL23-spezifischen Untereinheit, die auf Chromosom 1p31 kodiert wird, zusammensetzt.<sup>70,71</sup>

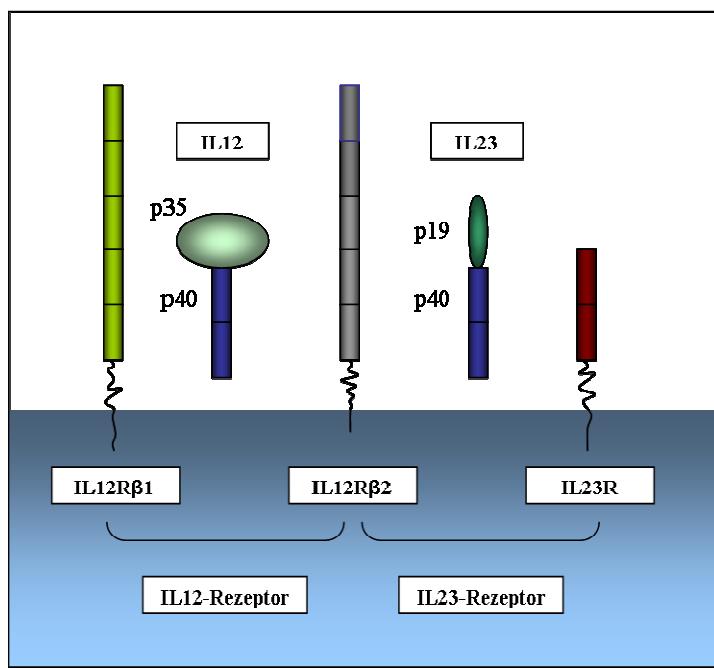


Abbildung 1: Aufbau der Interleukine 12 und 23 und ihrer Rezeptoren nach Kastelein et al.<sup>73</sup> Die p40-Untereinheit ist bei beiden Interleukinen gemeinsam, die Rezeptoren enthalten beide die IL12R $\beta$ 2-Untereinheit.

Trotz der strukturellen Gemeinsamkeiten induzieren IL12 und IL23 unterschiedliche Signalwege, was vor einigen Jahren zur Einführung einer neuen T-Helferzell-Subklasse führte. Lange Zeit wurde bei den Effektor-T-Zellen nur zwischen den Th1-Zellen, welche typischerweise IFN- $\gamma$  produzieren und die zelluläre Immunität aktivieren, und den Th2-Zellen, die die humorale Immunität induzieren und deren Spezialität die Produktion von IL4, IL5 und IL13 ist, unterschieden. Im Jahr 2005 wurden die Th17-Zellen als eigene

Klasse benannt, die auf Stimulation von IL23 das proinflammatorische IL17 produzieren.<sup>72,73</sup> Inzwischen wurden Th9 und Th22 als weitere Subpopulationen beschrieben.<sup>74, 75</sup>

Allerdings wird der IL23-Rezeptor nicht nur von Th17-Zellen exprimiert, sondern auch von NK-Zellen und NK-T-Zellen, seltener von Monozyten, Makrophagen und DCs.<sup>76</sup> Das Andocken des Liganden IL23 am Rezeptor initiiert intrazellulär einen JAK-STAT-Signalweg. (JAK = Januskinase; STAT = Signal Transducers and Activators of Transcription) Durch Phosphorylierung von STAT3 kommt es letztlich im Zellkern zur vermehrten Expression von Zytokinen wie IL17A, IL17F, IL6, IL23R TNF $\alpha$ , CCL6 und  $\alpha$ 3integrin.<sup>70,77</sup>

IL17 ist ein potentes proinflammatorisches Zytokin. Es wirkt auf Bindegewebs- und Epithelzellen und bestimmte Monozyten, in denen es die Produktion von Entzündungsmediatoren wie IL8, CXC-Ligand 1, TNF und GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor) induziert. Diese wiederum sind verantwortlich für die nun folgende schnelle Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zur Steuerung der akuten lokalen Infektion.<sup>77</sup>

Neben der positiven Rolle, die das IL17 in der akuten Entzündung spielt und die es dem Organismus ermöglicht, innerhalb von Stunden eine erste Immunantwort zu etablieren, scheint der IL23-IL17-Signalweg im Falle einer Dysregulation an der Pathogenese von autoimmunen und chronisch-entzündlichen Erkrankungen beteiligt zu sein. So zeigen Studien zur Multiplen Sklerose, rheumatoiden Arthritis, Psoriasis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in den jeweiligen Zielorganen einen erhöhten Spiegel an IL17.<sup>78,79,80,81</sup> Bei Morbus Crohn und Psoriasis wurden außerdem nach Gabe von Ustekinumab, einem Antikörper gegen IL12/IL23, therapeutische Effekte beobachtet. Allerdings ist noch nicht klar, ob die Effekte durch die Inhibition von IL12 oder IL23 ausgelöst wurden, da der in beiden Studien verwendete Antikörper spezifisch an die gemeinsame IL12-p40-Untereinheit bindet.<sup>82</sup>

## **2 Zielsetzung der Studie und allgemeine Vorgehensweise**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von funktionell wirksamen SNPs der IL23R-Region auf eine Assoziation mit der klinischen Manifestation der chronischen Parodontitis in einer Population kaukasischer Abstammung. Dabei wurde sowohl die Assoziation der Erkrankung zu einzelnen SNPs wie auch zu Haplotypen analysiert.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Auswahl der Studienpopulationen

##### 3.1.1 Münchener Studienpopulation

Die an chronischer Parodontitis (nach<sup>11</sup>) erkrankten Probanden waren Patienten der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Ludwig-Maximilians-Universität, während die Proben für die Kontrollgruppe vom Blutspendedienst München zur Verfügung gestellt wurden. Alle Studienteilnehmer sowie deren Eltern und Großeltern waren deutscher Herkunft.

Die Basisdaten der beiden Gruppen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 3: Basisdaten des Münchener Studienkollektivs**

	Patientenkollektiv	Kontrollkollektiv
Anzahl	402	792
Altersdurchschnitt $\pm$ Standardabweichung (Jahre)	$54,2 \pm 11,1$	$47,3 \pm 9,2$
Altersverteilung (Jahre)	18 – 84	35 – 68
Geschlechterverhältnis (weiblich/männlich)	52 / 48	33 / 67

Vor Aufnahme in die Studie unterschrieben alle Teilnehmer eine schriftliche Einverständniserklärung. Die Studie entsprach den ethischen Richtlinien der Helsinki-Deklaration und wurde durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität genehmigt (No.290/01).

Zur Studie wurden ausschließlich Personen zugelassen, bei denen keine systemischen Erkrankungen wie Diabetes, HIV-Infektion, Osteoporose und Blutungsübel vorlagen. Auch die regelmäßige Einnahme von Medikamenten, insbesondere Eisenpräparaten, Antiphlogistika, Antihistaminika und eine bestehende Schwangerschaft stellte eine Kontraindikation für die Teilnahme dar.

Die parodontologische Befunderhebung wurde folgendermaßen vorgenommen:

Die Taschensondbierungstiefe wurde an 6 Punkten je Zahn (mesiobukkal, zentrobukkal, distobukkal, distolingual, zentrolingual, mesiolingual /bzw. -palatal) entlang der

Zahnachse vom Gingivasaum zum Sulcusboden gemessen. Dies erfolgte mit einer Parodontalsonde PCP 10 (Hu-Friedy Europe, Leimen, Deutschland).

Eventuell provozierte Blutungen wurden notiert.

Zur Prüfung von Furkationsdefekten wurde mit einer Sonde nach Nabers Typ PQ2N (Hu-Friedy Europe, Leimen, Deutschland) horizontal vom Furkationseingang bis zur Basis des Defektes gemessen und dieser nach Nyman und Lindhe klassifiziert:

Grad I: horizontaler Attachmentverlust bis 3 mm

Grad II: horizontaler Attachmentverlust über 3 mm, nicht durchgängig

Grad III: Furkation durchgängig sondierbar

Der horizontale Knochenabbau wurde bei der Untersuchungsgruppe mittels eines Orthopantomogramms (OPT) bewertet. Dabei wurde der Abstand zwischen Schmelz-Zement-Grenze und dem Limbus alveolaris gemessen.

Sofern bei den Personen der Kontrollgruppe kein aktuelles OPT zur Verfügung stand, wurde aus Strahlenschutzgründen auf die Neuanfertigung verzichtet.

Die Studienteilnehmer wurden anschließend anhand der Kriterien aus Tabelle 4 der Untersuchungs- bzw. Kontrollgruppe zugeordnet.

**Tabelle 4: Kriterien zur Aufnahme in die Patienten-/Kontrollgruppe für die Münchner Studie**  
**TST: Taschensondierungstiefe; OPT: Orthopantomogramm, Klassifikation der Furkationsdefekte s.o..**

	Patientenkollektiv	Kontrollkollektiv
Anzahl der Zähne in situ	mindestens 15	mindestens 22
Taschensondierungstiefe/ Furkationsgrad	mindestens 5 Zähne TST $\geq 5$ mm und / oder Furkationsgrad Klasse II	höchstens 1 Messpunkt TST $\geq 3$ mm; kein Furkationsbefall
Zirkulärer Alveolarknochenverlust anhand OPT	$\geq 3$ mm an den betroffenen Zähnen	
Sonstiges		keine Gingivarezessionen keine parodontale Erkrankung in der Vergangenheit kein Zahnverlust aus Gründen pathogener Zahnbeweglichkeit

### 3.1.2 Kieler Studienpopulation

Zur Replikation der Ergebnisse wurde eine weitere Studienkohorte untersucht. Sie setzte sich aus Patienten mit chronischer Parodontitis und einer Kontrollgruppe aus ganz Deutschland zusammen, wobei die ethnische Zugehörigkeit anhand der Geburtsorte beider Eltern bestimmt wurde. Obwohl es sich hier um ein größeres Einzugsgebiet handelt, wird die Gruppe im Folgenden der Einfachheit halber als Kieler Studienpopulation bezeichnet. Die Studie wurde genehmigt durch die Ethikkommissionen aller teilnehmenden Institute (Kiel, Bonn und Dresden). Außerdem waren auch in dieser Studie vorherige Aufklärung und schriftliche Einverständniserklärung der Probanden Teilnahmevoraussetzung. Die Basisdaten können Tabelle 5 entnommen werden.

**Tabelle 5: Basisdaten des Kieler Studienkollektivs**

	Patientenkollektiv	Kontrollkollektiv
Anzahl	363	736
Altersdurchschnitt $\pm$ Standardabweichung (Jahre)	$62,0 \pm 9,1$	$49,9 \pm 15,7$
Altersverteilung (Jahre)	29 – 84	19 – 77
Geschlechterverhältnis (weiblich/männlich)	230 / 133	372 / 364

Die Diagnose der CP in der Patientengruppe wurde ebenfalls anhand der 1999 beim „International Classification Workshop“ festgelegten Kriterien gestellt. Zusätzlich wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Kriterien eingehalten:

**Tabelle 6: Kriterien zur Aufnahme in die Patienten-/Kontrollgruppe für die Kieler Studie**  
**TST: Taschensondierungstiefe; OPT: Orthopantomogramm; Klassifikation der Furkationsdefekte**  
**siehe Kapitel 3.1.1.**

	Patientenkollektiv	Kontrollkollektiv
Anzahl der Zähne in situ		mindestens 22
Taschensondierungstiefe/ Furkationsgrad	mindestens 3 Zähne $\geq 5$ mm	höchstens 1 Messpunkt TST $\geq 3$ mm; kein Furkationsbefall
Zirkulärer Alveolarknochenverlust anhand OPT	$> 30\%$ an mindestens 3 Zähnen	
Sonstiges	Mindestalter bei Erstdiagnose: 40 Jahre	

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Blutabnahme und Isolierung der DNA

Die Abnahme des Blutes erfolgte durch Venenpunktion in der Armbeuge. Es wurden jeweils 9 ml entnommen. Die dazu verwendeten sterilen Röhrchen (Monovette®, Sarstedt, Nümbrecht) enthielten 1,6 mg Kalium-EDTA-Lösung pro ml Blut. Zur Isolierung der DNA aus den Leukozyten wurden zwei verschiedene Methoden angewandt: einerseits ein kommerzieller Kit (QIAamp®DNA Blood Mini Kits, Qiagen) und andererseits die Aussalzmethode nach Miller.<sup>83</sup>

### 3.2.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Bei diesem Wert weisen die Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum auf.

Die Konzentration lässt sich mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmen:

$$c = E_{260} \times f / (\epsilon \times d)$$

c = Konzentration (ng/μl)

E<sub>260</sub> = gemessener Extinktionswert bei 260 nm

f = Verdünnungsfaktor

d = Schichtdicke (1 cm)

ε = Extinktionskoeffizient

dsDNA = 50<sup>-1</sup> μl/ng

RNA = 40<sup>-1</sup> μl/ng

Oligonukleotide = 30<sup>-1</sup> μl/ng

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte bei Verdünnungen von 1:20 bis 1:200, um Extinktionsmesswerte zwischen 0,1 und 1 zu erhalten. Nur in diesem Bereich kann von einem linearen Zusammenhang zwischen Extinktion und Konzentration ausgegangen werden. Anschließend wurde die DNA-Konzentration für die PCR mittels TE-Puffer-Verdünnung auf 100 ng/μl eingestellt.

### 3.2.3 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur selektiven, exponentiellen Amplifikation von Abschnitten genomischer DNA durch wiederholte Synthese entsprechender Sequenzen. Als Ausgangsmaterial werden aufgrund der hohen Sensitivität der PCR nur wenige Kopien der Zielsequenz benötigt. Die PCR weist außerdem eine hohe Spezifität auf. So ist es möglich, eine genau definierte Sequenz zu amplifizieren. Dies geschieht mittels Oligonukleotiden in einer Länge von ca. 18 – 35 Basen, die komplementär zu den Einzelsträngen des zu vervielfältigenden Abschnittes aufgebaut sind und die mit ihrem 3'-Ende auf jeweils einer Seite den Startpunkt der Replikation markieren. Um die Anlagerung der Primer zu ermöglichen, muss allerdings eine Denaturierung des Doppelstranges durch Temperaturerhöhung vorausgehen. Eine hitzestabile Polymerase kann anschließend den Abschnitt zwischen den Primern herstellen.

Dieser Zyklus von Denaturierung, Primeranlagerung („Primer-Annealing“) und Extension wird wiederholt, bis die Anzahl der Zielsequenzen ausreichend für den Nachweis ist.

### 3.2.4 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Wird ein Fluoreszenzfarbstoff (Donor-Fluorophor) mit Licht angeregt, kann er seine Energie auf einen anderen Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor-Fluorophor) übertragen, vorausgesetzt die beiden befinden sich in unmittelbarer Nähe zueinander (Distanz < 5nm). Das vom Akzeptor emittierte Licht hat eine längere Wellenlänge als das des Donors und kann daher separat gemessen werden.

Dieses Prinzip wurde zur Bestimmung des Genotyps genutzt: Eine mit Fluoreszenzfarbstoff am 3'-Ende markierte Sensor-Sonde, welche exakt zu einem Allel der SNPs passt, wird vor der PCR dem Mastermix zugegeben. Ebenso werden Ankersonden, die am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen sind und an eine direkt benachbarte Sequenz des DNA-Stranges binden, hinzugefügt. Bei der Amplifikation erfolgt der Einbau dieser Sonden in die neusynthetisierten Stränge, so dass die zwei Fluoreszenzmoleküle sehr nah beieinander (1 – 5 Nukleotide) zu liegen kommen. Das Donor-Fluoreszenzmolekül am 3'-Ende der Sonde wird nun in seiner spezifischen Anregungswellenlänge (533nm) angeregt und gibt die Energie an das Akzeptor-Fluoreszenzmolekül am 5'-Ende des Ankers ab. Dieses spezifische abgestrahlte Fluores-

zenzsignal wird wiederum detektiert. Seine Stärke ist abhängig von der Menge an neusynthetisierten Strängen. Aufgrund jeweils einer Fehlpaarung in denjenigen Molekülen, die das nicht zur Sonde passende Allel enthalten (vorzugsweise das Minor-Allel), schmelzen, d.h. dissoziieren diese bei allmählicher Temperaturerhöhung früher und hören auf zu fluoreszieren. Durch graphische Darstellung der Fluoreszenz-Änderungsrate kann man so die zwei Allele in den Schmelzkurven unterscheiden und den Genotypen zuordnen. Homozygote Merkmalsträger weisen nur einen Peak auf – entweder bei einer höheren oder bei einer niedrigeren Temperatur, während bei den heterozygoten Merkmalsträgern zwei Peaks bei beiden Temperaturen entstehen.

### 3.2.5 Agarosegelektrophorese

Die Agarosegelektrophorese ist eine Methode, die entweder zur Aufschlüsselung der unterschiedlichen Länge von Restriktionsfragmenten oder – wie in diesem Fall – zur Kontrolle einer erfolgreichen Amplifikation vor der Sequenzierung verwendet werden kann. Voraussetzung dafür ist die Eigenschaft geladener Moleküle, sich in einem elektrischen Feld entsprechend ihres Molekulargewichtes und ihrer Sekundärstruktur schneller oder langsamer fortzubewegen. Da die Nukleinsäurefragmente negativ geladen sind, wandern sie innerhalb des Agarosegels, welches in eine Pufferlösung eingelegt ist, in Richtung Anode des angelegten Spannungsfeldes. Die kleineren Fragmente, welche schneller und mit weniger Widerstand durch die Poren laufen, legen eine längere Strecke zurück als die größeren. Anhand der sich bildenden Banden und dem Vergleich zu einem Molekulargewichtsstandard, kann die Größe der Fragmente bestimmt und die Konzentration in etwa abgeschätzt werden. Durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid, der bei Anregung durch UV-Licht fluoresziert, werden die Banden visualisiert.

## 3.3 Durchführung

### 3.3.1 Etablierung der Primer und Sonden

Die Etablierung der Primer und Sonden für die Genotypisierung der SNPs rs1004819, rs7517847, rs10489629, rs2201841, rs11465804, rs11209026, rs1343151, rs10889677, rs11209032 und rs1495965 war schon in einer vorhergehenden Studie erfolgt.<sup>85</sup> Auf gleiche Weise wurden in dieser Studie die Oligonukleotide für rs1884444 und rs7530511 ausgetestet. Eine Liste der dazu verwendeten Geräte findet sich in Kapitel 12.1.

Die verwendeten Primer und Sonden waren maximal 30 Basen lang und wurden anhand der vom *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)<sup>84</sup> veröffentlichten Sequenzdaten synthetisiert. Die Sensorsonden – in der Regel spezifisch für den Wildtyp – schlossen die polymorphe Position in etwa mittig ein, während die Ankersonden in 3'-Richtung nach einer Lücke von 1-5 Basen positioniert wurden. In manchen Fällen wurden abweichende Basen eingebaut, um Schleifenbildungen oder G-C-reiche Sequenzen zu vermeiden, welche die Analyse beeinträchtigen.<sup>85</sup> Alle Oligonukleotide wurden von der Firma *TIB MOLBIOL* (Berlin, Deutschland) hergestellt und im gefriergetrockneten Zustand geliefert. Ihre Sequenzen sind Tabelle 7 und Tabelle 8 zu entnehmen.

**Tabelle 7: Primersequenzen und Annealing-Temperaturen**

**Die unterstrichenen Basen innerhalb der Primer-Sequenzen unterscheiden sich von der Originalsequenz. Sie wurden eingesetzt, um Schleifenbildung im PCR-Produkt zu vermeiden.**

Polymorphismus	Primersequenzen	Annealing-Temperaturen
rs1884444 = p.Gln3His	GGT <u>CCC</u> CATCAA <u>AT</u> ACAATAATTCT ACC <u>ATAC</u> CCATGACACCA	56°C
rs1004819	TTCTAGGACC <u>CTTT</u> GGC TTTG <u>CAAA</u> ATATGA <u>ACT</u> CATTCAA	58°C
rs7517847	CTGCCA <u>ATT</u> CCCTAAACA GACAG <u>CCC</u> CATAAAGATACAAACA	59°C
rs7530511 = p.Leu310Pro	GGAG <u>CCA</u> ACATTAAGTACGTATT CCT <u>GCT</u> TCAGGTG <u>CTT</u> TATGA	57°C
rs10489629	AGGTGT <u>CATT</u> ACCCACCAGCA CTGC <u>CTA</u> GC <u>AG</u> ATTATGCAA	58°C
rs2201841	AGGA <u>AT</u> G <u>TAGG</u> CAGCCT <u>CT</u> AG GTG <u>CT</u> GGG <u>CTT</u> ACAGGCAG	59°C
rs11465804	CACAT <u>GG</u> A <u>ATT</u> CT <u>GGG</u> CTA AAGG <u>CAT</u> AT <u>CTT</u> ATTGT <u>CC</u> CAGAAA	57°C
rs11209026 = p.Arg381Gln	CTT <u>CC</u> TTTCATTAGACAA <u>AC</u> AGAGG AACT <u>GAA</u> AT <u>GACT</u> AA <u>ATT</u> TTGGTGA	56°C
rs1343151	CGAA <u>AG</u> AA <u>AG</u> ATT <u>AT</u> TCAT <u>GA</u> AGC AGTGT <u>GT</u> CC <u>AG</u> TT <u>GCT</u> CAC	57°C
rs10889677	TCC <u>CAT</u> GC <u>CT</u> TTTA <u>AT</u> TT <u>AGC</u> GA <u>CT</u> CT <u>AT</u> AAAA <u>AT</u> AC <u>AT</u> GT <u>AGGG</u> CGTC	59°C
rs11209032	GGT <u>GT</u> TT <u>GT</u> TT <u>AT</u> CT <u>GT</u> AC <u>GC</u> CA <u>AT</u> CC <u>GG</u> GT <u>GG</u> TT <u>CT</u> TC <u>CAC</u> AG	59°C
rs1495965	CAGGA <u>ATAA</u> AT <u>GT</u> GA <u>AT</u> GAGAACAGAC CA <u>AT</u> AT <u>TT</u> AT <u>AT</u> CT <u>CC</u> AT <u>GG</u> GTC	58°C

**Tabelle 8: FRET-Sondensequenzen**

Fl: Fluorescein; LC610: LightCycler-Red 610; LC640: LightCycler-Red 640; LC670: LightCycler-Red 670. Die polymorphe Position in der Sequenz der jeweiligen Sonde ist unterstrichen. Die 3'-Enden der Anker sind zur Vorbeugung einer Verlängerung durch DNA-Polymerase während der PCR phosphatiert

Polymorphismus	FRET-Sondensequenzen
rs1884444 = p.Gln3His	GCATCCCATTGAATAGTGAC <u>CT</u> GATT-FL LC640-TGTCTGGAAGCAGGAAAAGACTGTTCCCT
rs1004819	AGATAGCAC <u>AG</u> TAAGAAC <u>AT</u> CACAGC-FL LC610-AAGCAGGT <u>CAG</u> TGCAATCCAGATT
rs7517847	AAGGC <u>CT</u> CAGCTACACCTGTAT-FL LC670-GCTAGAA <u>ACT</u> GGAGCCCTCCCAACTC
rs7530511 = p.Leu310Pro	LC640-TGGAG <u>TT</u> CACC <u>GG</u> TTTTCA AGGCAAAAGGTACTGGCAGCC-FL
rs10489629	GTCAGCCAC <u>ATT</u> GGTAGTG-FL LC640-TTAGCGCTACTTACAAAAGCGGAAAC
rs2201841	TATAGAAGATGATGAC <u>CT</u> CAAGAAA-FL LC640-GCATAATCATAGGCCAGGCATGGTG
rs11465804	GTAGT <u>CTT</u> TAG <u>T</u> AATTGCC-FL LC610-ACCCATCATA <u>CT</u> GAAAAAAATCACATCAGG
rs11209026 = p.Arg381Gln	ACAGATCATT <u>CC</u> <u>A</u> ACTGGGT-FL LC640-GTTTTGCAGAA <u>TT</u> CTGTTTCTGATT
rs1343151	TTGAATGTT <u>CTT</u> GCC <u>AA</u> ATTG-FL LC670-CACTGAG <u>TT</u> CTCCTTCTGCCATCA
rs10889677	TTCTGCCT <u>C</u> ATT <u>CT</u> AAAATTAGA-FL LC610-TAAGGT <u>CCC</u> GAAGGTGGAACATGC
rs11209032	CTTG <u>CA</u> AT <u>GG</u> CAGATGGAAG-FL LC640-TGG <u>CA</u> AA <u>AT</u> G <u>CA</u> ATT <u>CAG</u> CTGAAG
rs1495965	GAAAATGTT <u>CT</u> CT <u>CC</u> CACAG-FL LC670-GGATTA <u>AC</u> ATT <u>G</u> CT <u>CT</u> GGCAGC

Die Ergebnisse der *Light-Cycler*<sup>®</sup>-Schmelzkurvenanalyse der neu etablierten Tests wurden mittels Sequenzierung von Stichproben aller drei Genotypen durch ein kommerzielles Unternehmen überprüft.

Dazu wurden die entsprechenden Proben konventionell mittels PCR im Thermocycler amplifiziert und die entstandenen Oligonukleotide gereinigt. Der Erfolg der PCR wurde vor dem Einsenden durch Gelelektrophorese kontrolliert.

Die PCR im Thermocycler wurde mit dem in Tabelle 9 beschriebenen Reaktionsansatz und unter den in Tabelle 10 angegebenen Bedingungen durchgeführt.

**Tabelle 9: Ansatz für die PCR im Thermocycler**

Komponente	Endkonzentration
PCR-Puffer	1 x
dNTP	0,2 mM
HotStarTaq DNA-Polymerase	0,025 U/ml
Primer forward/reverse	jeweils 0,25 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 – 5 mM
DNA	5 ng/ml

**Tabelle 10: Verwendetes PCR-Programm im Thermocycler**

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer (hh:mm:ss)
Initiale Denaturierung	1	95°C	00:05:00
Denaturierung	35	94°C	00:00:30
Primer-Annealing		55°C	00:00:30
Extension		72°C	00:00:30
Abschlussextension	1	72°C	00:10:00

Anschließend wurden die PCR-Produkte mit Hilfe eines kommerziellen Kits (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) gereinigt, um sie von überschüssigen Primern, Primerdimeren und anderen Reagenzien zu befreien.

Für die Reinigung wurden die Proben in einem 1,5-ml-Röhrchen mit jeweils 500 µl PB-Puffer versetzt, so dass sich ein DNA-Sample zu Puffer-Verhältnis von 1:5 ergab. Die sorgfältig gemischten Lösungen wurden auf die QIAquick-Säule aufgetragen. Während der darauffolgenden Zentrifugation fand die Bindung der DNA an die Säulenmatrix statt. Der Durchfluss wurde entfernt. Nach einem einminütigen Trockenzentrifugieren wurde die QIAquick-Säule in ein steriles 1,5-ml-Tube überführt. Zum Eluieren der DNA wurden 50 µl EB-Puffer auf die Mitte der Membran aufpipettiert und das ganze Tube nochmals für eine Minute zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend verworfen.

Die Elektrophorese zur Überprüfung der PCR erfolgte unter Verwendung einer einprozentigen Agarosegelkonzentration. 1 g Agarose wurde in 100 ml 1 × TBE-Puffer in einem Mikrowellenofen so lange gekocht, bis sie vollständig gelöst vorlag. Unter diese Lösung wurden 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Sigma) gemischt. Anschließend wurde ein Gelträger mit der Lösung befüllt und ein Gelkamm mit 10 Zähnen eingesetzt. Sobald das Gel erstarrt war, wurde der Kamm vorsichtig entfernt, die Gelkammer mit Laufpuffer (1 × TBE-Puffer) befüllt und der Gelträger hineingestellt. Die PCR-Produkte, die ein

Volumen von 5 µl hatten, wurden mit jeweils 4 µl Auftragspuffer gemischt und in die Taschen pipettiert. Außerdem wurde in einer am Rand gelegenen Spur ein Größenstandard in Form einer 100 bp-Leiter und einer 1 – 10 kbp-Leiter aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei 120 Volt für 25 min. Schließlich wurde das Gel in den UV-Transilluminator gelegt und dort betrachtet und photographiert.

In Tabelle 11 sind die Zusammensetzungen und Hersteller der verwendeten Materialien angegeben:

**Tabelle 11: Materialien für die Agarosegelektrophorese**

**LE: Low Electroendosmosis; Tris: Trisaminomethan; EDTA: Ethyldiamintetraessigsäure**

Produkt	Zusammensetzung	Hersteller
Agarose, LE		Biozym, Oldendorf
TBE-Puffer 10x	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA	Apotheke Innenstadt Universität München
DNA-Auftragspuffer	10 mM Tris/HCl pH 8 2 mM EDTA 20 % Ficoll 400 0,25 % Orange G	Apotheke Innenstadt Universität München
DNA-Molekülgrößenstandard		Cambrex, Charles City, IA, USA
Ethidiumbromid		Sigma, Steinheim
Polaroidfilm Typ 667		Polaroid, Minnetonka, MN, USA

Anschließend wurden die Stichproben aller möglichen Genotypen von der Firma Sequiserve (Vaterstetten, Deutschland) sequenziert.

### 3.3.2 Durchführung der Genotypisierung mit dem LightCycler®

Die Genotypisierung der DNA-Proben der Studiengruppen wurde mit dem *LightCycler®* durchgeführt, der sowohl die PCR, als auch die Schmelzkurvenanalyse erledigt. Ein PCR-Ansatz war wie in Tabelle 12 beschrieben zusammengesetzt:

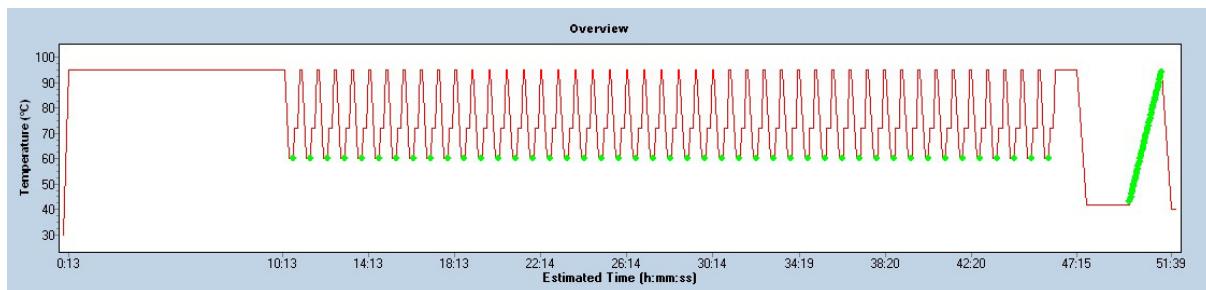
**Tabelle 12: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für die Analyse im LightCycler**  
**Die Konzentrationen der Primer variieren bei asymmetrischen PCR-Ansätzen: Angaben für rs10489629 in Klammern**

Komponente	Konzentration	Zielvolumen 5 µl
H <sub>2</sub> O, PCR-grade		2,8 µl (3,0 µl)
Primer Forward Primer Reverse	0,5 µmolar*	je 0,3 µl (0,3 µl F, 0,1 µl R)
Sonde 1 (Anchor, LC-Red) Sonde 2 (Sensor, Flourescin)	0,5 µmolar	je 0,3 µl
LightCycler® 480 Genotyping Master		1,0 µl
DNA	5 ng/µl	0,5 µl

Die Wellenlängen und Sequenzen der einzelnen Sonden und Anker sind Tabelle 7 und Tabelle 8 zu entnehmen.

Dabei wurden zunächst die beiden Primer sowie die Sonden- und Ankerlösung ins Wasser gegeben und auf dem Vortex-Schüttler kurz vermischt. Danach wurde der *Genotyping Master Mix* vorsichtig zugefügt und durch Auf- und Abpipettieren in der Lösung verteilt. Je 384 mal 5 µl dieses PCR-Ansatzes wurden vom Pipettierroboter Freedom EVO® Clinical (Tecan, Männedorf, Schweiz) auf Trägerplatten für 384 Proben (LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) aufgetragen. Ebenso wurden je 0,5 µl DNA der einzelnen Proben mit dem Pipettierroboter auf die LightCycler-Platte übertragen, wobei jede Platte eine Negativprobe in Form von Wasser statt DNA enthielt, um eventuelle Kontaminationen zu detektieren. Sowohl die LightCycler-Platte als auch die Probenplatten wurden bei diesem Vorgang auf 4°C gekühlt und anschließend mit Folie versiegelt. Die PCR und Analyse der Proben erfolgte direkt anschließend im LightCycler® 480.

Der Ablauf eines Laufes mit dem LightCycler ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2: Temperaturverlauf eines PCR-Vorganges mit anschließender Schmelzkurve**

Die genauen Temperaturen und Zeitangaben sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Dabei wurde die für den jeweiligen Primer spezifische optimale Anlagerungstemperatur beachtet.

**Tabelle 13: Temperatur- und Zeitangaben eines Light-Cycler-Laufes**

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer (hh:mm:ss)
Präinkubation	1	95°C	00:10:00
Denaturierung	45	95°C	00:00:05
Primer-Annealing		56 – 59°C	00:00:10
Extension		72°C	00:00:10
Schmelzkurve	1	95°C	00:01:00
		42°C	00:02:00
		95°C	kontinuierlich
Abkühlung	1	40°C	00:00:15

Fluoreszenzmessungen fanden jeweils punktuell in jedem Amplifikationszyklus sowie kontinuierlich während der Schmelzkurvenanalyse statt (in Abbildung 2 grün markiert).

Die Darstellung und Analyse der Schmelzkurven erfolgte mit der LightCycler®-Software (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Da die Schmelzkurven für jedes Allel charakteristische Höhepunkte in der 1. Ableitung aufweisen, kann auf diese Weise in homozygote und heterozygote Träger der Mutation unterschieden werden. Das Programm teilt die Proben selbstständig in Gruppen ein, welche der Anwender den entsprechenden Genotypen zuteilt. In einzelnen Fällen war eine Korrektur der Gruppeneinteilung durch den Anwender nötig. Nicht eindeutige Probenergebnisse wurden wiederholt und bei gleichbleibendem Ergebnis aus der Studie ausgeschlossen. Auch hier sei bezüglich genauer Angaben zu verwendeten Geräten auf das Kapitel 12 verwiesen.

## 4 Statistische Auswertung

Um eine eventuell vorliegende Populationsstratifikation aufzudecken, wurden die vorliegenden Häufigkeiten den bei Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts zu erwartenden Frequenzen gegenübergestellt.

Der Vergleich zwischen kategorischen Variablen von Patienten- und Kontrollgruppen wurde mithilfe des  $\chi^2$ -Tests, oder – bei Fallzahlen unter fünf – mittels des Fisher's-Exact-Tests vorgenommen.

Quotenverhältnisse wurden für die Minor-Allele der SNPs mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet.

Für multiple Tests wurden die p-Werte nach Bonferroni korrigiert.

### 4.1 Hardy-Weinberg-Equilibrium

Die zu erwartenden Frequenzen wurden folgendermaßen berechnet:

$$F_{AA} = f_A^2$$

$$F_{AB} = 2 \times f_A \times f_B$$

$$F_{BB} = f_B^2$$

Dabei stellt  $F_{AA}$  die erwartete Frequenz des Genotyps AA dar,  $F_{AB}$  und  $F_{BB}$  entsprechend die der erwarteten Frequenzen für die Genotypen AB und BB, während die mit f bezeichneten Frequenzen für die tatsächlich beobachteten Häufigkeiten stehen.

Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit folgender Formel:

$$\chi^2 = \frac{(beobachteteFrequenz - erwarteteFrequenz)^2}{(beobachteteFrequenz)}$$

$\chi^2$ -Werte < 6,64 (entsprechen p-Werten < 0,05) wurden als signifikant angesehen.

## 4.2 Chi-Quadrat-Test

Dem Chi-Quadrat-Test liegt folgende Tabelle zugrunde:

	erkrankt	nicht erkrankt	Summe
Merkmal x	a	c	a + c
Merkmal y	b	d	b + d
Summe	a + b	c + d	a + b + c + d (= N)

Die Berechnungsformel für die Signifikanz lautet:

$$\chi^2 = N \times \frac{(a \times d - b \times c - \frac{N}{2})^2}{(a + b)}$$

Die Signifikanz war wie oben beschrieben definiert.

## 4.3 Quotenverhältnis

Die Odds ratios (OR) zum Vergleich zweier Quoten wurden für die Minor-Allele aller SNPs berechnet. Mit ihnen lässt sich eine Aussage über die Stärke eines Zusammenhangs einer Mutation zur Erkrankung treffen.

Bei OR-Werten  $> 1$  besteht eine Prädisposition für die Erkrankung, während Werte  $< 1$  eine protektive Variante kennzeichnen. Ist die OR genau 1, so ist das Risiko für die Erkrankung für beide Allele gleich groß.

Das in dieser Studie gewählte Konfidenzintervall von 95% gibt denjenigen Bereich an, in dem man mit einer 95%igen Wahrscheinlichkeit von einer Korrektheit der Aussage ausgehen kann.

## 4.4 Bonferroni-Korrektur für multiples Testen

Um eine Alphafehler-Kumulierung zu vermeiden, wurden signifikante p-Werte der Haplotypberechnung nach Bonferroni korrigiert. Dazu wurde das Signifikanzniveau eines Einzeltests als Anteil der globalen Signifikanz pro Test festgelegt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Alle untersuchten Varianten der DNA-Sequenz in dieser Studie sind Einzelnukleotidpolymorphismen, für die in der Literatur jeweils zwei Allele beschrieben wurden. Mittels Polymerasenkettenreaktion und einer anschließenden Detektion der SNPs durch fluoreszenzmarkierte Sonden im LightCycler® Instrument konnte anhand einer Schmelzkurvenanalyse jeder Probe ein eindeutiger Genotyp zugeordnet werden.

Die dazu etablierten Tests wurden jeweils mittels Sequenzierung einzelner Stichproben überprüft. Es erfolgte außerdem ein Vergleich mit den bei Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts erwarteten Frequenzen.

Anschließend wurden die Häufigkeiten von Allelen und Genotypen der Patientengruppen aus Kiel und München jeweils mit einer Kontrollpopulation verglichen und die Ergebnisse der Kontrollgruppen durch Gegenüberstellung mit Daten einer Normalpopulation auf Glaubwürdigkeit überprüft.

Eventuelle Korrelationen zwischen den einzelnen SNPs wurden durch Haplotypberechnung detektiert.

### 5.2 Bestimmung der Genotypen

Um die Genotypen der einzelnen Proben eindeutig zu bestimmen, wurde für jeden SNP ein Set von sequenzspezifischen Primern und fluoreszenzmarkierten Hybridisierungssonden entwickelt. Dadurch ergaben sich bei der Analyse der Schmelzkurven charakteristische Bilder mit einem niedrigen oder einem hohen Schmelzpunkt bei den homozygoten Proben, oder mit zwei Peaks im Falle der heterozygoten Genotypen.

Auf jeder Platte des LightCycler® Instruments, mit dem sowohl die PCR, als auch die Detektierung der Fluoreszenzsignale erfolgte, wurde eine Negativkontrolle aufgetragen, um sicherzugehen, dass keine Kontaminationen vorhanden waren.

Im Folgenden sind exemplarisch die Varianten der Schmelzkurven der 12 SNPs zusammen mit den Negativkontrollen dargestellt.

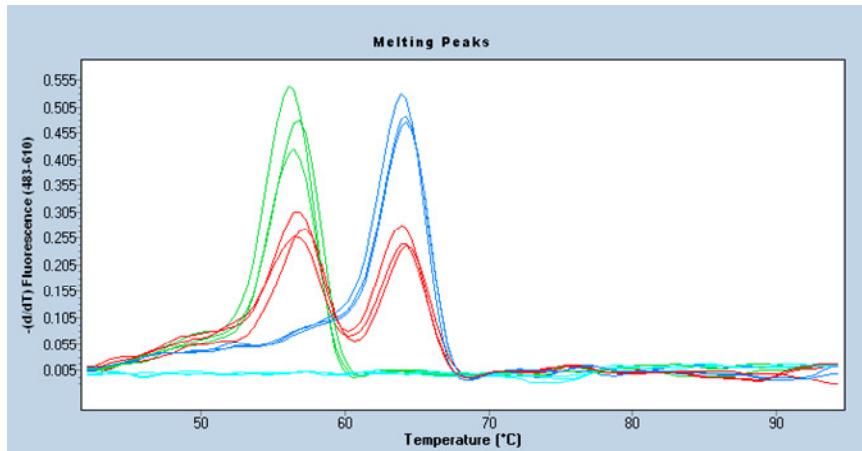


Abbildung 3: Schmelzkurven des rs1004819; Grün: [TT] homozygot für die Mutation; Blau: [CC] homozygot für den Wildtyp; Rot: [CT] heterozygot; Türkis: Negativprobe

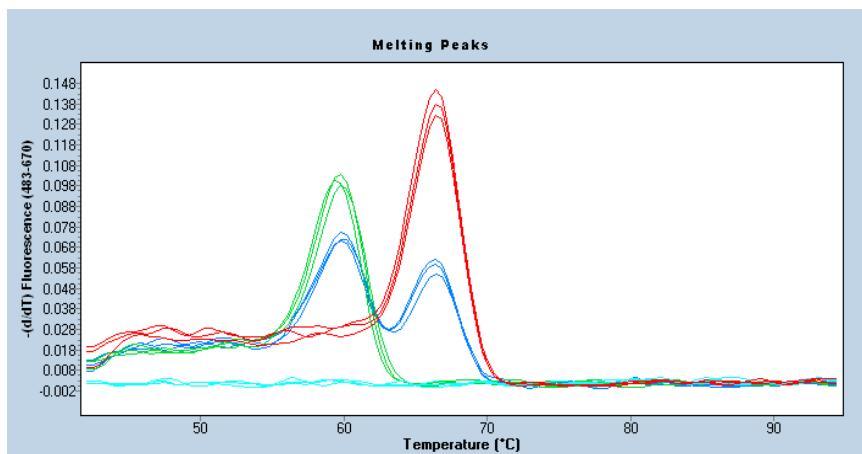


Abbildung 4: Schmelzkurven des rs7517847;  
Grün: [GG] homozygot für die Mutation; Rot: [TT] homozygot für den Wildtyp; Blau: [TG] heterozygot; Türkis: Negativprobe

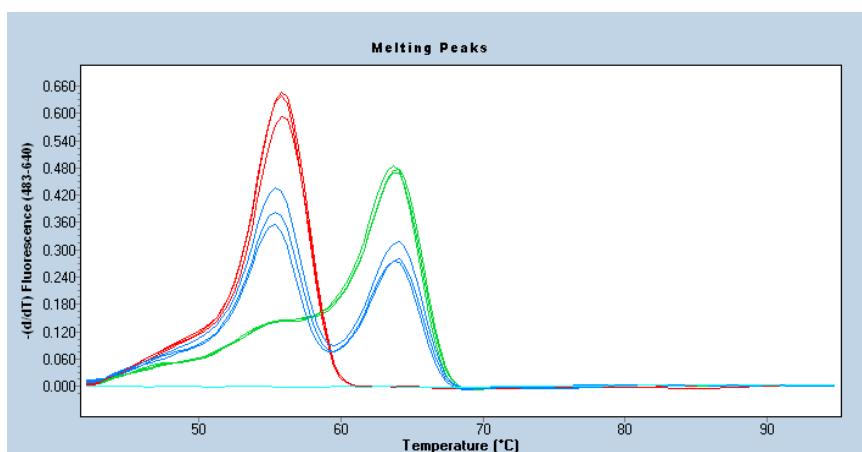


Abbildung 5: Schmelzkurven des rs10489629; Rot: [AA] homozygot für den Wildtyp; Grün: [GG] homozygot für die Mutation; Blau: [AG] heterozygot; Türkis: Negativprobe

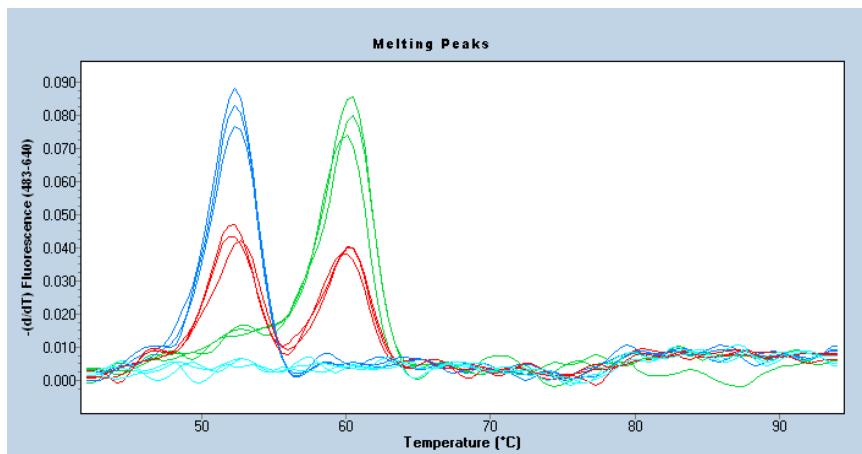


Abbildung 6: Schmelzkurven des rs2201841; Blau: [TT] homozygot für den Wildtyp; Grün: [CC] homozygot für die Mutation; Rot: [TC] heterozygot; Türkis: Negativprobe

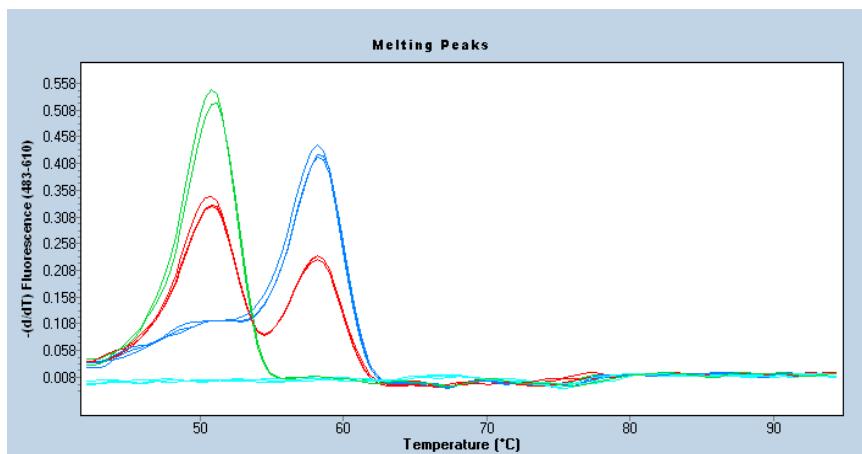


Abbildung 7: Schmelzkurven des rs11465804; Grün: [GG] homozygot für die Mutation; Blau: [TT] homozygot für den Wildtyp; Rot: [TG] heterozygot; Türkis: Negativprobe

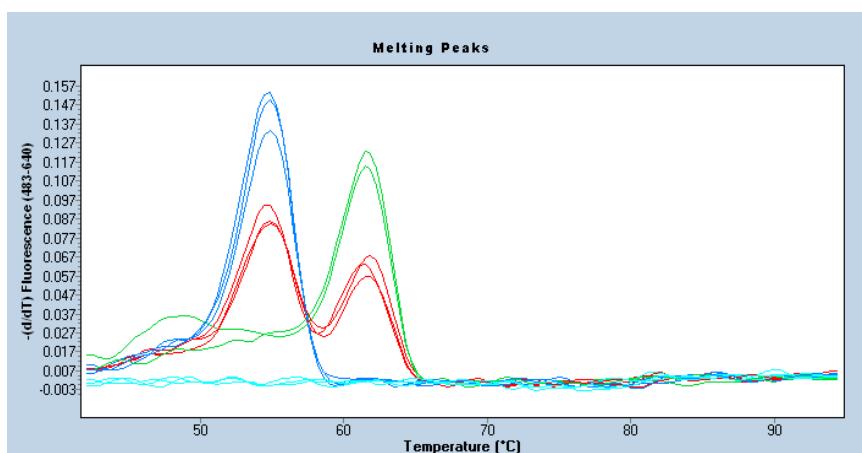


Abbildung 8: Schmelzkurven des rs11209026; Blau: [GG] homozygot für den Wildtyp; Grün: [AA] homozygot für die Mutation; Rot: [GA] heterozygot; Türkis: Negativprobe

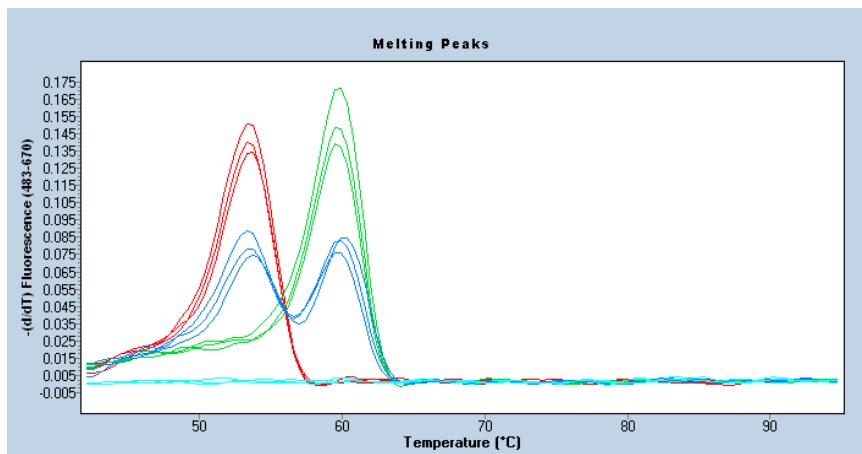


Abbildung 9: Schmelzkurven des rs1343151; Rot: [CC] homozygot für die Mutation; Grün: [TT] homozygot für den Wildtyp; Rot: [CT] heterozygot; Türkis: Negativprobe

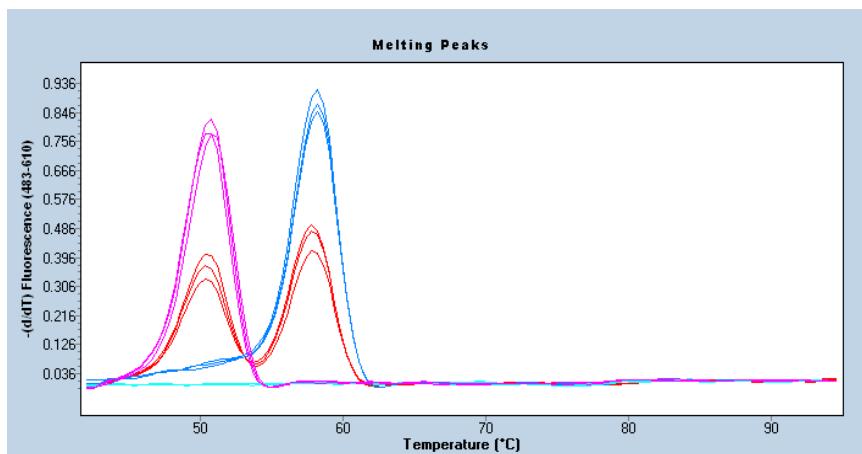


Abbildung 10: Schmelzkurven des rs10889677; Pink: [AA] homozygot für die Mutation; Blau: [CC] homozygot für den Wildtyp; Rot: [CA] heterozygot; Türkis: Negativprobe

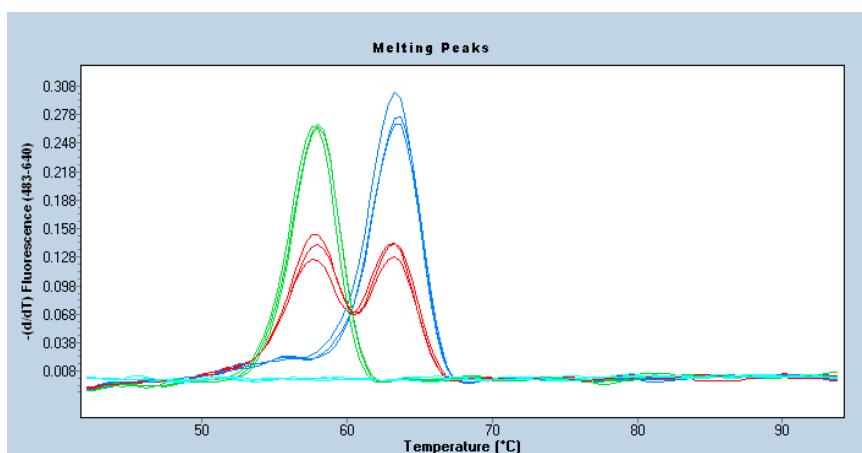


Abbildung 11: Schmelzkurven des rs11209032; Grün: [AA] homozygot für die Mutation; Blau: [GG] homozygot für den Wildtyp; Rot: [GA] heterozygot; Türkis: Negativprobe

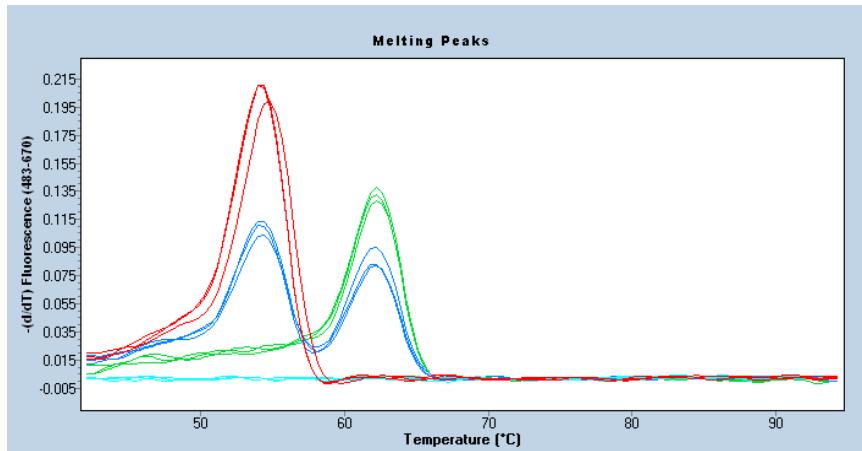


Abbildung 12: Schmelzkurven des rs1495965; Rot: [AA] homozygot für den Wildtyp; Grün: [GG] homozygot für die Mutation; Blau: [AG] heterozygot; Türkis: Negativprobe

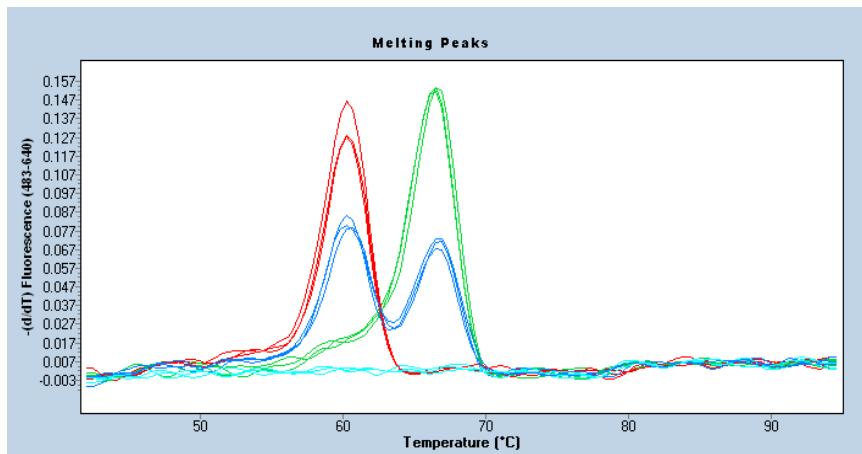


Abbildung 13: Schmelzkurven des rs1884444; Rot: [TT] homozygot für den Wildtyp; Grün: [GG] homozygot für die Mutation; Blau: [TG] heterozygot; Türkis: Negativprobe

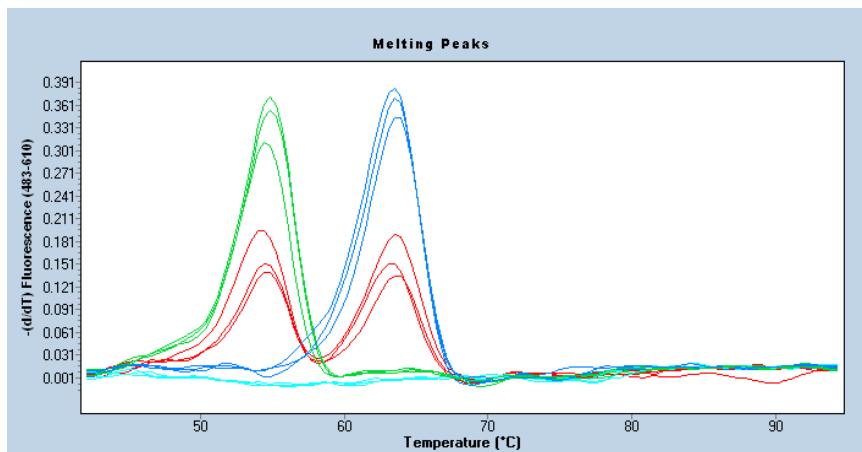


Abbildung 14: Schmelzkurven des rs7530511; Grün: [TT] homozygot für den Wildtyp; Blau: [CC] homozygot für die Mutation; Rot: [CT] heterozygot; Türkis: Negativprobe

### 5.3 Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Equilibrium

Die Genotypverteilungen für alle getesteten SNPs waren für die Münchener Population im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Der Wert für rs7530511 war in der Kieler Kontrollgruppe grenzwertig.

Die Signifikanzen der Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht sind der Tabelle 14 zu entnehmen.

**Tabelle 14: p-Werte der Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht**

SNP	Kontrollgruppe München	Kontrollgruppe Kiel
rs1004819	0,45	0,34
rs7517847	0,94	0,2
rs10489629	0,72	0,55
rs2201841	0,65	0,18
rs11465804	0,57	0,46
rs11209026 =p.Arg381Gln	0,42	0,33
rs1343151	0,34	0,56
rs10889677	0,65	0,054
rs11209032	0,54	0,063
rs1495965	0,61	0,23
rs1884444 =p.Gln3His	nicht getestet	0,21
rs7530511 =p.Pro310Leu	nicht getestet	0,049

## 5.4 Verteilung der Allele und Genotypen

In den nun folgenden Kapiteln sind die Minorallel- sowie die Genotypfrequenzen und deren Signifikanzen für alle untersuchten SNPs zusammengefasst. Um den Effekt der Populationsstratifizierung zu minimieren, sind zusätzlich zur Auswertung der Originaldaten die nach Alter, Geschlecht und Rauchverhalten angepassten p-Werte angegeben.

Zur Auswahl zwischen den möglichen Rechenmodellen, werden in der Statistik Informationskriterien verwendet. Sie geben die Wahrscheinlichkeit für das Zutreffen eines Modells an. In dieser Studie wurden der kodominante, der dominante, der rezessive, der überdominante und der Log-additive Vererbungsmodus untersucht und anhand des Informationskriteriums von Akaike (AIC: Akaike's Information Criterion) auf die Chance des Zutreffens verglichen. Das Modell mit dem kleinsten AIC-Wert wurde als Wahrscheinlichstes angenommen. Insgesamt ließ sich mit Hilfe der Methode des AIC in der Münchener Kohorte eine Tendenz zum dominanten und in der Kieler Kohorte eine Tendenz zum überdominanten Vererbungsmodus beobachten, wobei zu bedenken ist, dass es sich hierbei um Hypothesen und nicht um sichere Aussagen über das zutreffende Rechenmodell handelt.

### 5.4.1 rs1004819

Wie aus Tabelle 15 und Tabelle 16 ersichtlich, wurde für den rs1004819 weder in der Münchener Kohorte, noch in der Kieler Replikationskohorte ein signifikanter Unterschied der Allelfrequenzen zwischen Patienten- und Kontrollgruppe festgestellt. Die Odds Ratios waren in beiden Kohorten  $> 1$  und stimmen somit in der Richtung überein.

Auf der Ebene der Genotypen jedoch lagen für die Münchener Studie hochsignifikante p-Werte, in der Replikationsstudie immerhin signifikante p-Werte vor. Diese Assoziation zeigte sich allerdings erst nach Korrektur der Daten im Bezug auf Alter, Geschlecht und Rauchverhalten. (München  $p = 0,0021$ ; OR 0,61; CI [0,44 – 0,84]; Kiel  $p = 0,012$ ; OR 0,73; CI [0,54 – 0,98]) Während die Münchener Ergebnisse am besten zu einem überdominanten Vererbungsmodus passen, erscheint in der Kieler Studie der kodominante Erbgang wahrscheinlicher. Die Mutation war unter den Kontrollen häufiger zu finden als in der Patientengruppe und markiert daher eine potenziell protektive Variante.

**Tabelle 15: Allel- und Genotypfrequenzen des rs1004819 mit möglichen Vererbungsmodi in der Münchener Studienkohorte**

MAF: Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; OR: Odds Ratios; CI: Konfidenzintervall; AIC: Akaike's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: T	0,281 (217)	0,260 (396)	0,24	1,12 (0,92 – 1,36)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
CC	0,500 (193)	0,543 (414)		
CT	0,438 (169)	0,396 (302)		
TT	0,062 (24)	0,061 (47)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,33	1470,6	0,0078	943,3
Dominant	0,15	1468,7	0,0031	942,2
Rezessiv	0,97	1470,8	0,9	951
Überdominant	0,15	1468,7	<b>0,0021</b>	941,6
Log-additiv	0,23	1469,4	0,018	945,4

**Tabelle 16: Allel- und Genotypfrequenzen des rs1004819 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Replikationskohorte**

MAF: Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; OR: Odds Ratios; CI: Konfidenzintervall; AIC: Akaike's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: T	0,264 (192)	0,259 (377)	0,80	1,03 (0,80 – 1,18)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
CC	0,532 (193)	0,564 (410)		
CT	0,408 (148)	0,354 (257)		
TT	0,061 (22)	0,082 (60)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,14	1398	<b>0,012</b>	1166,5
Dominant	0,35	1399	0,2	1171,8
Rezessiv	0,17	1398	0,033	1168,9
Überdominant	0,091	1397	0,012	1167,1
Log-additiv	0,86	1399	0,92	1173,4

### 5.4.2 rs7517847

Tabelle 17 und Tabelle 18 zeigen, dass auch für rs7517847 die Unterschiede der Allelfrequenzen zwischen den Studiengruppen das Signifikanzniveau nicht erreichten. Die Odds Ratios wiesen sowohl in der Münchener, als auch in der Kieler Kohorte Werte  $< 1$  auf und stimmten damit in ihrer Orientierung überein.

Dennoch gaben die Genotypfrequenzen Hinweise auf eine mögliche Erhöhung des Krankheitsrisikos bei Patienten mit der Mutation. Die unter Annahme eines Log-additiven Modells in der Münchener Studie vorhandene Signifikanz ließ sich jedoch in der Replikationskohorte nicht bestätigen.

**Tabelle 17: Allel- und Genotypfrequenzen des rs7517847 mit möglichen Vererbungsmodi in der Münchener Studienkohorte**

**MAF:** Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; **OR:** Odds Ratios; **CI:** Konfidenzintervall; **AIC:** Akaike's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: G	0,415 (324)	0,444 (680)	0,19	0,89 (0,75 – 1,06)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
TT	0,328 (128)	0,308 (236)		
TG	0,513 (200)	0,496 (380)		
GG	0,159 (62)	0,196 (150)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,3	1481,6	0,046	958,5
Dominant	0,49	1481,5	0,068	959,3
Rezessiv	0,12	1479,6	0,031	957,9
Überdominant	0,59	1481,7	0,99	962,6
Log-additiv	0,19	1480,3	<b>0,015</b>	956,7

**Tabelle 18: Allel- und Genotypfrequenzen des rs7517847 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Replikationskohorte**

**MAF:** Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; **OR:** Odds Ratios; **CI:** Konfidenzintervall; **AIC:** Akaike's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: G	0,413 (299)	0,436 (640)	0,31	0,91 (0,82 – 1,16)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
TT	0,370 (134)	0,330 (242)		
TG	0,434 (157)	0,469 (344)		
GG	0,196 (71)	0,202 (148)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,43	1403,7	0,4	1180,9
Dominant	0,2	1401,8	0,18	1178,9
Rezessiv	0,76	1403,3	0,53	1180,4
Überdominant	0,32	1402,4	0,43	1180,1
Log-additiv	0,31	1402,4	0,22	1179,2

### 5.4.3 rs10489629

Wiederum keine signifikanten Unterschiede in den Allelfrequenzen ließen sich für rs10489629 detektieren. Die Richtung der Odds Ratios stimmte zwischen der Münchener Kohorte und der Replikationskohorte überein.

Im Bezug auf die Genotypen zeigte dieser SNP in der Münchener Population erst nach Korrektur hinsichtlich Alter, Geschlecht und Rauchverhalten eine signifikante Assoziation mit der Parodontitis ( $p = 0,03$ ; OR 1,52; CI [1,04 – 2,23] für rezessiv bzw. OR 1,28; CI [1,02 – 1,60] für Log-additiv; Replikation:  $p = 0,013$ ; OR 1,43; CI [1,08 – 1,91]) bei indifferenten AIC-Werten für das rezessive und das log-additive Vererbungsmodell. Auch hier wirkt sich die Mutation möglicherweise durch ein erhöhtes Erkrankungsrisiko aus. In der Kieler Studie konnte der zunächst hochsignifikante  $p$ -Wert nach Korrektur nur mehr als signifikant angesehen werden. Hier spricht der AIC-Wert für einen überdominanten Erbgang. Alle Werte zu rs10489629 sind Tabelle 19 und Tabelle 20 zu entnehmen.

**Tabelle 19: Allel- und Genotypfrequenzen des rs10489629 mit möglichen Vererbungsmodi in der Münchener Studienkohorte**

MAF: Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; OR: Odds Ratios; CI: Konfidenzintervall; AIC: Akaike's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: G	0,449 (353)	0,475 (737)	0,23	0,90 (0,75 – 1,08)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
AA	0,445 (174)	0,279 (216)		
AG	0,356 (139)	0,492 (381)		
GG	0,199 (78)	0,230 (178)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,44	1489,8	0,072	967,9
Dominant	0,56	1489	0,17	969,3
Rezessiv	0,21	1487,8	<b>0,03</b>	966,5
Überdominant	0,6	1489,1	0,57	970,9
Log-additiv	0,27	1488,2	<b>0,03</b>	966,5

**Tabelle 20: Allel- und Genotypfrequenzen des rs10489629 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Replikationskohorte**

MAF: Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; OR: Odds Ratios; CI: Konfidenzintervall; AIC: Akaike's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: G	0,446 (322)	0,461 (656)	0,50	0,94 (0,80 – 1,13)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
AA	0,349 (126)	0,284 (202)		
AG	0,410 (148)	0,509 (362)		
GG	0,241 (87)	0,207 (147)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,0089	1375	0,038	1147,9
Dominant	0,032	1377,8	0,043	1148,3
Rezessiv	0,2	1380,7	0,48	1151,9
Überdominant	0,0022	1373	0,013	1146,3
Log-additiv	0,52	1382	0,38	1151,7

#### 5.4.4 rs2201841

Tabelle 21 und Tabelle 22 zeigen, dass sich für rs2201841 die Allelfrequenzen der Patienten- und Kontrollgruppen nicht signifikant unterschieden. Die Odds ratios waren hier nicht nur gleich orientiert, sondern wiesen sogar identische Werte auf.

Des Weiteren lagen keine signifikanten Verteilungsunterschiede der Genotypen vor. Ein in der Münchener Studie bestehender signifikanter Unterschied war nur in den angepassten Werten für das dominante Vererbungsmodell vorhanden – der laut AIC-Wert eher unwahrscheinlich ist – und ließ sich in der Replikationsstudie nicht bestätigen.

**Tabelle 21: Allel- und Genotypfrequenzen des rs2201841 mit möglichen Vererbungsmodi in der Münchener Studienkohorte**

**MAF:** Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; **OR:** Odds Ratios; **CI:** Konfidenzintervall; **AIC:** Akaike's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: C	0,290 (228)	0,266 (412)	0,22	1,13 (0,93 – 1,36)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
TT	0,506 (199)	0,535 (414)		
TC	0,407 (160)	0,398 (308)		
CC	0,087 (34)	0,067 (52)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,42	1495,4	0,028	971,4
Dominant	0,36	1494,3	0,076	969,4
Rezessiv	0,24	1493,7	0,48	976
Überdominant	0,76	1495	0,019	971
Log-additiv	0,22	1493,6	0,016	970,7

**Tabelle 22: Allel- und Genotypfrequenzen des rs2201841 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Replikationskohorte**

**MAF:** Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; **OR:** Odds Ratios; **CI:** Konfidenzintervall; **AIC:** Akaike's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: C	0,288 (209)	0,264 (388)	0,23	1,13 (0,89 – 1,30)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
TT	0,510 (185)	0,552 (405)		
TC	0,405 (147)	0,369 (271)		
CC	0,085 (31)	0,079 (58)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,41	1405,8	0,34	1185,3
Dominant	0,19	1403,9	0,17	1183,6
Rezessiv	0,76	1405,5	0,95	1185,4
Überdominant	0,24	1404,2	0,15	1183,4
Log-additiv	0,25	1404,3	0,3	1184,4

#### **5.4.5 rs11465804**

Weder die Allel- noch die Genotypfrequenzen der Patientengruppe des rs11465804 unterschieden sich signifikant von denen der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 23), ein Ergebnis, welches durch die Replikationsstudie bestätigt wurde (siehe Tabelle 24). Die Werte der Odds Ratios lagen in beiden Untersuchungen unter 1 und waren somit gleich gerichtet.

**Tabelle 23: Allel- und Genotypfrequenzen des rs11465804 mit möglichen Vererbungsmodi in der Münchener Studienkohorte**

**MAF:** Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; **OR:** Odds Ratios; **CI:** Konfidenzintervall; **AIC:** Akaike's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: G	0,064 (50)	0,066 (103)	0,79	0,95 (0,67 – 1,35)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
TT	0,878 (345)	0,870 (674)		
TG	0,117 (46)	0,128 (99)		
GG	0,005 (2)	0,002 (2)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,7	1497,2	0,5	977,3
Dominant	0,69	1495,8	0,24	975,3
Rezessiv	0,5	1495,5	0,79	976,6
Überdominant	0,6	1495,7	0,25	975,4
Log-additiv	0,79	1495,9	0,24	975,3

**Tabelle 24: Allel- und Genotypfrequenzen des rs11465804 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Replikationskohorte**

**MAF:** Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; **OR:** Odds Ratios; **CI:** Konfidenzintervall; **AIC:** Akaike's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: G	0,047 (34)	0,054 (79)	0,48	0,86 (0,53 – 1,18)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
TT	0,912 (331)	0,896 (657)		
TG	0,083 (30)	0,100 (73)		
GG	0,006 (2)	0,004 (3)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,6	1405,8	0,4	1184,4
Dominant	0,38	1404	0,47	1183,7
Rezessiv	0,76	1404,7	0,33	1183,3
Überdominant	0,33	1403,9	0,34	1183,3
Log-additiv	0,45	1404,2	0,63	1184

#### **5.4.6 rs11209026**

Wie aus Tabelle 25 und Tabelle 26 ersichtlich, waren die Verteilungsunterschiede der Allel- und Genotypfrequenzen auch für rs11209026 nicht signifikant. Die Quotenverhältnisse waren in beiden Studien in die gleiche Richtung orientiert.

**Tabelle 25: Allel- und Genotypfrequenzen des rs11209026 mit möglichen Vererbungsmodi in der Münchener Studienkohorte**

**MAF:** Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; **OR:** Odds Ratios; **CI:** Konfidenzintervall; **AIC:** Akaike's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: A	0,068 (53)	0,073 (111)	0,62	0,92 (0,65 – 1,29)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
GG	0,867 (340)	0,856 (649)		
GA	0,130 (51)	0,141 (107)		
AA	0,003 (1)	0,003 (2)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,87	1481,4	0,52	965,2
Dominant	0,6	1479,4	0,26	963,2
Rezessiv	0,98	1479,7	0,78	964,4
Überdominant	0,6	1479,4	0,27	963,3
Log-additiv	0,61	1479,4	0,25	963,2

**Tabelle 26: Allel- und Genotypfrequenzen des rs11209026 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Replikationskohorte**

**MAF:** Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; **OR:** Odds Ratios; **CI:** Konfidenzintervall; **AIC:** Akaike's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: A	0,059 (43)	0,061 (89)	0,89	0,97 (0,68 – 1,41)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
GG	0,890 (323)	0,884 (648)		
GA	0,102 (37)	0,111 (81)		
AA	0,008 (3)	0,006 (4)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,82	1406,4	0,75	1186,8
Dominant	0,83	1404,7	0,93	1185,4
Rezessiv	0,6	1404,5	0,47	1184,9
Überdominant	0,73	1404,7	0,78	1185,3
Log-additiv	0,94	1404,8	0,93	1184,4

#### **5.4.7 rs1343151**

Auch die Allel- und Genotypfrequenzen des rs1343151 schienen keinen Zusammenhang. Tabelle 27 und Tabelle 28 zeigen, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppen vorhanden waren. Die Odds Ratios waren in der Münchener Studie und der Replikationsstudie jeweils  $> 1$ .

**Tabelle 27: Allel- und Genotypfrequenzen des rs1343151 mit möglichen Vererbungsmodi in der Münchener Studienkohorte**

**MAF:** Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; **OR:** Odds Ratios; **CI:** Konfidenzintervall; **AIC:** Akaike's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: T	0,355 (279)	0,349 (540)	0,79	1,03 (0,86 – 1,22)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
CC	0,417 (164)	0,415 (321)		
CT	0,455 (179)	0,471 (364)		
TT	0,127 (50)	0,114 (88)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,77	1495,8	0,59	977,2
Dominant	0,95	1494,3	0,31	975,3
Rezessiv	0,51	1493,8	0,82	976,2
Überdominant	0,62	1494	0,39	975,6
Log-additiv	0,78	1494,2	0,39	975,5

**Tabelle 28: Allel- und Genotypfrequenzen des rs1343151 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Replikationskohorte**

**MAF:** Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; **OR:** Odds Ratios; **CI:** Konfidenzintervall; **AIC:** Akaike's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: T	0,343 (249)	0,337 (493)	0,77	1,03 (0,87 – 1,25)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
CC	0,455 (165)	0,434 (318)		
CT	0,405 (147)	0,458 (335)		
TT	0,141 (51)	0,108 (79)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,14	1402	0,66	1185,7
Dominant	0,57	1403,7	0,67	1184,3
Rezessiv	0,11	1401,4	0,54	1184,1
Überdominant	0,1	1401,3	0,4	1183,8
Log-additiv	0,71	1403,8	0,98	1184,5

#### 5.4.8 rs10889677

Eine weitere Mutation, die möglicherweise risikomindernd wirkt, ist rs10889677. Während sich die Allelfrequenzen wiederum für beide Studiengruppen nicht signifikant unterscheiden, lässt Tabelle 29 eine starke Assoziation in den korrigierten Werten für die Genotypfrequenzen der Münchener Studie erkennen. Hier kann von einem dominanten Erbgang ausgegangen werden. Allerdings wurde in der Kieler Studie keine entsprechende Assoziation detektiert (siehe Tabelle 30).

**Tabelle 29: Allel- und Genotypfrequenzen des rs10889677 mit möglichen Vererbungsmodi in der Münchener Studienkohorte**

MAF: Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; OR: Odds Ratios; CI: Konfidenzintervall; AIC: Akaike's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: A	0,290 (228)	0,266 (412)	0,22	1,13 (0,93 – 1,36)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
CC	0,506 (199)	0,535 (414)		
CA	0,407 (160)	0,398 (308)		
AA	0,087 (34)	0,067 (52)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,42	1495,4	0,35	970,3
Dominant	0,36	1494,3	<b>0,0096</b>	968,3
Rezessiv	0,24	1493,7	0,49	974,5
Überdominant	0,76	1495	0,023	969,8
Log-additiv	0,22	1493,6	0,019	969,5

**Tabelle 30: Allel- und Genotypfrequenzen des rs10889677 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Replikationskohorte**

MAF: Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; OR: Odds Ratios; CI: Konfidenzintervall; AIC: Akaike's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: A	0,284 (206)	0,261 (380)	0,26	1,12 (0,88 – 1,29)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
CC	0,512 (186)	0,560 (408)		
CA	0,408 (148)	0,357 (260)		
AA	0,080 (29)	0,082 (60)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,25	1399,9	0,17	1179,8
Dominant	0,13	1398,4	0,11	1178,7
Rezessiv	0,85	1400,7	0,68	1181,1
Überdominant	0,097	1398	0,06	1177,8
Log-additiv	0,28	1399,5	0,28	1180,2

### **5.4.9 rs11209032**

Keine signifikanten Assoziationen zur CP – bei gleichgerichteten Odds Ratios – lagen für rs11209032 vor, wie in Tabelle 31 und Tabelle 32 gezeigt.

**Tabelle 31: Allel- und Genotypfrequenzen des rs11209032 mit möglichen Vererbungsmodi in der Münchener Studienkohorte**

**MAF:** Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; **OR:** Odds Ratios; **CI:** Konfidenzintervall; **AIC:** Akaike's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: A	0,293 (230)	0,291 (450)	0,91	1,01 (0,84 – 1,22)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
GG	0,490 (192)	0,507 (392)		
GA	0,434 (170)	0,404 (312)		
AA	0,076 (30)	0,089 (69)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,54	1492,9	0,2	974,7
Dominant	0,58	1491,8	0,089	973
Rezessiv	0,46	1491,6	0,98	975,9
Überdominant	0,33	1491,1	0,085	973
Log-additiv	0,91	1492,1	0,19	974,2

**Tabelle 32: Allel- und Genotypfrequenzen des rs11209032 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Replikationskohorte**

**MAF:** Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; **OR:** Odds Ratios; **CI:** Konfidenzintervall; **AIC:** Akaike's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: A	0,285 (207)	0,274 (399)	0,60	1,06 (0,83 – 1,21)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
GG	0,507 (184)	0,540 (394)		
GA	0,416 (151)	0,370 (270)		
AA	0,077 (28)	0,089 (65)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,31	1401,2	0,33	1180,4
Dominant	0,29	1400,4	0,38	1179,9
Rezessiv	0,47	1401	0,39	1179,9
Überdominant	0,14	1399,3	0,17	1178,7
Log-additiv	0,62	1401,3	0,77	1180,5

#### **5.4.10 rs1495965**

Auch für rs1495965 erreichten die Unterschiede zwischen den Patienten- und Kontrollgruppen auf der allelischen Ebene nicht das Signifikanzniveau. Die Odds Ratios der Replikationsstudie wiesen in die der Münchener Studie entgegengesetzte Richtung, wenngleich beide Werte nahe bei 1 lagen. In der Münchener Kohorte wurde eine grenzwertig signifikante Assoziation mit der CP angetroffen, welche aber nach Korrektur der Daten im Bezug auf Alter, Geschlecht und Rauchverhalten einen größeren p-Wert aufwies und somit nicht mehr signifikant war. In der Replikationsstudie waren weder vor noch nach der Anpassung bezüglich Alter, Geschlecht und Rauchverhalten signifikante Unterschiede zwischen den Studiengruppen vorhanden. Die genauen Werte sind Tabelle 33 und Tabelle 34 zu entnehmen.

**Tabelle 33: Allel- und Genotypfrequenzen des rs1495965 mit möglichen Vererbungsmodi in der Münchener Studienkohorte**

**MAF:** Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; **OR:** Odds Ratios; **CI:** Konfidenzintervall; **AIC:** Akaike's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: G	0,400 (313)	0,426 (660)	0,24	0,90 (0,76 – 1,07)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
AA	0,340 (133)	0,334 (259)		
AG	0,519 (203)	0,480 (372)		
GG	0,141 (55)	0,186 (144)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,13	1489,5	0,37	973,7
Dominant	0,84	1491,5	0,22	972,1
Rezessiv	0,05	1487,7	0,82	973,6
Überdominant	0,21	1490	0,18	971,8
Log-additiv	0,23	1490,1	0,47	973,1

**Tabelle 34: Allel- und Genotypfrequenzen des rs1494965 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Replikationskohorte**

**MAF:** Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; **OR:** Odds Ratios; **CI:** Konfidenzintervall; **AIC:** Akaike's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: G	0,435 (316)	0,431 (631)	0,85	1,02 (0,86 – 1,21)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
AA	0,320 (116)	0,335 (245)		
AG	0,490 (178)	0,469 (343)		
GG	0,190 (69)	0,197 (144)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,79	1405,5	0,72	1182,8
Dominant	0,6	1403,7	0,91	1181,4
Rezessiv	0,81	1403,9	0,48	1180,9
Überdominant	0,49	1403,5	0,5	1181
Log-additiv	0,83	1403,9	0,75	1181,3

### 5.4.11 rs1884444

Tabelle 35 lässt für rs1884444, der nur in der Kieler Kohorte untersucht wurde, keine Assoziation zur CP erkennen.

**Tabelle 35: Allel- und Genotypfrequenzen des rs11884444 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Studienkohorte**

MAF: Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; OR: Odds Ratios; CI: Konfidenzintervall; AIC: Akaike's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: G	0,457 (332)	0,481 (704)	0,30	0,91 (0,79 – 1,11)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
TT	0,303 (110)	0,281 (206)		
TG	0,479 (174)	0,475 (348)		
GG	0,218 (79)	0,243 (178)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,64	1405,1	0,59	1184,3
Dominant	0,47	1403,5	0,7	1183,3
Rezessiv	0,41	1403,3	0,3	1182,3
Überdominant	0,96	1404	0,6	1183,1
Log-additiv	0,35	1403,1	0,4	1182,7

#### 5.4.12 rs7530511

Auch für rs7530511 lag keiner der p-Werte der Allel- oder Genotypfrequenzen der Kieler Kohorte im signifikanten Bereich (siehe Tabelle 36)

**Tabelle 36: Allel- und Genotypfrequenzen des rs7530511 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Studienkohorte**

MAF: Minorallelfrequenz, Absolutwerte sind in Klammern angegeben; OR: Odds Ratios; CI: Konfidenzintervall; AIC: Akaikc's Information Criterion

Allele	MAF Patienten	MAF Kontrollen	p-Wert	OR (95% CI)
Minorallel: T	0,133 (95)	0,145 (210)	0,47	0,91 (0,76 – 1,26)
<b>Genotypen</b>	Patienten	Kontrollen		
CC	0,759 (271)	0,741 (536)		
CT	0,216 (77)	0,228 (165)		
TT	0,025 (9)	0,030 (22)		
<b>Modelle</b>	unangepasst		angepasst	
	p-Wert	AIC	p-Wert	AIC
Kodominant	0,77	1385	0,75	1163,9
Dominant	0,53	1383,1	0,48	1162
Rezessiv	0,6	1383,2	0,64	1162,3
Überdominant	0,65	1383,3	0,58	1162,2
Log-additiv	0,48	1383	0,45	1161,9

## 5.5 Haplotypen

Zusätzlich zu krankheitsassoziierten Einzelnukleotidpolymorphismen besteht die Möglichkeit, dass ein Zusammenhang der Erkrankung mit bestimmten Haplotypen besteht. Als Haplotypen bezeichnet man bestimmte Allelkombinationen, die überzufällig häufig gekoppelt vererbt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde in den Populationen aus Kiel und München unabhängig voneinander nach Haplotypen innerhalb der betreffenden SNPs gesucht.

### 5.5.1 Haplotypen in der Münchener Studiengruppe

Acht der zehn untersuchten Polymorphismen der Münchener Population waren in zwei Haplotyp-Blöcken strukturiert. Block 1, der sich von Intron 5 bis Exon 7 erstreckte, enthielt die Varianten rs1004819 und rs7530511=p.Pro310Leu. Die SNPs rs10489629, rs2201841, rs11465804, rs11209026=p.Arg381Gln, rs1343151 und rs10889677 bildeten den zweiten Block von Intron 7 bis Exon 11.

Abbildung 15 zeigt in einem Lewontins D'-Diagramm an, wie stark die einzelnen SNPs untereinander gekoppelt sind. Werte über 0,8 entsprechen einem Kopplungsungleichgewicht. In der Grafik sind nur die Dezimalstellen angegeben.

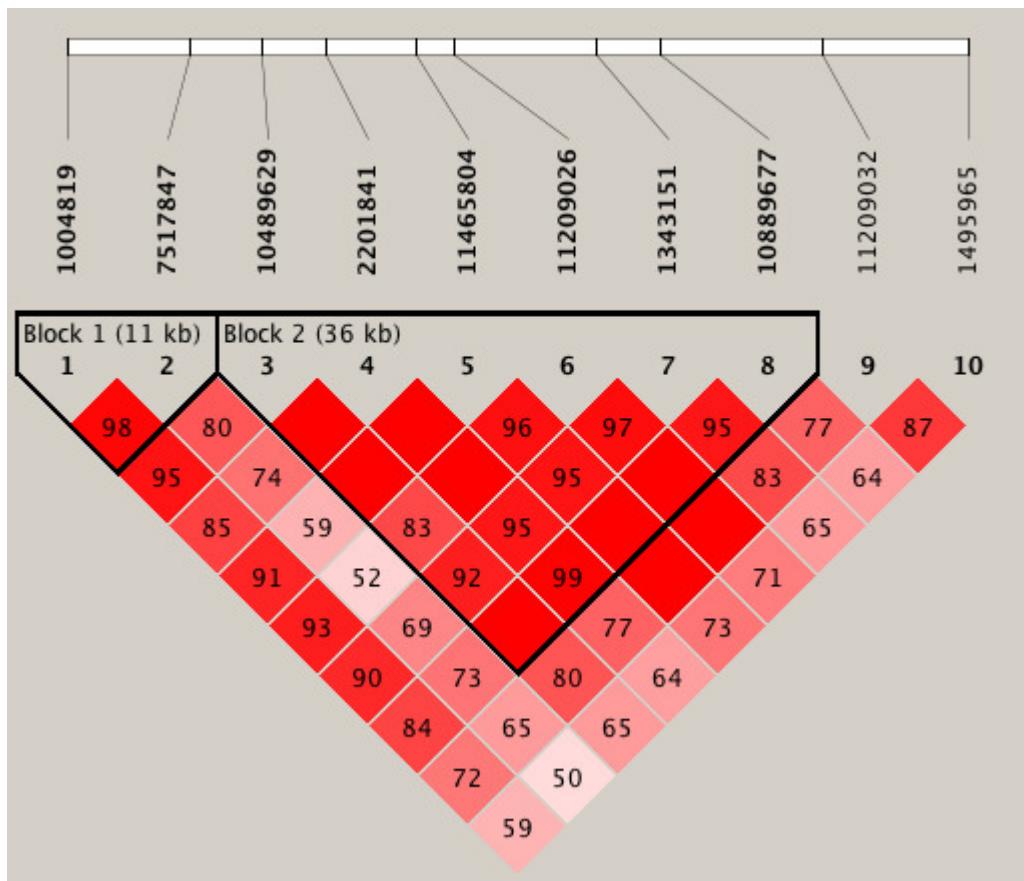


Abbildung 15: Lewontins D'-Werte für die zehn untersuchten SNPs der Münchener Studie

Häufigster Haplotyp innerhalb der gesamten Population war im Block 1 die Variante CG mit einer Frequenz von 43,3 %.

Wie Tabelle 37 zeigt, wiesen die Haplotypen des Blocks 1, der die für die Erkrankung scheinbar protektive Variante rs1004819 und gleichzeitig die in der Münchener Studie als risikoverstärkend detektierte Variante rs7517847 enthielt, keine signifikante Assoziation zur CP auf.

Innerhalb von Block 2 wurde ein schwach assoziierter protektiver Haplotyp entdeckt: Die Variante GTTGCC trat in 13,9 % der Kontrollen, aber nur in 10,4 % der Patienten auf ( $\chi^2=5,84$ ;  $p = 0,02$ ;  $OR = 0,72$ ). Nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen war der p-Wert jedoch nicht mehr signifikant (p-Wert 0,10 nach  $10^5$  Permutationen).

**Tabelle 37: Haplotyp-Häufigkeiten,  $\chi^2$  und p-Werte der Münchener Studie**

Block	Haplotyp	Patienten n=402 Frequenz	Kontrollen n=793 Frequenz	$\chi^2$ Wert	p-Wert	OR
Block 1	CG	0,413	0,443	1,84	0,17	0,89
	CT	0,302	0,298	0,04	0,83	1,02
	TT	0,281	0,258	1,45	0,23	1,13
Block 2	GTTGTC	0,283	0,269	0,50	0,48	1,07
	ACTGCA	0,288	0,258	2,34	0,13	1,16
	ATTGCC	0,250	0,247	0,03	0,87	1,02
	GTTGCC	0,104	0,139	5,84	0,02	0,72
	GTGATC	0,061	0,063	0,03	0,86	0,97

### 5.5.2 Haplotypen in der Kieler Studiengruppe

Die statistische Berechnung der Haplotypen ergab in der Kieler Population eine Struktur, die von derjenigen der Münchener Studie abwich. Es gab ebenfalls zwei Haplotypblöcke. Die fünf Marker rs1884444, rs1004819, rs7517847, rs7530511 und rs10489629 standen jedoch mit keinem anderen Marker in einem Kopplungsungleichgewicht.

Block 1 umfasste rs2201841, rs11465804, rs11209026, rs1343151 sowie rs10889677. Damit enthielt er bis auf und rs10489629 alle SNPs des Münchener Blocks 2, ebenfalls von Intron 7 bis Exon 11 reichend.

Der zweite Block bestand in Kiel allerdings aus rs11209032 und rs1495965, den zwei SNPs, welche in der Münchener Studie isoliert gestanden hatten und befand sich im 3'-nahen Bereich des IL23R-Gens.

Abbildung 16 gibt in einem Linkage-Disequilibrium-Plot (LD-Plot) einen Überblick über die Stärke der Kopplungen zwischen einzelnen Markern. In der Grafik sind nur die Dezimalstellen der Werte angegeben.

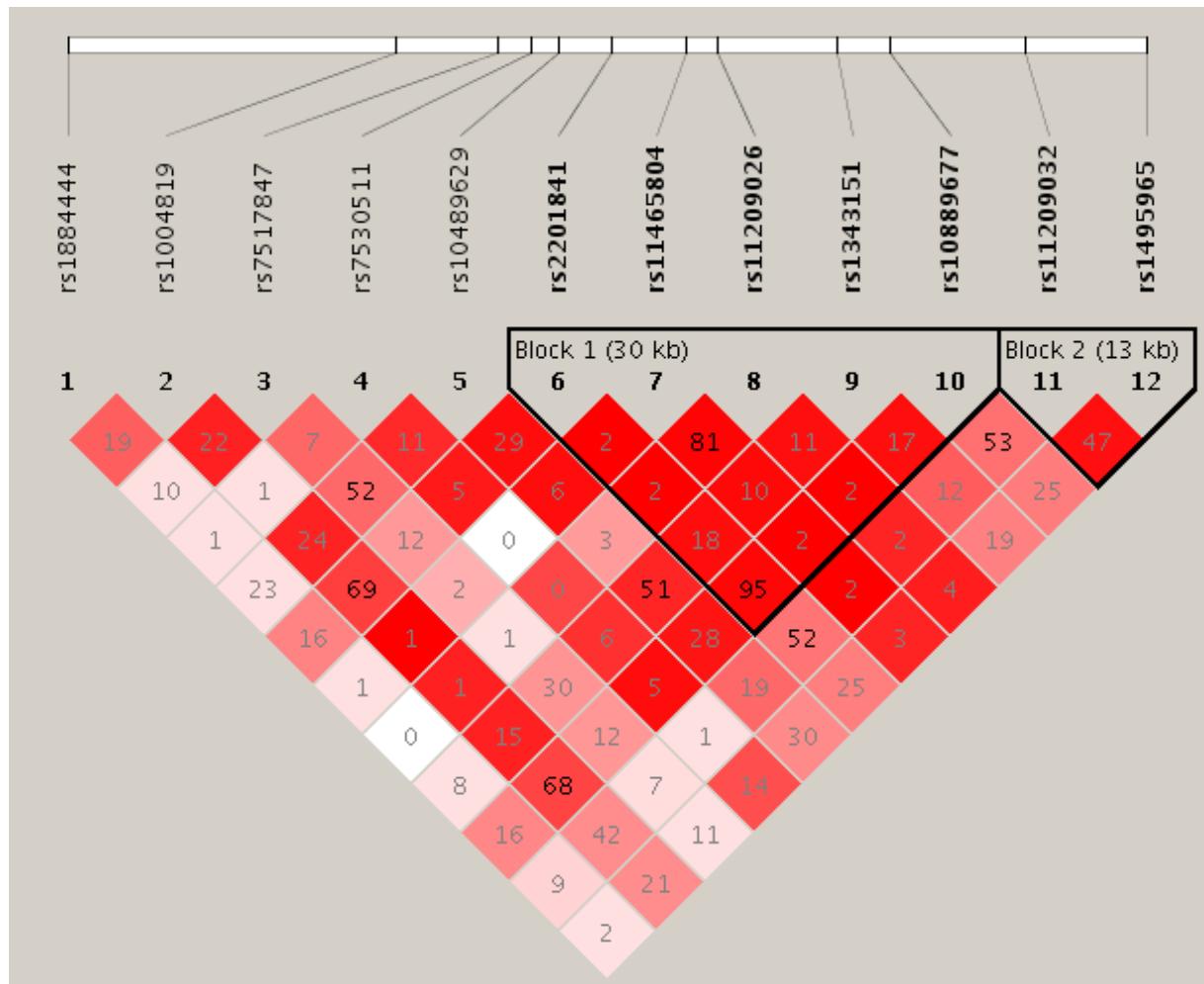


Abbildung 16: Lewontin's D-Werte für die zwölf untersuchten SNPs der Kieler Studie

Im Block 2, der teilweise mit dem Münchener Block 2 übereinstimmt, wurde die dort festgestellte Signifikanz nicht bestätigt. Hier war die Nummer Eins unter den Kombinationen die Variante GA mit insgesamt 56,2 %.

Auch im Haplotyp-Block 1 fanden sich keine signifikanten Assoziationen zur CP.

Die p-Werte lagen, wie Tabelle 38 zu entnehmen, in einem Bereich zwischen 0,23 (Haplotyp TTGCC in Block 1; OR = 0,89) und 0,83 (Haplotyp GG in Block 2; OR = 0,97)

**Tabelle 38: Chi-Quadrat- und p-Werte sowie Odds Ratios der Kieler Haplotypeanalyse**

Block	Haplotyp	Patienten n=363 Frequenz	Kontrollen n=736 Frequenz	$\chi^2$ Wert	p-Wert	OR
Block 1	TTGCC	0,371	0,398	1,458	0,23	0,89
	TTGTC	0,28	0,273	0,114	0,74	1,03
	CTGCA	0,275	0,257	0,809	0,37	1,1
	TGATC	0,044	0,054	0,986	0,32	0,81
Block 2	GA	0,558	0,564	0,088	0,77	0,97
	AG	0,278	0,27	0,188	0,66	1,05
	GG	0,158	0,161	0,044	0,83	0,97

## 6 Diskussion

### 6.1 Studiendesign und Methode

Ziel der Untersuchung war es, die ätiologische Rolle von Varianten im IL23R-Gen für die Manifestation der chronischen Parodontitis zu klären. Die entsprechende Region war 2006 von *Duerr et al.*<sup>4</sup> in einer genomweiten Assoziationsstudie als Risikogen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen, die mit einer Barrierestörung der Schleimhaut einhergehen, identifiziert worden. Da in der Literatur von Wechselwirkungen zwischen CED und der chronischen Parodontitis berichtet wurde,<sup>86</sup> lag es nahe, Gemeinsamkeiten in der Pathogenese der beiden Erkrankungen zu vermuten.

Um den Zusammenhang zwischen den entsprechenden Mutationen und der CP zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine direkte Assoziationsstudie durchgeführt. Dazu wurden Allel- und Genotypfrequenzen von Einzelnukleotidpolymorphismen betroffener Patienten den Frequenzen gesunder Kontrollpersonen gegenübergestellt und die Signifikanz der Abweichung berechnet. Prinzipiell wäre es hier möglich, entweder bevölkerungsbasiert oder familienbasiert vorzugehen. In bevölkerungsbasierten Studien – auch Fall-Kontroll-Studien genannt – werden zwei Testgruppen unverwandter Individuen verglichen, im Gegensatz zu familienbasierten Studien, die familieninterne Häufungen von Erkrankungen detektieren.<sup>87</sup>

In der vorliegenden Studie wurde, das Fall-Kontroll-Design gewählt, da es schwierig ist, mehrere Probanden aus verschiedenen Generationen einer Familie gleichzeitig zu rekrutieren und auf diese Weise ein ausreichend großes Studienkollektiv erreicht werden konnte.

Zusätzlich zur Betrachtung der Genotyp- und Allelverteilung für die einzelnen SNPs wurde eine Haplotypanalyse durchgeführt. Ein Haplotyp ist eine Kombination von Allelen benachbarter SNPs, die aufgrund ihrer räumlichen Nähe meist gemeinsam vererbt werden. Anhand einer Analyse der Haplotypen können zusätzliche Erkenntnisse gewonnen werden. Beispielsweise kann es vorkommen, dass bestimmte Allele sich gegenseitig beeinflussen und erst gemeinsam mit anderen, im Haplotyp enthaltenen Allelen einen Effekt auf den Phänotyp haben, ein Phänomen, welches als Epistase bezeichnet wird.<sup>88,89</sup>

### 6.1.1 Auswahl der Studienkollektive

Um die Validität einer Assoziationsstudie zu sichern, sind folgende Anforderungen an die Auswahl der Studienpopulationen zu stellen:

*Die Aufnahme einer Person in das Patienten- bzw. Kontrollkollektiv sollte anhand von klaren Kriterien, wenn möglich nach internationalen Standards erfolgen.<sup>90</sup>*

Die Diagnose der CP wurde in beiden Patientengruppen entsprechend der Klassifikation der American Association of Periodontology gestellt.<sup>11</sup>

Eine Schwierigkeit ist in einigen Fällen die eindeutige Differenzierung zwischen chronischer und aggressiver Parodontitis,<sup>91</sup> so dass nicht garantiert werden kann, dass sich ausschließlich Patienten mit chronischer Parodontitis in den entsprechenden Kollektiven befinden.

*Alle Teilnehmer sollten die gleiche ethnische Herkunft haben, um genetische Homogenität zu gewährleisten. Da für die Allel- und Genotypfrequenzen eines SNPs oft erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Ethnien bestehen, können valide Aussagen über beobachtete Abweichungen in Korrelation mit einer Erkrankung nur innerhalb einer Bevölkerungsgruppe mit gleicher Herkunft gemacht werden.<sup>92</sup>*

Sämtliche Studienteilnehmer stammten aus dem deutschen Raum.

*Sowohl die Altersverteilung als auch das Geschlechterverhältnis sollte in Patienten- und Kontrollpopulation aufeinander abgestimmt sein.<sup>90</sup>*

Die Altersverteilung der Kontrollgruppen im Vergleich zu den Patientengruppen betreffend, gab es in dieser Studie signifikante Unterschiede. Da die CP bevorzugt im höheren Lebensalter auftritt, ist es möglich, dass Personen, die Risikoträger sind, erst später in ihrem Leben erkranken und daher der Kontrollpopulation zugerechnet werden. Um die Zahl dieser Probanden möglichst gering zu halten, wäre es sinnvoll, Kontrollpopulationen mit höherem Altersdurchschnitt auszuwählen.<sup>93</sup> Dies ist aber nur schwer durchführbar, da für Blutspender eine Altersobergrenze von 68 Jahren vorgeschrieben ist.<sup>94</sup> Leider waren daher in dieser Studie beide Kontrollgruppen im Durchschnitt jünger als die jeweiligen Patientengruppen, in München mit einem Unterschied von 6,9 Jahren und in Kiel mit 12,11 Jahren Differenz.

*Die Größe des Kontrollkollektivs ist etwa um den Faktor 1,5 – 2 größer zu wählen als die Größe des Patientenkollektivs. Zu kleine Kontrollgruppen bergen die Gefahr des Fehlers 2. Art, während zu große den Fehler 1. Art begünstigen.*

In der Münchener Studie war eine Patientengruppe von 402 Personen einer Kontrollgruppe gegenübergestellt, die 792 Personen umfasste, während die Kieler Studie 363 Patienten mit 736 gesunden Probanden verglich. Somit sind die empfohlenen Verhältnisse eingehalten.

*Die Studienpopulation sollte möglichst groß sein, um auch schwache Assoziationen aufzudecken.<sup>95</sup>*

Da die chronische Parodontitis durch viele Faktoren beeinflusst wird, ist die Testgröße von 1192 Probanden im Studienkollektiv und einer Replikationskohorte von 1099 Probanden nicht groß genug, um eine ausreichende statistische Power zu erhalten. Dazu wären größere Populationen vonnöten, die aber an einem Standort nicht zu rekrutieren sind.

### **6.1.2 Auswahl der genetischen Marker**

Wie in genetischen Assoziationsstudien zu multifaktoriell und multigenetisch bedingten Erkrankungen zum Zeitpunkt dieser Studie üblich, wurden Einzelnukleotidpolymorphismen als Marker ausgewählt. Erst in letzter Zeit wurde zusätzlich die Untersuchung von CNVs und VNTRs (siehe Kapitel 1.6) als weitere Methode zur Identifikation krankheitsrelevanter Gene gebräuchlich.<sup>96</sup>

Es wurden drei nichtsynonyme Sequenzvarianten untersucht. Das Minorallel des SNP rs11209026 verursacht einen Aminosäureaustausch an der Position 381 von Arginin nach Glutamin, des rs1884444 an der Position 3 von Glutamin nach Histidin und im SNP rs7530511 wird bei Vorliegen der Mutation an der Position 310 statt Prolin Leucin in das Genprodukt eingebaut. Die beiden letzten SNPs wurden nur in der Kieler Population tipisiert.

Der SNP rs10889677 liegt innerhalb eines untranslatierten Bereiches (3'UTR), der sich an den kodierenden Bereich anschließt und regulatorische Sequenzen enthält.<sup>4</sup>

Alle anderen untersuchten Genloci lagen entweder zwischen dem 3'-Ende des IL23R-Gens und dem benachbarten IL12RB2-Gen (rs11209032, rs1495965), oder intronisch innerhalb des IL23R-Gens (rs1004819: Intron 5, rs7517847: Intron 6, rs10489629 und rs2201841: Intron 7, rs11465804: Intron 8 und rs1343151: Intron 9).<sup>4</sup>

Bis auf rs1884444 und rs7530511 waren alle SNPs dieser Studie zuvor in der Studie von Duerr et al.<sup>4</sup> als Risikogene für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) beschrieben worden. Die Hypothese, dass Ähnlichkeiten der beiden Krankheitsbilder und CP und CED auf teilweise ätiologische Überschneidungen zurückzuführen waren, bot somit einen Anhaltspunkt für die Suche nach Kandidatengenen für die Parodontitis. Für die Variante rs7530511 war eine Assoziation mit Psoriasis bekannt<sup>97</sup> und sie schien überdies ebenso wie rs1884444 als nichtsynonyme, kodierende Variante besonders relevant. Darüber hinaus vermutete man aufgrund erhöhter IL23-Spiegel in entzündetem parodontalen Gewebe einen Zusammenhang zwischen dem IL23-Weg und der CP.<sup>54</sup>

### **6.1.3 Validität der verwendeten Genotypisierungsmethoden**

Inzwischen sind mehrere biotechnologische Methoden verfügbar um SNPs zu genotypisieren. Für diese Studie wurde die Polymerasekettenreaktion mit fluoreszenzmarkierten Sonden in Kombination mit einer Schmelzkurvenanalyse<sup>98</sup> angewandt, ein zuverlässiges Verfahren, welches zum Zeitpunkt der Studie eines der schnellsten und kostengünstigsten war, um große Mengen an DNA zu genotypisieren.

Zwar gibt es Schritte, die manuell durchgeführt werden müssen, und daher eine gewisse Fehleranfälligkeit bedingen, wie beispielsweise die Benennung der Gruppen nach Genotypen. Dennoch kann aufgrund mehrerer Kontrollen innerhalb des Arbeitsablaufs insgesamt von validen Ergebnissen ausgegangen werden:

Die verwendeten Sonden und Primer wurden mittels Gelelektrophorese überprüft. Außerdem wurden auf jeder Probenplatte Negativproben aus reinem H<sub>2</sub>O aufgetragen und analysiert, um eventuelle Kontaminationen aufzudecken.

## **6.2 Vergleich der Kontrollgruppen mit Referenzpopulationen**

Die Ergebnisse der beiden Kontrollgruppen wurden zur Überprüfung der Plausibilität mehreren Standardpopulationen gegenübergestellt. Wichtig für die Auswahl dieser Kohorten war die kaukasische Herkunft, da, wie auf der Internetseite von „HapMap“<sup>84</sup> ersichtlich ist, zum Teil erhebliche Unterschiede in den Allelfrequenzen unter den einzelnen Ethnien bestehen.

Eine der drei ausgewählten Populationen war die CEU-Population – eine im Rahmen des HapMap-Projektes<sup>84</sup> untersuchte Standardpopulation von 90 Individuen aus Utah mit nord-

und westeuropäischen Vorfahren. Man kann bei der CEU-Population allerdings nicht von einem echten Kontrollkollektiv sprechen, da es sich um einen Bevölkerungsdurchschnitt handelt und damit nicht ausschließlich um gesunde Personen. Auch die geringe Zahl von 90 Individuen muss kritisch gesehen werden und es ist fraglich, ob man hierbei von einem repräsentativen Ausschnitt der Bevölkerung ausgehen kann.

Als zweites wurde eine britische Kontrollpopulation aus 1345 Individuen, die in einer Assoziationsstudie mittels Microarraytechnologie genotypisiert worden war, zum Vergleich herangezogen. Leider waren hier nur die Allelfrequenzen veröffentlicht, so dass keine Angabe der Verteilung der Genotypen möglich ist.<sup>99,100</sup>

Die dritte Referenzpopulation umfasste 548 nordamerikanische Personen mit europäischen Vorfahren aus der Genomweiten Assoziationsstudie von *Duerr et al.*<sup>4</sup>

Tabelle 39 und Tabelle 40 zeigen, dass die Ergebnisse dieser Studie und ihrer Replikation sowohl im Bezug auf die Allel- wie auch auf die Genotypfrequenzen eine sehr hohe Übereinstimmung mit sämtlichen Referenzpopulationen aufweisen. Dies lässt auf eine korrekt durchgeführte Genotypisierung schließen.

**Tabelle 39: Minorallelfrequenzen (MAF) der IL23R-Sequenzvarianten in den Kontrollgruppen dieser Studie und in drei unabhängigen Referenzpopulationen**

n.g.: nicht getestet

SNP	MAF Kontroll- gruppe München n=792	MAF Kontroll- gruppe Kiel n=736	MAF Hapmap CEU- Population n=90	MAF Britische Population n=1345	MAF Nordameri- kanische Population n=548
rs1004819	0,260	0,259	0,288	0,307	0,280
rs7517847	0,444	0,436	0,442	n.g.	0,443
rs10489629	0,475	0,461	0,483	0,448	0,475
rs2201841	0,266	0,264	0,296	n.g.	0,291
rs11465804	0,066	0,054	0,045	0,058	0,063
rs11209026	0,073	0,061	0,041	0,062	0,070
rs1343151	0,349	0,337	0,327	0,332	0,370
rs10889677	0,266	0,261	0,292	0,315	0,288
rs11209032	0,291	0,274	0,306	0,320	0,293
rs1495965	0,426	0,431	0,410	0,447	0,412
rs1884444	n.g.	0,481	0,491	n.g.	0,470
rs7530511	n.g.	0,145	0,128	n.g.	0,120

**Tabelle 40: Genotypfrequenzen der IL23R-Sequenzvarianten in den Kontrollgruppen dieser Studie und in zwei unabhängigen Referenzpopulationen**  
**n.g.: nicht getestet**

SNP	Genotyp	Kontrollgruppe München n=792	Kontrollgruppe Kiel n=736	HapMap CEU- Population n=90	Nordamerikanische Population n=548
rs1004819	CC	0,543	0,564	0,517	0,506
	CT	0,396	0,354	0,383	0,428
	TT	0,061	0,082	0,100	0,066
rs7517847	TT	0,308	0,330	0,267	0,304
	TG	0,496	0,469	0,467	0,507
	GG	0,196	0,202	0,267	0,189
rs10489629	AA	0,279	0,284	0,267	0,267
	AG	0,492	0,509	0,433	0,517
	GG	0,230	0,207	0,300	0,217
rs2201841	TT	0,535	0,552	0,550	0,504
	TC	0,398	0,369	0,350	0,410
	CC	0,067	0,079	0,100	0,086
rs11465804	TT	0,870	0,896	0,867	0,878
	TG	0,128	0,100	0,117	0,118
	GG	0,002	0,004	0,017	0,003
rs11209026	GG	0,856	0,884	0,883	0,865
	GA	0,141	0,111	0,100	0,129
	AA	0,003	0,006	0,017	0,006
rs1343151	CC	0,415	0,434	0,400	0,375
	CT	0,471	0,458	0,417	0,510
	TT	0,114	0,108	0,183	0,116
rs10889677	CC	0,535	0,560	0,533	0,506
	CA	0,398	0,357	0,383	0,414
	AA	0,067	0,082	0,083	0,081
rs11209032	GG	0,507	0,540	0,483	0,480
	GA	0,404	0,370	0,417	0,454
	AA	0,089	0,089	0,100	0,066
rs1495965	AA	0,334	0,335	0,386	0,329
	AG	0,480	0,469	0,404	0,518
	GG	0,186	0,197	0,211	0,153
rs1884444	TT	n.g.	0,281	0,300	0,287
	TG	n.g.	0,475	0,517	0,483
	GG	n.g.	0,243	0,183	0,230
rs7530511	CC	n.g.	0,741	0,783	0,770
	CT	n.g.	0,228	0,183	0,211
	TT	n.g.	0,030	0,033	0,018

### 6.3 Bewertung der Ergebnisse aus genetischer Sicht

Es wurde ein potenziell protektiver Polymorphismus entdeckt (rs1004819), der in der Originalstudie nach Korrektur im Bezug auf Alter, Geschlecht und Rauchverhalten hochsignifikante ( $p < 0,005$ ) Unterschiede in den Genotypverteilungen zwischen Patienten- und Kontrollgruppe aufwies. Dieses Ergebnis wurde durch signifikante ( $p < 0,05$ ) p-Werte in der Replikationskohorte untermauert. Des Weiteren ließ sich die in der Münchener Studie aufgedeckte Assoziation der Variante rs10489629 mit der CP in der Kieler Studie replizieren. In beiden Populationen ergaben sich signifikante Abweichungen, die auf eine risikoverstärkende Variante hinweisen. Ob man mit diesen Assoziationen jedoch eine ursächliche Mutation gefunden hat, die direkten Einfluss auf das Erkrankungsrisiko hat, oder nur mit der entsprechenden Region gemeinsam vererbte Sequenzen, ist damit noch nicht geklärt.

Zusätzlich wiesen mehrere SNPs des IL23R-Gens signifikante Abweichungen von den Genotypfrequenzen der Kontrollgruppe auf, die nur in der Originalstudie festzustellen waren. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass möglicherweise ein schwacher Zusammenhang zwischen den Varianten rs7517847 (risikoverstärkend), rs10889677 (protektiv) und der CP besteht. Trotz Anpassung der Ergebnisse nach Alter, Geschlecht und Rauchverhalten wäre ein Stratifizierungseffekt möglich, der die Resultate verfälschen könnte. Anhaltspunkt hierfür wären die grenzwertigen Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Equilibrium in der Kieler Studiengruppe. Nicht auszuschließen sind auch Unterschiede in der genetischen Ausstattung zwischen dem nord- und dem süddeutschen Studienkollektiv.

Die Suche nach Haplotypen, die das Erkrankungsrisiko modulieren, lieferte keine positiven Assoziationen. Die einzige Variante, die zunächst in Korrelation mit der CP zu stehen schien, war in der Münchener Kohorte die Variante GTTGCC. Nach der Korrektur für multiples Testen waren die Unterschiede in Studien- und Kontrollgruppe allerdings nicht mehr signifikant und ließen sich auch in der Kieler Kohorte nicht replizieren. Ob die untersuchten Allelkombinationen im Bezug auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit für CP ohne Auswirkung sind, oder sich die einzelnen SNPs durch Epistase gegenseitig neutralisieren, kann nicht beurteilt werden.<sup>101</sup>

Vorerst ist diese Studie die einzige, welche die Region des IL23R-Gens auf einen Zusammenhang mit chronischer Parodontitis hin untersucht hat. Die beobachteten signifikanten Assoziationen der SNPs deuten auf mögliche Modulationen hin, während die Haplotypanalyse keine weiterführenden Ergebnisse lieferte.

Es ist davon auszugehen, dass die Entzündungsmechanismen der CP denen anderer chronischer und autoimmuner Erkrankungen nur teilweise gleichen. Die hier untersuchten Polymorphismen, die nach genomweiten Assoziationsstudien einen eindeutigen Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigten,<sup>4,85</sup> wiesen bis auf rs1004819 und rs10489629 keine sicheren Assoziationen zur CP auf. Speziell der SNP rs11209026, der in genomweiten Assoziationsstudien als Risikovariante für die ankylosierende Spondylitis, Colitis ulcerosa und Morbus Crohn identifiziert worden war, lieferte in dieser Studie keine Hinweise auf einen Zusammenhang mit der CP.<sup>102</sup> Ebenso hatten Folwaczny et al. 2004 keine signifikanten Unterschiede zwischen CP-Patienten- und Kontrollpopulation im Bezug auf die stark mit Morbus Crohn assoziierte 3020insC Mutation auf dem NOD2/CARD15-Gen feststellen können.<sup>103</sup> Ein von Cargill et al. als hochsignifikant beschriebener Risikohaplotyp für Psoriasis konnte in der vorliegenden Studie (nur in der Kieler Population untersucht) für die CP ebenfalls nicht bestätigt werden.<sup>104</sup>

Dem entsprechen Studien über die Assoziation der chronischen Parodontitis zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen: Ein häufigeres Auftreten von CP bei Patienten mit CED, welches bei Lokalisation der genetischen Prädisposition auf denselben Risikogenen zu erwarten wäre, ist in der Literatur zwar beschrieben worden: von Brito et al. 2008 für beide chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und von Stein et al. 2010 für die Colitis Ulcerosa.<sup>105,106</sup> Eine Studie von Grössner-Schreiber et al. konnte jedoch keine eindeutigen Ergebnisse liefern: während die Werte der mittleren Sondierungstiefen in der Kontrollgruppe sogar höher waren, zeigte sich eine Tendenz zu tieferen Taschen bei CED-Patienten.<sup>107</sup>

Denkbar wäre auch eine funktionelle Auswirkung, die mehrere chronische Erkrankungen beeinflusst, für die Parodontitis jedoch nur ein Nebenrisikofaktor ist, der aufgrund seiner seltenen Prävalenz nicht als solcher bewiesen werden kann. Anhaltspunkt hierfür wäre die gleiche Orientierung der Odds Ratios aller zehn SNPs (abgesehen von rs1495965 in der Münchner Studie) mit denjenigen, die für Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa beschrieben wurden.<sup>85</sup>

## 6.4 Einflüsse genetischer Varianten auf die Funktion des IL23-Rezeptors

IL23 ist ein Botenstoff, welcher durch Andocken an seinen Rezeptor in den Zielzellen die Produktion lokaler proinflammatorischer Zytokine, u.a. IL17, initiiert. Der Rezeptor wird vorwiegend auf aktivierten T-Zellen oder T-Gedächtniszellen und natürlichen Killerzellen exprimiert, die über einen JAK-STAT-Signalweg aktiviert werden. Seit ihrer Entdeckung vor einigen Jahren wird die IL23-Th17-Achse mit autoimmunen und chronisch-entzündlichen Krankheiten in Verbindung gebracht. Wie Regulation oder Dysregulation jedoch mit genetischen Varianten zusammenhängen, ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

Für die nichtsynonyme Variante rs11209026 besteht beispielsweise die Hypothese, dass das seltener Allel einen Funktionsverlust der Rezeptoreinheit einhergeht. *Pidasheva et al.* konnten in betroffenen Zellen eine verminderte STAT3-Phosphorylierung auf Stimulation durch IL23 feststellen. Außerdem war die Anzahl der auf IL23 reagierenden T-Zellen niedriger und die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen leicht reduziert.<sup>108</sup> Auch für die funktionelle Bedeutung des SNPs rs10889677 gibt es Hinweise, die am Ende dieses Kapitels näher erläutert sind.

Grundsätzlich beeinflussen Punktmutationen die Proteinsynthese auf verschiedenen Ebenen: Die Primärstruktur, das heißt die Sequenz der Aminosäuren, kann nur durch nichtsynonyme Punktmutationen, die sich in kodierenden Bereichen des Gens befinden, verändert werden. Aufgrund der unterschiedlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften der Aminosäuren kann es bei Einbau einer „falschen“ Aminosäure zu einer Abwandlung der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins kommen, was wiederum mit einer Funktionsveränderung oder auch mit einem Funktionsverlust einhergehen kann.<sup>56</sup> Dieser Mechanismus kommt im Hinblick auf die vorliegende Untersuchung nur bei den nichtsynonymen Varianten rs11209026 (Arg→Gln), rs1884444 (Gln→His), und rs7530511 (Pro→Leu) in Frage. Keine dieser drei Punktmutationen war jedoch in der vorliegenden Studie mit der CP assoziiert.

Weitere Variationen kommen dadurch zustande, dass die mRNA bei der Transkription nicht als exakte Kopie der im Zellkern vorliegenden DNA entsteht, sondern aus einer prä-mRNA bestimmte Abschnitte – sogenannte Introns – herausgeschnitten werden. Die verbleibenden Sequenzen können nun auf verschiedene Weise wieder zusammengefügt werden und dementsprechend für verschiedene Genprodukte kodieren, welche dann eine

Entzündungsreaktion mehr oder weniger begünstigen. Man geht davon aus, dass in der IL23R-Region eine sehr dynamische und polymorphe Spleiß-Aktivität besteht. In der Literatur sind vierundzwanzig alternative Spleißvarianten aus den 11 Exons des IL23-Gens beschrieben. Mindestens die Hälfte dieser Varianten wird wahrscheinlich schon im Zytoplasma zerstört und gar nicht erst translatiert. Für die Übrigen lassen sich anhand ihrer Struktur die in Tabelle 41 aufgeführten Funktionsvarianten prognostizieren.<sup>109</sup> Die genauen Zusammenhänge und die Bedeutung der einzelnen SNPs für die Expression verschiedener Isoformen müssen jedoch noch weiter erforscht werden.<sup>110</sup>

**Tabelle 41: Variationen der Funktion von Isoformen des IL23R-Genprodukts durch alternatives Spleißen nach Kan et al.<sup>109</sup>**

Δ bezeichnet nicht inkludierte Exons; pΔ markiert teilweise ausgeschlossene Exons; x nt bedeutet, dass die ersten x Nukleotide des entsprechenden Exons bei der Translation übersprungen wurden.

Isoform	Morphologischer Unterschied	Voraussichtliche Modulation der Funktion
Δ7 Δ9 Δ8,9 pΔ7,8 pΔ5,6,7 pΔ11 67nt	lösliche Formen ohne Transmembran- / intrazelluläre Domänen	<ul style="list-style-type: none"> <li>keine Verankerung in der Membran aufgrund fehlender Transmembrandomäne</li> <li>möglicherweise Sezernierung durch aktivierte Leukozyten als lösliche Zytokinrezeptoren</li> <li>Funktion als agonistische oder antagonistische Regulatoren des IL23-IL17-Signalwegs<sup>111</sup>: Δ9 hemmt beispielsweise in vitro die Reifung von Th17-Zellen.<sup>112</sup></li> </ul>
Δ6,7 Δ8	<ul style="list-style-type: none"> <li>Peptide mit verkürzter extrazellulärer Region</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>veränderte Ligandenbindungseigenschaften im Bezug auf Affinität und Spezifität</li> </ul>
Δ11 67 nt Δ8Δ11 67 nt	<ul style="list-style-type: none"> <li>IL23R-Variante ohne intrazelluläre Signalkomponente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>nicht zur Signalweitergabe fähig</li> <li>negative Regulierung des IL23-Th17-Signalwegs</li> </ul>

Ebenfalls auf der post-transkriptionalen Ebene findet ein differenzierter Prozess der Regulation der Genexpression statt. Die Information für die Quantität, mit der ein Gen translatiert werden soll, liegt in nicht-kodierenden Abschnitten der DNA, sogenannten Expression Quantitative Trait loci (eQTL). Mithilfe kleiner, ca. 22 Basen umfassender RNA-Moleküle (miRNA), wird die entsprechende Ziel-DNA entweder an der Translation gehindert, oder zerteilt und dadurch funktionslos gemacht.<sup>113</sup> SNPs in Regionen, die für diese miRNAs kodieren, sind demzufolge wichtig, auch wenn sie keinen Basenaustausch

verursachen. Studien haben nämlich gezeigt, dass synonome Mutationen den Phänotyp verändern können. Sie tun dies, indem sie die Genauigkeit des Spleißens, die Wiedergabetreue bei der Translation, die mRNA-Struktur und die Proteinfaltung beeinflussen.<sup>114</sup> Erst kürzlich konnten *Zwiers et al.* für das mutierte Allel des rs10889677 eine miRNA-vermittelte Dysregulation des IL-23-Signalwegs aufdecken.<sup>115</sup> Dieser SNP ist stark mit CED assoziiert und wies auch in der vorliegenden Studie – zumindest in der Münchener Kohorte – signifikante Assoziationen zur CP auf. Möglicherweise greifen auch andere, in dieser Studie untersuchte stille Mutationen über diesen Mechanismus in die Regulation der Entzündungsreaktion ein.

## 6.5 Schlussfolgerung

Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie könnte die Variante rs1004819 eine protektive und rs1048962 eine risikoverstärkende Rolle im Bezug auf die chronische Parodontitis spielen. Möglicherweise sind darüber hinaus auch die Mutationen rs10889677 und rs10489629 beteiligt. Diese Ergebnisse gelten vorerst nur für die in der Studie untersuchte Ethnie der Kaukasier im mitteleuropäischen Raum.

Da für die chronische Parodontitis ein polygenetischer Hintergrund vermutet wird, wäre es sinnvoll, eine systematische, genomweite Suche nach Assoziationen durchzuführen, wie sie bisher nur für die aggressive Parodontitis realisiert wurde.

In Zukunft könnte eine verbesserte therapeutische Strategie auch einen Gentest im Bezug auf stark assoziierte genetische Varianten einschließen, um einzuschätzen, ob eine intensivere Behandlung mit erhöhter Frequenz der parodontalen Nachsorgeuntersuchung nötig ist, bzw. um diese individuell wirksam zu gestalten.

## 7 Zusammenfassung

Das IL23R-Gen war im Zusammenhang mit der Entdeckung des IL23-Th17-Wegs und seiner Aufgabe innerhalb des adaptiven Immunsystems ins Blickfeld der Immunforschung geraten. Mittels genomweiter Assoziationsstudien waren Einflüsse dieses Gens auf Erkrankungen wie Colitis ulcerosa, Psoriasis und rheumatoide Arthritis aufgedeckt worden, die als Gemeinsamkeit die chronische Entzündung haben. Da für die chronische Parodontitis noch keine derartige Studie existierte, eine genetische Prädisposition jedoch beschrieben worden war, sowie erhöhte Spiegel von IL23 in erkranktem parodontalem Gewebe gemessen worden waren, sollte in vorliegender Untersuchung die Rolle von Mutationen des IL23R-Gens auf die CP analysiert werden.

In der Studienkohorte wurden zehn (bzw. in der Kieler Studie zwölf) SNPs innerhalb des IL23R-Gens und im an das 3'-Ende angrenzenden Bereich auf eine Assoziation mit der CP untersucht. Als Material diente DNA von 402 Patienten und 792 gesunden Probanden. Die Ergebnisse wurden in einer unabhängigen Replikationskohorte aus Kiel (363 Patienten und 736 Kontrollen) überprüft.

Für vier der zwölf untersuchten SNPs wurden signifikante Zusammenhänge mit der CP detektiert, allerdings konnten nur zwei davon (rs1004819 und rs10489629) in der Replikationskohorte bestätigt werden. Die betreffenden Genvarianten könnten risikoverstärkende (rs7517847 und rs10489629), aber auch risikoerniedrigende (rs1004819 und rs10889677) Effekte haben.

Bei der zusätzlich durchgeführten Haplotypanalyse konnten keine signifikanten Assoziationen beobachtet werden.

Zusammenfassend gibt diese Studie Hinweise auf eine ätiopathogenetische Bedeutung von Varianten im IL23R-Gen für die chronische Parodontitis bei mitteleuropäischen Kaukasiern. Insbesondere die Varianten rs1004819 und rs10489629 scheinen dabei eine Rolle zu spielen.

## 8 Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005; 366:1809–20.
- <sup>2</sup> Loos BG. Systemic effects of periodontitis. *Int J Dent Hyg*. 2006; 4:34–38
- <sup>3</sup> Stabholz A, Soskolne WA, Shapira L. Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010; 53:138–153.
- <sup>4</sup> Duerr RH, Taylor KD, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006; 314:1461–3.
- <sup>5</sup> World Health Organization. WHO Oral Health Country/Area Profile. Verfügbar im Internet unter: <http://www.whocollab.od.mah.se/index.html>.
- <sup>6</sup> Albandar JM, Rams TE. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontology 2000*. 2002; 29:7–10.
- <sup>7</sup> Hoffmann T, Micheelis W, Reich E. Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). Deutscher Ärzte-Verlag, Köln 2006.
- <sup>8</sup> Micheelis W, Reich E, et al. Dritte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS III). Deutscher Ärzte-Verlag, Köln 1999.
- <sup>9</sup> König J, Holtfreter B, Kocher T. Periodontal health in Europe: future trends based on treatment needs and the provision of periodontal services – position paper 1. *Eur J Dent Educ*. 2010; 14(Suppl.1):4–24.
- <sup>10</sup> Page RC, Schroeder HE. Periodontitis in Man and Other Animals. A Comparative Review. Karger, Basel 1982.

<sup>11</sup> Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999; *4(1)*:1–6.

<sup>12</sup> Deutsche Gesellschaft für Parodontologie e.V. *Klassifikationen der Parodontalerkrankungen*. Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin 2002.

<sup>13</sup> American Dental Association 1992

<sup>14</sup> Rateitschak KH, Wolf HE. *Farbatlanten der Zahnmedizin 1: Parodontologie*. 3.Auflage. Thieme, Stuttgart 2003.

<sup>15</sup> Schonfeld SE. Strategies for managing periodontal inflammation. *J Calif Dent Assoc*. 2010; *38(4)*:272–83.

<sup>16</sup> Van Dyke TE. Proresolving lipid mediators: potential for prevention and treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2011; *38(s11)*:119–25.

<sup>17</sup> Hasturk H, Kantarci A, Van Dyke TE. Paradigm shift in the pharmacological management of periodontal diseases. *Front Oral Biol*. 2012; *15*:160–76.

<sup>18</sup> Kao DW, Fiorellini JP. Regenerative periodontal therapy. *Front Oral Biol*. 2012; *15*:149–59.

<sup>19</sup> Sanz M, Winkelhoff AJ, on Behalf of Working Group 1 of the Seventh European Workshop on Periodontology. Periodontal infections: understanding the complexity – Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2011; *38(s11)*:3–6.

<sup>20</sup> Chen T, Yu, W-Han, Izard J, Baranova OV, Lakshmanan A, Dewhirst F.E. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database*. Vol. 2010.

<sup>21</sup> Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*. 1965; *36*:177–187.

- <sup>22</sup> Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1986; *13*:905–11.
- <sup>23</sup> Loesche WJ: Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev.* 1976; *9*:65–107.
- <sup>24</sup> Socransky SS. Microbiology of periodontal disease – present status and future considerations. *J Periodontol.* 1977; *48*:479–504.
- <sup>25</sup> Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994; *2*:263–71.
- <sup>26</sup> Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1994; *5*:78–111.
- <sup>27</sup> Van der Velden U, Abbas F, Armand S, et al. The effect of sibling relationship on the periodontal condition. *J Clin Periodontol.* 1993; *20*:683–690.
- <sup>28</sup> Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, Califano JV, Burmeister JA, Schenkein HA. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol.* 2000; *71*(11):1699–707.
- <sup>29</sup> Kinane DF, Marshall GJ. Periodontal manifestations of systemic disease. *Aust Dent J.* 2001; *46*(1):2–12.
- <sup>30</sup> Calsina G, Ramon JM, Echeverria JJ. Effects of smoking on periodontal tissues. *J Clin Periodontol.* 2002; *29*:771–776.
- <sup>31</sup> Ryder MI. The influence of smoking on host responses in periodontal infections. *Periodontol 2000.* 2007; *43*:267–277.
- <sup>32</sup> Stabholz A, Soskolne WA, Shapira L. Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000.* 2010; *53*:138–153.

- <sup>33</sup> Axelsson P, Nystrom B, Lindhe J. The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults. Results after 30 years of maintenance. *J Clin Periodontol.* 2004; *31*:749–757.
- <sup>34</sup> Axelsson P, Lindhe J. Effect of controlled oral hygiene procedures on caries and periodontal disease in adults. Results after 6 years. *J Clin Periodontol.* 1981; *8*:239–248.
- <sup>35</sup> Genco RJ, Ho AW, Kopman J, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA. Models to evaluate the role of stress in periodontal disease. *Ann Periodontol.* 1998; *3*:288–302.
- <sup>36</sup> Croucher R, Marcenes WS, Torres MC, Hughes F, Sheiham A. The relationship between life-events and periodontitis. A case-control study. *J Clin Periodontol.* 1997; *24*:39–43.
- <sup>37</sup> Monteiro da Silva AM, Oakley DA, Newman HN, Nohl FS, Lloyd HM. Psychosocial factors and adult onset rapidly progressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1996; *23*:789–794.
- <sup>38</sup> Khoury AE, Lam K, Ellis B, Costerton JW. Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. *Am Soc Artif Intern Organs.* 1992; *38*:174–178.
- <sup>39</sup> Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 2005; *38*:135–187.
- <sup>40</sup> Mahanonda R, Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontol 2000.* 2007; *43*:41–55.
- <sup>41</sup> Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokine-inducing components of periodonto-pathogenic bacteria. *J Periodont Res.* 1996; *31*:393–407.

- <sup>42</sup> Nakamura H, Fukusaki Y, Yoshimura A, Shiraishi C, Kishimoto M, Kaneko T, et al. Lack of Toll-like receptor 4 decreases lipopolysaccharideinduced bone resorption in C3H/HeJ mice in vivo. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23:190–195.
- <sup>43</sup> Cutler CW, Jotwani R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontol 2000.* 2004; 35:135–157.
- <sup>44</sup> Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2:933–944.
- <sup>45</sup> Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2003; 74:391–401.
- <sup>46</sup> Arron JR, Choi Y. Bone versus immune system. *Nature.* 2000; 408:535–536.
- <sup>47</sup> Potempa J, Banbula A, Travis J. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol 2000.* 2000; 24:153–92.
- <sup>48</sup> Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand.* 2007; 65:1–13.
- <sup>49</sup> Verstappen J, Von den Hoff JW. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J Dent Res.* 2006; 85:1074–1084.
- <sup>50</sup> Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann NY Acad Sci.* 2008;1143:123–150.
- <sup>51</sup> Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2004; 31:671–679.

<sup>52</sup> Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008; 79(8 Suppl):1569S–1576S.

<sup>53</sup> Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res*. 2010; 89(12):1349–63.

<sup>54</sup> Lester SR, Bain JL, Johnson RB, Serio FG. Gingival concentrations of interleukin-23 and -17 at healthy sites and at sites of clinical attachment loss. *J Periodontol*. 2007; 78:1545–50.

<sup>55</sup> Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*. 2005; 6 (11):1123–1132.

<sup>56</sup> Passarge E. Taschenatlas der Genetik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1994.

<sup>57</sup> Laine ML, Loos BG, Crielaard W. Gene polymorphisms in chronic periodontitis. *Int J Dent*. 2010; Artikel-ID324719.

<sup>58</sup> Chakravarti A. To a future of genetic medicine. *Nature*. 2001; 409:822–823.

<sup>59</sup> Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E. Taschenlehrbuch Humangenetik. 7. Auflage. Thieme, Stuttgart 2006.

<sup>60</sup> Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R. et al. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*. 1987; 235:1616–1622.

<sup>61</sup> Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nature Rev. Genet*. 2006; 7:85–97.

<sup>62</sup> Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Gen*. 2002; 3:391–397.

- <sup>63</sup> Gao X. Multiple testing corrections for imputed SNPs. *Genet Epidemiol*. 2011; *35*(3):154–8.
- <sup>64</sup> Yi N. Statistical analysis of genetic interactions. *Genet Res (Camb)*. 2010; *92*(5-6):443–59.
- <sup>65</sup> Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet*. 2003; *361*(9357):598–604.
- <sup>66</sup> Nsengimana J, Bishop DT. Design considerations for genetic linkage and association studies. *Methods Mol Biol*. 2012; *850*:237–62.
- <sup>67</sup> Stabholz A, Soskolne WA, Shapira L. Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010; *53*:138–53.
- <sup>68</sup> Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000; *13*:715–725.
- <sup>69</sup> Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, et al. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2004; *202*:96–105.
- <sup>70</sup> Parham C, et al. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol*. 2002; *168*:5699–5708.
- <sup>71</sup> [http://www.genenames.org/data/hgnc\\_data.php?hgnc\\_id=19100](http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=19100)
- <sup>72</sup> Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005; *6*(11):1123–32.

<sup>73</sup> Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol*. 2007; 25:221–242.

<sup>74</sup> Staudt V, Bothur E, Klein M, Lingnau K, Reuter S, Grebe N, Gerlitzki B, Hoffmann M, Ulges A, Taube C, Dehzad N, Becker M, Stassen M, Steinborn A, Lohoff M, Schild H, Schmitt E, Bopp T. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity*. 2010; 33(2):192–202.

<sup>75</sup> Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odorisio T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H, Durham SR, Schmidt-Weber CB, Cavani A. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest*. 2009; 119(12):3573–85.

<sup>76</sup> Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature*. 2008; 453:1051–1057

<sup>77</sup> McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *TRENDS in Immunology*. 2006; 27(1):17–23

<sup>78</sup> Matusevicius D, et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 1999; 5:101–104.

<sup>79</sup> Kotake S, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest*. 1999; 103:1345–1352.

<sup>80</sup> Li J, et al. The expression of interleukin-17, interferon-gamma, and macrophage inflammatory protein-3 alpha mRNA in patients with psoriasis vulgaris. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2004; 24:294–296.

<sup>81</sup> Lees CW, Satsangi J. Genetics of inflammatory bowel disease: implications for disease pathogenesis and natural history. *Gastroenterol Hepatol*. 2009; 3(5):513–34.

<sup>82</sup> Toussirot E. The IL23/Th17 pathway as a therapeutic target in chronic inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2012; *11*(2):159–68.

<sup>83</sup> Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988; *16*(3):1215.

<sup>84</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<sup>85</sup> Glas J., Seiderer J, Wetzke M, Konrad A, Torok HP, Schmechel S, Tonenchi L, Grassl C, Dambacher J, Pfennig S, Maier K, Griga T, Klein W, Epplen JT, Schiemann U, Folwaczny C, Lohse P, Goke B, Ochsenkuhn T, Muller-Myhsok B, Folwaczny M, Mussack T, Brand S. rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants. *PLoS One*. 2007; *2*(9)e819.

<sup>86</sup> Flemmig TF, Shanahan F, Miyasaki KT. Prevalence and severity of periodontal disease in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Periodontol*. 1991; *18*(9):690–697.

<sup>87</sup> Manichaikul A, Chen W, Williams K. Analysis of Family- and Population-Based Samples in Cohort Genome-Wide Association Studies. *Hum Genet*. 2012; *131*(2):275–287.

<sup>88</sup> Victor A. Bewertung genetischer Forschungsergebnisse. *GGW*. 2007; *4*:14–22.

<sup>89</sup> Plomin R et al. Behavioral Genetics. Worth Publishers, New York 2000.

<sup>90</sup> Vandenbroucke JP, von Elm E, Altman DG, Gøtzsche PC, Mulrow CD, et al. Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE): Explanation and Elaboration. *PLoS Med*. 2007; *4*(10):e297.

<sup>91</sup> Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999; *4*:39–52.

<sup>92</sup> Loos BG, John RP, Laine ML. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J. Clin. Periodontol.* 2005; 32:159–179.

<sup>93</sup> Flemmig TF. Periodontitis. *Ann Periodontol.* 1999; 4:32–37.

<sup>94</sup> [http://blutspendedienst-muenchen.de/die\\_bluetspende/wer\\_darf\\_bluet\\_spenden.html](http://blutspendedienst-muenchen.de/die_bluetspende/wer_darf_bluet_spenden.html)

<sup>95</sup> Colhoun MD, Mc Keigue PM, Smith GD. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *The Lancet.* 2003; 36(9360):865–872.

<sup>96</sup> Stütz AM, Korbel JO. Potenzial und Herausforderungen der personalisierten Genomik und des 1000-Genom-Projekts. *Medizinische Genetik.* 2010; 22(2):242–247.

<sup>97</sup> Nair RP, Ruether A, Stuart PE et al. Polymorphisms of the IL12B and IL23R genes are associated with psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2008; 128(7):1653–61.

<sup>98</sup> Lachnik J, Ackermann B, Bohrssen A, Maass S, Diephaus C, Puncken A, Stermann M, Bange FC. Rapid-cycle PCR and fluorimetry for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(9):3364–73.

<sup>99</sup> Tremelling M, Cummings F, Fisher SA, Mansfield J, et al. IL23R variation determines susceptibility but not disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2007; 132(5):1657–64.

<sup>100</sup> Power C, Elliott. Cohort profile: 1958 British birth cohort (National Child Development Study). *J. Int J Epidemiol.* 2006; 35(1):34–41.

<sup>101</sup> Marian AJ, Elements of missing heritability. *Curr Opin Cardiol.* 2012; 27(3):197–201.

<sup>102</sup> Vandebroeck K. Cytokine gene polymorphisms and human autoimmune disease in the era of genome-wide association studies. *J Interferon Cytokine Res.* 2012; 32(4):139–51.

- <sup>103</sup> Folwaczny M, Glas J, Török HP, Mauermann D, Folwaczny C. The 3020insC mutation of the NOD2/CARD15 gene in patients with periodontal disease. *Eur J Oral Sci.* 2004; *112*(4):316–9.
- <sup>104</sup> Cargill M et al. A Large-Scale Genetic Association Study Confirms IL12B and Leads to the Identification of IL23R as Psoriasis-Risk Genes *Am J Hum Genet.* 2007; *80*(2):273–390.
- <sup>105</sup> Brito F, de Barros FC, Zaltman C, Carvalho AT, Carneiro AJ, Fischer RG, Gustafsson A, Figueiredo CM. Prevalence of periodontitis and DMFT index in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Periodontol.* 2008; *35*(6):555–60.
- <sup>106</sup> Stein JM, Lammert F, Zimmer V, Granzow M, Reichert S, Schulz S, Ocklenburg C, Conrads G. Clinical periodontal and microbiologic parameters in patients with Crohn's disease with consideration of the CARD15 genotype. *J Periodontol.* 2010; *81*(4):535–45.
- <sup>107</sup> Grössner-Schreiber B, Fetter T, Hedderich J, Kocher T, Schreiber S, Jepsen S. Prevalence of dental caries and periodontal disease in patients with inflammatory bowel disease: a case-control study. *J Clin Periodontol.* 2006; *33*(7):478–84.
- <sup>108</sup> Pidasheva S, Trifari S, Phillips A, Hackney JA, Ma Y, Smith A, Sohn SJ, Spits H, Little RD, Behrens TW, Honigberg L, Ghilardi N, Clark HF. Functional studies on the IBD susceptibility gene IL23R implicate reduced receptor function in the protective genetic variant R381Q. *PLoS One.* 2011; *6*(10):e25038.
- <sup>109</sup> Kan SH, Mancini G, Gallagher G. Identification and characterization of multiple splice forms of the human interleukin-23 receptor alpha chain in mitogen-activated leukocytes. *Genes Immun.* 2008; *9*(7):631–9.
- <sup>110</sup> Karaderi T, Harvey D, Farrar C, Appleton LH, Stone MA, Sturrock RD, Brown MA, Wordsworth P, Pointon JJ. Association between the interleukin 23 receptor and

ankylosing spondylitis is confirmed by a new UK case-control study and meta-analysis of published series. *Rheumatology (Oxford)*. 2009; *48*(4):386–9.

<sup>111</sup> Levine SJ. Mechanisms of soluble cytokine receptor generation. *J Immunol* 2004; *173*:5343–5348.

<sup>112</sup> Yu RY, Gallagher G. A naturally occurring, soluble antagonist of human IL-23 inhibits the development and in vitro function of human Th17 cells. *J Immunol*. 2010; *185*(12):7302–8.

<sup>113</sup> He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004; *5*(7):522–31.

<sup>114</sup> Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet*. 201; *12*(10):683–91.

<sup>115</sup> Zwiers A, Kraal L, van de Pouw Kraan TC, Wurdinger T, Bouma G, Kraal G. Cutting edge: a variant of the IL-23R gene associated with inflammatory bowel disease induces loss of microRNA regulation and enhanced protein production. *J Immunol*. 2012; *188*(4):1573–7.

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Interleukine 12 und 23 und ihrer Rezeptoren.....	20
Abbildung 2: Temperaturverlauf eines PCR-Vorganges .....	34
Abbildung 3: Schmelzkurven des rs1004819.....	38
Abbildung 4: Schmelzkurven des rs7517847.....	38
Abbildung 5: Schmelzkurven des rs10489629.....	38
Abbildung 6: Schmelzkurven des rs2201841.....	39
Abbildung 7: Schmelzkurven des rs11465804.....	39
Abbildung 8: Schmelzkurven des rs11209026.....	39
Abbildung 9: Schmelzkurven des rs1343151.....	40
Abbildung 10: Schmelzkurven des rs10889677.....	40
Abbildung 11: Schmelzkurven des rs11209032 .....	40
Abbildung 12: Schmelzkurven des rs1495965.....	41
Abbildung 13: Schmelzkurven des rs1884444.....	41
Abbildung 14: Schmelzkurven des rs7530511.....	41
Abbildung 15: $r^2$ -Plot für die zehn untersuchten SNPs der Münchener Studie .....	67
Abbildung 16: $r^2$ -Plot für die zwölf untersuchten SNPs der Kieler Studie .....	69

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Parodontale Untersuchungsparameter .....	10
Tabelle 2: Hierarchie der Pathogenität parodontaler Mikroorganismen nach Haffajee und Socransky .....	13
Tabelle 3: Basisdaten des Münchener Studienkollektivs .....	23
Tabelle 4: Kriterien zur Aufnahme in die Patienten-/Kontrollgruppe für die Münchener Studie.....	24
Tabelle 5: Basisdaten des Kieler Studienkollektivs .....	25
Tabelle 6: Kriterien zur Aufnahme in die Patienten-/Kontrollgruppe für die Kieler Studie .....	25
Tabelle 7: Primersequenzen und Annealing-Temperaturen.....	29
Tabelle 8: Fret-Sondensequenzen.....	30
Tabelle 9: Ansatz für die PCR im Thermocycler .....	31
Tabelle 10: Verwendetes PCR-Programm im Thermocycler .....	31
Tabelle 11: Materialien für die Agarosegelektrophorese.....	32
Tabelle 12: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für die Analyse im LightCycler .....	33
Tabelle 13: Temperatur- und Zeitangaben eines Light-Cycler-Laufes.....	34
Tabelle 14: p-Werte der Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	42
Tabelle 15: Allel- und Genotypfrequenzen des rs1004819 mit möglichen Vererbungsmodi in der Münchener Studienkohorte .....	45
Tabelle 16: Allel- und Genotypfrequenzen des rs1004819 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Replikationskohorte .....	45

Tabelle 17: Allel- und Genotypfrequenzen des rs7517847 mit möglichen Vererbungsmodi in der Münchener Studienkohorte .....	47
Tabelle 18: Allel- und Genotypfrequenzen des rs7517847 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Replikationskohorte .....	47
Tabelle 19: Allel- und Genotypfrequenzen des rs10489629 mit möglichen Vererbungsmodi in der Münchener Studienkohorte .....	49
Tabelle 20: Allel- und Genotypfrequenzen des rs10489629 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Replikationskohorte .....	49
Tabelle 21: Allel- und Genotypfrequenzen des rs2201841 mit möglichen Vererbungsmodi in der Münchener Studienkohorte .....	51
Tabelle 22: Allel- und Genotypfrequenzen des rs2201841 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Replikationskohorte .....	51
Tabelle 23: Allel- und Genotypfrequenzen des rs11465804 mit möglichen Vererbungsmodi in der Münchener Studienkohorte .....	53
Tabelle 24: Allel- und Genotypfrequenzen des rs11465804 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Replikationskohorte .....	53
Tabelle 25: Allel- und Genotypfrequenzen des rs11209026 mit möglichen Vererbungsmodi in der Münchener Studienkohorte .....	55
Tabelle 26: Allel- und Genotypfrequenzen des rs11209026 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Replikationskohorte .....	55
Tabelle 27: Allel- und Genotypfrequenzen des rs1343151 mit möglichen Vererbungsmodi in der Münchener Studienkohorte .....	57
Tabelle 28: Allel- und Genotypfrequenzen des rs1343151 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Replikationskohorte .....	57
Tabelle 29: Allel- und Genotypfrequenzen des rs10889677 mit möglichen Vererbungsmodi in der Münchener Studienkohorte .....	59

Tabelle 30: Allel- und Genotypfrequenzen des rs10889677 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Replikationskohorte .....	59
Tabelle 31: Allel- und Genotypfrequenzen des rs11209032 mit möglichen Vererbungsmodi in der Münchener Studienkohorte .....	61
Tabelle 32: Allel- und Genotypfrequenzen des rs11209032 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Replikationskohorte .....	61
Tabelle 33: Allel- und Genotypfrequenzen des rs1495965 mit möglichen Vererbungsmodi in der Münchener Studienkohorte .....	63
Tabelle 34: Allel- und Genotypfrequenzen des rs1494965 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Replikationskohorte .....	63
Tabelle 35: Allel- und Genotypfrequenzen des rs11884444 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Studienkohorte .....	64
Tabelle 36: Allel- und Genotypfrequenzen des rs7530511 mit möglichen Vererbungsmodi in der Kieler Studienkohorte .....	65
Tabelle 37: Haplotyp-Häufigkeiten, $\chi^2$ und p-Werte der Münchener Studie .....	68
Tabelle 38: Chi-Quadrat- und p-Werte sowie Odds Ratios der Kieler Haplotypanalyse ....	70
Tabelle 39: Minorallelfrequenzen der IL23R-Sequenzvarianten in den Kontrollgruppen dieser Studie und in drei unabhängigen Referenzpopulationen .....	75
Tabelle 40: Genotypfrequenzen der IL23R-Sequenzvarianten in den Kontrollgruppen dieser Studie und in zwei unabhängigen Referenzpopulationen .....	76
Tabelle 41: Variationen der Funktion von Isoformen des IL23R-Genprodukts durch alternatives Spleißen nach Kan et al. ....	80
Tabelle 42: Übersicht verwendeter Geräte .....	101
Tabelle 43: Verwendete Software .....	102

## 11 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
AAP	American Academy of Periodontology
AIC	Akaike Information Criterion
API	Approximaler Plaque-Index
Arg	Arginin
BOP	Bleeding on Probing
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CARD	Caspase-Activation and Recruitment-Domänen
CD	Cluster of Differentiation
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CEU	Central European Utah Residents
CI	Konfidenzintervall
CNV	Copy Number Variation
CU	Colitis ulcerosa
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dendritic cell
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DGP	Deutsche Gesellschaft für Parodontologie
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMS	Deutsche Mundgesundheitsstudie
DNA	Deoxyribunucleic Acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFP	European Federation of Periodontology
eQTL	Expression quantitative trait loci
et al.	et alii (und andere)
Fc	Fragment, crystallizable
FL	Fluorescein
FRET	Flourescence Resonance Energy Transfer
G	Guanin
Gln	Glutamin
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
His	Histamin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Human Leucocyte Antigen
ICD	International Workshop for a Classification of periodontal Diseases and Conditions
IFN $\gamma$	Gamma-Interferon

IL	Interleukin
IL-R	Interleukin-Rezeptor
JAK	Janus-Kinase
kB	kiloBasen
LC	LightCycler®
LD	Linkage Disequilibrium
Leu	Leucin
LPS	Lipopolysaccharid
m-	Milli-
MAF	Minorallelfrequenz
miRNA	Micro Ribonucleic Acid
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
n	Nano-
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NK Zellen	natürliche Killerzellen
NOD2	Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OPG	Osteoprotegrin
OPT	Orthopantomogramm
OR	Odds Ratio
PAMP	Pathogen-associated Molecular Pattern
PBI	Papillen-Blutungs-Index
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Plaque-Index
Pro	Prolin
PRR	Pattern recognition receptor
PSI	Parodontaler Screening-Index
RANK	Recepror Activator of Nuclear Factor κB
RANKL	RANK-Ligand
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
T	Thymidin
TGF-β	Transforming Growth Factor β
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloprotease
TLR	Toll-like Rezeptor
TNFα	Tumornekrosefaktor-α
TST	Taschensondierungstiefe
u.a.	unter anderem
UPT	unterstützende Parodontitistherapie
UTR	Untranslated Region
UV	ultraviolett
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
ZB	Zahnbeweglichkeit

## 12 Anhänge

### 12.1 Geräte

Tabelle 42: Übersicht verwendeter Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Deionisiergerät	NANOpure Diamond Life Science	Thermo Scientific, Barnstead International, Dubuque, IA, USA
Eismaschine		Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Feinwaage	AQT Compact Balances	Adam Equipment Co Ltd, Milton Keynes, UK
Elektrophoresekammer	Sub-Cell® GT	Bio-Rad, München
Heißsiegelmaschine	MiniSealer	Axygen, Union City, CA, USA
Kamera		Peqlab Biotechnologie GmbH
Kühlzentrifuge	Allegra® 25R	Beckmann Coulter, Fullerton, CA, USA
Laborabzug		Waldner Laboreinrichtungen, Wangen
Magnetrührer	Variomag Monotherm	Neolab, Heidelberg
Mehrkanalpipette (12,5 µl)	Matrix Electronic Multichannel Pipette	Thermo Scientific, New Hampshire, USA
Mikrowellenofen		Sharp, Osaka, Japan
Pipetten (2,5/10/20/100/200/1000 µl)	Research®	Eppendorf, Hamburg
Pipettierroboter	Freedom EVO®	Tecan, Männedorf, Schweiz
Rüttelmischer	Vortex	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Spannungsquelle	Power Pac 3000	Bio-Rad, München
Spektrophotometer	NanoDrop®-1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Sterilbank	LaminAir Model 1,8	Holten, Allerød, Dänemark
Thermocycler	Light Cycler®480 Instrument 384 SN 1003	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Thermocycler	DNA Engine DYADTM	MJ Research, Waltham, MA, USA
Tischzentrifuge	Microfuge® 18	Beckmann Coulter, Fullerton, CA, USA
UV-Fluoreszenzsystem	FUSION-SL	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Videodokumentationssystem	CN-3000 Infinity	Vilber Lourmat, Eberhardzell

## 12.2 Software

**Tabelle 43: Verwendete Software**

LightCycler® 480 Genotyping Software	Roche, Mannheim
Excel®	Microsoft
SPSS 13.0	SPSS Inc., Chicago, USA
R-2.6.0	<a href="http://cran.r-project.org">http://cran.r-project.org</a>
HAPLOVIEW 4.0	<a href="http://www.broadinstitute.org/haploview/haploview">http://www.broadinstitute.org/haploview/haploview</a>
SNPStats	<a href="http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats">http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats</a>

## 13 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Dr. Matthias Folwaczny für die Überlassung des Themas und die hervorragende, umfassende Betreuung, sowie die Geduld, mit der er die Entstehung dieser Arbeit begleitet hat.

Bei Dr. Jürgen Glas und Dr. Martin Wetzke möchte ich mich für die Einarbeitung in die Labortechnik und die außergewöhnliche Unterstützung bei der Versuchsdurchführung und beim Verfassen der Arbeit bedanken. Ohne die Vermittlung dieses Themas durch Dr. Martin Wetzke und seine ständige Hilfsbereitschaft wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Danke an Dr. Martin Theus und an Prof. Dr. Bertram Müller-Myhsok für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben, gebührt besonderer Dank. Auch meine Schwestern, Mitbewohner und Freunde haben durch ihre Geduld und ihre Motivation in Phasen der Stagnation wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit. Hier sei auch Hans Braun erwähnt, der mir durch das Korrekturlesen des Manuskriptes eine große Hilfe war.

Schließlich gilt mein Dank auch den vielen Patienten und Probanden, die bereit waren, an dieser Studie teilzunehmen.