

Int Poster J Dent Oral Med 2012, Vol 14 No 3, Poster 612

## IL-1 Gencluster und das Auftreten von *A. actinomycetemcomitans* bei aggressiver Parodontitis

**Sprache:** Deutsch

### Autoren:

Dr. Susanne Schulz, Prof. Dr. Hans-Günter Schaller, Dr. Stefan Reichert,  
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Poliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie, Halle  
 PD Dr. Jamal M. Stein,  
 RWTH Aachen, Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde, Aachen  
 Dr. Christiane Gläser,  
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie, Halle

### Datum/Veranstaltung/Ort:

15.09.-17.09.2011

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie  
 Baden-Baden, Deutschland

### Einleitung

IL-1a und 1b, sowie der IL-1 Rezeptor (IL-1R) und der Rezeptorantagonist (IL1-RA) sind wichtige Faktoren im Rahmen der wirtsspezifischen Immunantwort auf Parodontopathogene.

Funktionell bedeutsame genetische Varianten in Genen des IL-1 Genclusters wurden identifiziert und deren Rolle im Rahmen der Pathogenese der Parodontitis beschrieben. Die Ergebnisse sind jedoch widersprüchlich.

Als entscheidender Auslöser entzündlicher Parodontitiden wird die subgingivale Besiedlung mit parodontopathogenen Keimen angesehen. Im Rahmen der Pathogenese der Erkrankung spielt die wirtsspezifische Immunantwort eine zentrale Rolle. Diese wird u.a. durch eine genetische Prädisposition beeinflusst.

Gene des IL-1 Genclusters beeinflussen eine Vielzahl von verschiedenen Zellen (natural killer cells, Makrophagen, TH-Zellen, B-Zellen), deren Bedeutung bei der Manifestation und Progression von entzündlichen Parodontitiden ausführlich beschrieben wurde.

Funktionell wichtige Polymorphismen (SNP) wurden für IL-1a (rs1800587), IL-1b (rs16944, rs1143634), IL-1R (rs2234650), IL-1RA (rs315952) identifiziert.

Kommann et al. (1997) postulierte einen parodontitisassoziierten "composite genotype" der sich aus den seltenen Genotypen der SNPs rs1800587 (IL-1a) und rs1143634 (IL-1b) zusammensetzt.

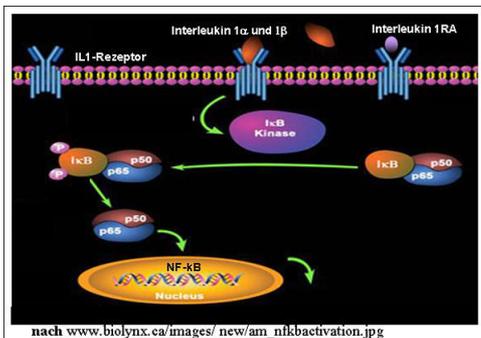


Abb. 1: Signaltransduktionsweg vermittelt durch Gene des IL-1 Clusters (IL-1a, IL-1b, IL-1R, IL-1RA)

### Problemstellung

Das Ziel dieser Studie bestand darin die Bedeutung von SNPs an den o.a. Genorten für das Auftreten von Parodontitiden und subgingivaler Keimbildung nach Adjustierung für etablierte parodontale Kofaktoren zu bestimmen.

### Material und Methoden

## Einschlusskriterien der Patienten

### Generalisierte aggressive Parodontitis (AP, n=86):

Erkrankungsbeginn vor dem 35. Lebensjahr  
Attachmentverlust > 4mm an mindestens 30% der Zähne  
> 3 betroffenen Zähne, keine Inzisivi oder erste Molaren  
Missverhältnis zwischen Menge mineralisierter Plaque und Attachmentverlust

### Generalisierte chronische Parodontitis (CP, n=73):

Attachmentverlust > 4mm an mindestens 30% der Zähne  
Attachmentverlust konsistent zur Akkumulation mineralisierter Plaque

### Parodontitisfreie Kontrollprobanden (n=89):

Sondiertiefe < 3.5mm  
Kein Attachmentverlust durch Parodontitis (Ausnahmen: Attachmentverlust infolge überkonturierter Restaurationen, primär endodontische Läsionen Putztraumata)

## Genomische Untersuchungen

### DNA-Isolation

Die DNA-Präparation der genomischen DNA aus humanem venösen EDTA-Blut erfolgte mittels "blood extraction kit" (Quiagen, Hilden). 200µl EDTA-Blut wurden zur Zellyse mit 20 µl Protease versetzt. Nach der Zugabe von 200 µl Lysispuffer AL wurde die Probe 15 sec gevortext und für 10 min bei 56°C inkubiert. 200 µl Ethanol wurde zugegeben, der Ansatz gevortext und auf eine Säule (QIAamp Spin Column) gegeben. Nach 2maligem Waschen (Puffer AW1 und AW2) der an die Säule gebundenen DNA wurde die DNA durch Zentrifugation getrocknet. Die DNA wurde mit 200µl aqua dest. 5min inkubiert und von der Säule gelöst.

### PCR mittels sequenzspezifischer Primer

Die Genotypanalyse der Gene des IL-1 Genclusters erfolgte mit Hilfe des "CYTOKINE Genotyping array CTS-PCR-SSP Tray kits" der "Collaborative Transplant Study", Department of Transplantation Immunology of the University Clinic of Heidelberg. In jeder PCR wurde ein 440bp-Fragment des humanen CRP-Gens als Positivkontrolle koamplifiziert. Die PCRs wurden mit Hilfe sequenzspezifischer Primer durchgeführt, die die Detektion der entsprechenden SNPs. Die Primer waren in thin-walled plastic 96-well PCR trays lyophilisiert. Je PCR wurden 10µl Mastermix, der 1U Taq-Polymerase (Invitex), 100ng genomische DNA, 5% Glycerol und PCR-Puffer enthielt, dazugegeben. PCR-Programm (2 min 94°C; 10 Zyklen: 15 sec 94°C, 1 min 64°C; 20 Zyklen: 15 sec 94°C, 50 sec 61°C, 30 sec 72°C) PCR-Produkte wurden im ethidiumbromidhaltigen, 2%igen Agarosegel aufgetrennt und ausgewertet.

## Subgingivale Bestimmung von 5 parodontpathogenen Leitkeimen

### Probengewinnung und DNA-Isolation

Die Plaqueproben wurden mit sterilen Papierspitzen aus der tiefsten Tasche jedes Quadranten entnommen und gepoolt. Die bakterielle DNA wurde mittels QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen, Hilden) isoliert. Die Papierspitzen wurden mit 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Pproteinase K für 10min bei 70°C inkubiert. 200 µl Lysispuffer Al wurde hinzugegeben und 5min bei 95°C inkubiert. Der Ansatz (ohne Filterspitzen) wurde auf eine Säule (QIAamp Spin Column) pipettiert und 2 mal mit Puffer AW1 und AW2 gewaschen. Die DNA wurde in 400µl AE-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

### PCR

Für die spezifische Amplifikation von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi), *Tannerella forsythia* (Tf) und *Treponema denticola* (Td) wurde der micro-Ident® test von HAIN-Diagnostik (Lifesience, Nehren) benutzt. Mastermix (Puffer, biotinylierte Primer, DNA als Positivkontrolle), 2U Taq-Polymerase (Eppendorf, Hamburg), und 5 µl der isolierten bakteriellen DNA wurden gemixt. PCR: 5 min 95°C; 10 Zyklen: 30 sec 95°C, 2 min 58°C; 20 Zyklen: 25 sec 95°C, 40 sec 53°C, 40 sec 70°C; 8 min 70°C Die PCR-Produkte wurden im ethidiumbromidhaltigen 1%igen Agarosegel aufgetrennt.

### Hybridisierung

20 µl des PCR-Produkts und 20 µl der Denaturierungslösung wurden für 5 min inkubiert. 1 ml Hybridisierungspuffer (vorgewärmt auf 45°C) wurde dazugegeben. Gabe dieser Lösung zur Membran, vorhybridisiert mit bakterieller DNA und Positivkontrollen. Inkubation bei 45°C für 30 min im Schüttelwasserbad. Membran wurde mit 1 ml "stringent wash solution" bei 45°C für 15 min gewaschen. 1 ml der Konjugatlösung wurde hinzugegeben (Raumtemp., 30 min). Waschen der Membran und Inkubation mit 1 ml der Substratlösung. Nachweis der Bakterien erfolgte visuell (Farbreaktion mittels Alkalischer Phosphatase). 2 Positivkontrollen für PCR (AC) und Hybridisierung (CC) sind im Test enthalten.

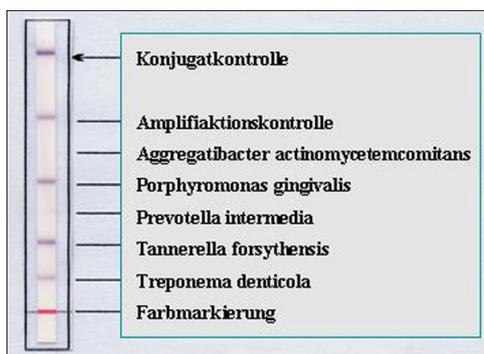


Abb. 2: Bestimmung der subgingivalen Keimbesiedlung mittels des micro-Ident® Test (HAIN-Diagnostik)

## Ergebnisse

In dieser Fall-Kontroll-Studie konnten weder nach bivariater noch multivariater Analyse Assoziationen zwischen genetischen Varianten des IL-1 Genclusters und dem Auftreten von schweren Parodontitiden gezeigt werden. Träger der seltenen Genotypen der SNPs rs1800587 (pkorr.=0.009), rs1143634 (pkorr.=0.009) und Träger des "composite" Genotyps (rs1800587+rs1143634) (pkorr.=0.031) hatten aber ein zweifach höheres Risiko für eine subgingivale Besiedelung mit *A.actinomycetemcomitans*. Mit logistischer Regression (forward stepwise) und unter Berücksichtigung der parodontalen Kofaktoren Alter, Geschlecht, Rauchen und approximaler Plaqueindex konnten diese signifikante Assoziationen bestätigt werden.

	<b>Chronische Parodontitis (CP)</b>	<b>Aggressive Parodontitis (AP)</b>	<b>Parodontitisfreie Kontrollen</b>	<b>p Werte vs. Kontrollen</b>	
	<b>n = 73</b>	<b>n = 86</b>	<b>n = 89</b>	<b>CP</b>	<b>AP</b>
Durchschnittsalter (Jahre)	49.1 ± 9.4	40.4 ± 9.8	46.2 ± 10.8	n.s.	< 0.001
Geschlecht (% weibl.)	63.0	64.0	53.3	n.s.	n.s.
Raucher	23.6	34.9	21.3	n.s.	n.s.
Approximaler Plaqueindex (%)	62.0 ± 25.6	53.3 ± 28.7	47.2 ± 21.4	< 0.001	n.s.
Blutung auf Sondierung (%)	70.6 ± 24.7	78.7 ± 23.2	45.2 ± 23.9	< 0.001	< 0.001
Sondiertiefe (mm)	5.3 ± 1.3	5.7 ± 1.4	2.6 ± 0.7	< 0.001	< 0.001
Clinischer Attachmentverlust (CAL in mm)	6.0 ± 1.5	6.5 ± 1.5	3.0 ± 0.8	< 0.001	< 0.001
Zähne mit CAL 4-6 mm (%)	45.8	39.5	3.4	< 0.001	< 0.001
Zähne mit CAL > 6 mm (%)	44.4	57.0	1.1	< 0.001	< 0.001
Frühzeitiger Zahnverlust durch Parodontitis bei Verwandten	40.9	57.0	9.1	< 0.001	< 0.001

Tab. 1: Klinische und demographische Charakterisierung der Probandengruppen

	<b>Chronische Parodontitis (CP)</b>	<b>Aggressive Parodontitis (AP)</b>	<b>Parodontitisfreie Kontrollen</b>	<b>p Werte vs. Kontrollen</b>	
	<b>n = 73</b>	<b>n = 86</b>	<b>n = 89</b>	<b>CP</b>	<b>AP</b>
Aggregatibacter actinomycetemcomitans (%)	34.2	40.7	18.0	n.s.	0.001
Porphyromonas gingivalis (%)	87.7	76.7	22.5	< 0.001	< 0.001
Prevotella intermedia (%)	61.6	61.6	31.5	< 0.001	< 0.001
Tannerella forsythia (%)	97.3	86.0	68.5	< 0.001	0.005
Treponema denticola (%)	98.6	86.0	62.9	< 0.001	0.002
Pg, Td, Tf (%)	83.6	69.8	22.5	< 0.001	< 0.001

Tab. 2: Mikrobiologische Untersuchungen der Probandengruppen

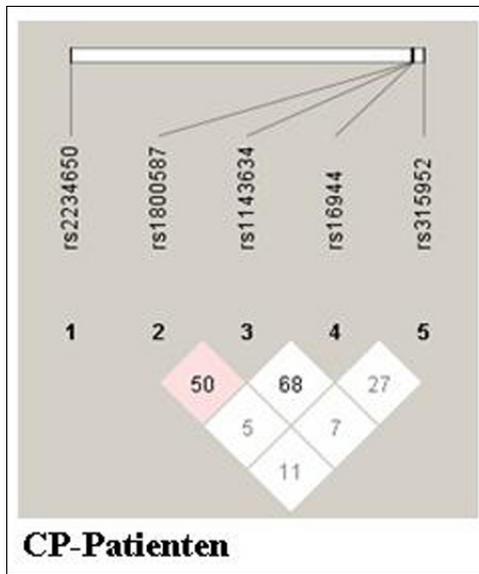
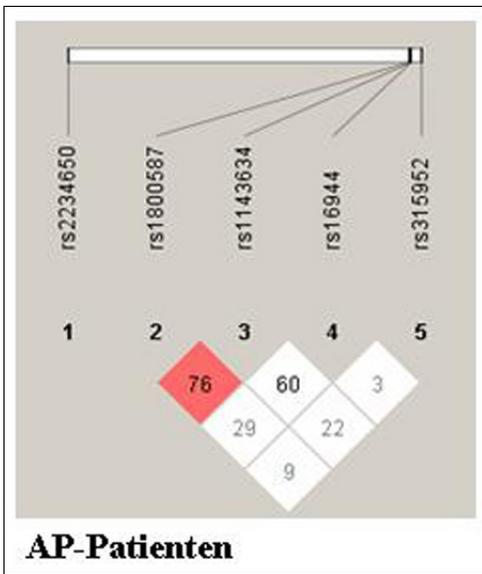


Abb. 3a-b : Genetische Untersuchungen: Haplotyp-Blockstruktur (Software: Haploview 4.2)

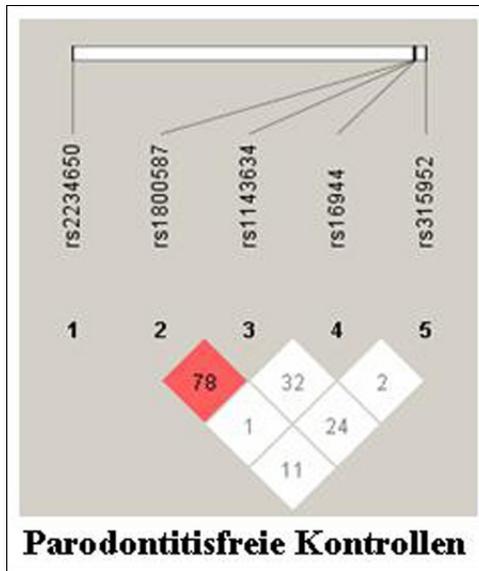
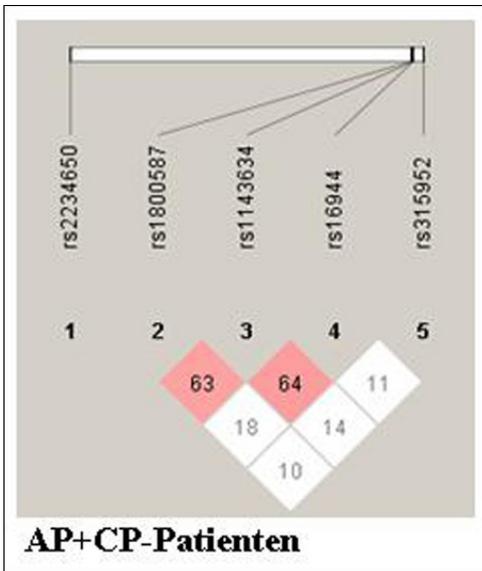


Abb. 3c-d: Genetische Untersuchungen: Haplotyp-Blockstruktur (Software: Haploview 4.2)

Die SNPs rs1800587 und rs 1143634 befinden sich in allen Probandengruppen in einem starken "linkage disequilibrium" (LOD > 10). Diese Daten sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Komman et al. (1997).

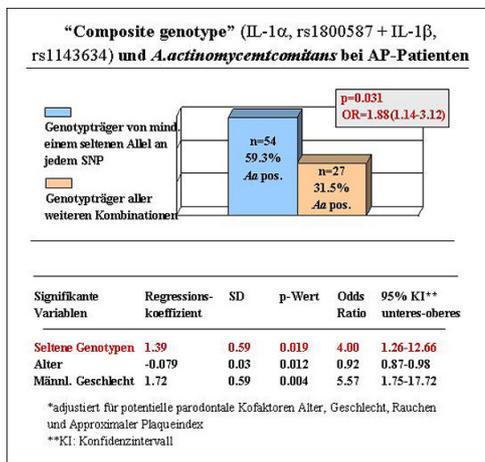


Abb. 4: Genetische Untersuchungen: "Composite genotype" (IL-1a, rs1800587 + IL-1b, rs1143634) und *A.actinomycentcomitans* bei AP-Patienten

	AP (n = 86)	CP (n = 73)	Parodontitisfreie Kontrollen (n = 89)
IL-1 $\alpha$ : rs1800587			
CC (%)	54.1	50.0	49.4
CT+CC (%)	45.9	50.0	50.6
IL-1 $\beta$ : rs16944			
CC (%)	43.0	43.8	40.4
CT+CC (%)	57.0	56.2	59.6
IL-1 $\beta$ : rs1143634			
CC (%)	62.2	61.1	56.8
CT+CC (%)	37.8	38.9	43.2
IL-1R: rs2234650			
CC (%)	48.8	42.5	46.1
CT+CC (%)	51.2	57.5	53.9
IL-1RA: rs315952			
CC (%)	45.3	46.6	40.9
CT+CC (%)	54.7	53.4	59.1
"Composite genotyp": IL-1 $\alpha$ : rs1800587 + IL-1 $\beta$ : rs1143634			
Genotypträger von mindestens einem seltenen Allel an jedem SNP (%)	66.7	69.0	59.1
Genotypträger aller weiteren Kombinationen (%)	33.3	31.0	40.9

Tab. 3: Genetische Untersuchungen: Genotype and allele distribution of polymorphisms in IL-1 gene cluster in dependence on the occurrence of AP and CP

## Schlußfolgerungen

Obwohl Polymorphismen in den Genen für IL-1a und IL-1b mit dem Auftreten von *A. actinomycentcomitans* assoziiert waren, konnten sie weder in bivariaten noch in multivariaten Analysen als Risikoindikatoren für Parodontitis bestätigt werden.

Dieses Poster wurde übermittelt von Dr. Susanne Schulz.

**Poster Faksimile:**

ssusanne.schulz@medizin.uni-halle.de, DGP-Jahrestagung, Baden-Baden 2011, Poster P-04-006, Mikrobiologie und Diagnostik

**II-1 Gencluster und das Auftreten von *A. actinomycetemcomitans* bei aggressiver Parodontitis**

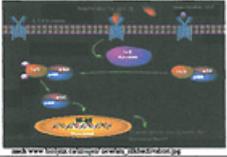


S Schulz<sup>1</sup>, J Stein<sup>2</sup>, C Gläser<sup>3</sup>, HG Schaller<sup>1</sup>, S Reichert<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Poliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
<sup>2</sup> Klinik für Zahnerhaltung und Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde, RWTH Aachen  
<sup>3</sup> Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg

**Einleitung**

Signaltransduktionsweg vermittelt durch Gene des II-1 Clusters (II-1a, II-1b, II-1c, II-1RA)



IL-1a und 1b, sowie der II-1 Rezeptor (IL-1R) und der Rezeptorantagonist (IL-1RAc1) sind wichtige Faktoren im Rahmen der wirtspezifischen Immunantwort auf Parodontopathogenen.

Funktionell bedeutsame genetische Variationen im Gen des II-1 Clusters wurden identifiziert und deren Rolle im Rahmen der Pathogenese der Parodontitis beschrieben. Die Ergebnisse sind jedoch widersprüchlich.

Als entscheidender Auslöser endotoxischer Parodontitis wird die ungleiche Besiedlung mit parodontopathogenen Keimen angesehen. Im Rahmen der Erkrankung spielt die wirtspezifische Immunantwort eine zentrale Rolle. Diese wird u.a. durch eine genetische Prädisposition beeinflusst.

Gene des II-1 Clusters beschreiben eine Vielzahl von verwandten Zellen (insbesondere T-Helfer-zellen, Makrophagen, T3-Zellen, B-Zellen), deren Besiedlung bei der Manifestation und Progression von endotoxischen Parodontitisen ausführlich beschrieben wurde.

Funktionell wichtige Polymorphismen (SNPs) wurden für IL-1a (rs180997), IL-1b (rs16944, rs10434), IL-1R (rs2234669), IL-1RAc1 (rs119952) identifiziert. Kerimov et al. (1997) postuliert einen parodontitisassoziierten „composite genotype“ der sich aus den seltenen Genotypen der SNPs rs180997 (IL-1a) und rs10434 (IL-1b) zusammensetzt.

→ Das Ziel dieser Studie bestand darin die Bedeutung von SNPs an den o.g. Genorten für das Auftreten von Parodontitisen und ungleicher Keimbildung nach Adjustierung für etablierte parodontale Faktoren zu bestimmen.

**Material und Methoden**

**Einschlusskriterien der Patienten**

**Generalisierte aggressive Parodontitis (AP):**  
 n=44  
 Zahnarztanamnese vor dem 31. Lebensjahr  
 Altschmelzverlust: 4mm an mindestens 30% der Zähne  
 ≥ 3 Interdienten Zellen, keine kariöse oder sonst kariöse  
 Mundschleimhäute zwischen Menge interdentärer Plaque und Altschmelzverlust  
**Generalisierte chronische Parodontitis (CP):**  
 n=73  
 Altschmelzverlust: 4mm an mindestens 30% der Zähne  
**Parodontitäre Kontrollprobanden:**  
 n=49  
 Zahnfleisch ≤ 3 mm  
 Keine Altschmelzverlust durch Parodontitis (Gummatome, Altschmelzverlust  
 infolge orthodontischer Restaktionen, primär endodontische Leiden  
 Parodontitis)

**Genomische Untersuchungen**

**DNA-Isolation**  
 Die DNA-Präparation der genomischen DNA aus buccalen swabsen EDTA-Slurrie erfolgte mittels „blood extraction kit“ (Qiagen, Erlangen, 2006).  
 200 µl EDTA-Slurrie wurde zur Zellyse mit 30 µl Proteinase K  
 nach der Zugabe von 200 µl 1x-lysozyme AL wurde die Probe 12 min gerührt und für 10 min bei 56°C inkubiert.  
 300 µl Ethanol wurde zugegeben, der Ansatz gerührt und mit einer Spinne (Qiagen Spin Column) getrennt.  
 Nach 30minigen Waschen (Puffer AW1 und AW2) der in die Spinne gebundenen DNA wurde die DNA durch Zentrifugieren getrennt.  
 Die DNA wurde mit 200 µl spgns dest. Isolat inkubiert und von der Spinne gelöst.  
**PCR mittels sequenzspezifischer Primer**  
 Die Genotypisierung der Gene des II-1 Clusters erfolgte mit Hilfe der „CYTOGENETIC Overlaying using CTS-PCR-SSP Typing“ der  
 „Cellular DNA Typing“, Department of Transplantation Immunology of the University Clinic of Heidelberg.  
 In jeder PCR wurde ein 440bp-Fragment des humanen XPD-T-locus als Polymorphismus kontrolliert.  
 Die PCR wurde mit einem sequenzspezifischen Primer durchgeführt, der die Sequenz der entsprechenden SNPs, die Primer waren in  
 5'-end-gerichtete 56-96-111-117-121-125-129-133-137-141-145-149-153-157-161-165-169-173-177-181-185-189-193-197-201-205-209-213-217-221-225-229-233-237-241-245-249-253-257-261-265-269-273-277-281-285-289-293-297-301-305-309-313-317-321-325-329-333-337-341-345-349-353-357-361-365-369-373-377-381-385-389-393-397-401-405-409-413-417-421-425-429-433-437-441-445-449-453-457-461-465-469-473-477-481-485-489-493-497-501-505-509-513-517-521-525-529-533-537-541-545-549-553-557-561-565-569-573-577-581-585-589-593-597-601-605-609-613-617-621-625-629-633-637-641-645-649-653-657-661-665-669-673-677-681-685-689-693-697-701-705-709-713-717-721-725-729-733-737-741-745-749-753-757-761-765-769-773-777-781-785-789-793-797-801-805-809-813-817-821-825-829-833-837-841-845-849-853-857-861-865-869-873-877-881-885-889-893-897-901-905-909-913-917-921-925-929-933-937-941-945-949-953-957-961-965-969-973-977-981-985-989-993-997-1001-1005-1009-1013-1017-1021-1025-1029-1033-1037-1041-1045-1049-1053-1057-1061-1065-1069-1073-1077-1081-1085-1089-1093-1097-1101-1105-1109-1113-1117-1121-1125-1129-1133-1137-1141-1145-1149-1153-1157-1161-1165-1169-1173-1177-1181-1185-1189-1193-1197-1201-1205-1209-1213-1217-1221-1225-1229-1233-1237-1241-1245-1249-1253-1257-1261-1265-1269-1273-1277-1281-1285-1289-1293-1297-1301-1305-1309-1313-1317-1321-1325-1329-1333-1337-1341-1345-1349-1353-1357-1361-1365-1369-1373-1377-1381-1385-1389-1393-1397-1401-1405-1409-1413-1417-1421-1425-1429-1433-1437-1441-1445-1449-1453-1457-1461-1465-1469-1473-1477-1481-1485-1489-1493-1497-1501-1505-1509-1513-1517-1521-1525-1529-1533-1537-1541-1545-1549-1553-1557-1561-1565-1569-1573-1577-1581-1585-1589-1593-1597-1601-1605-1609-1613-1617-1621-1625-1629-1633-1637-1641-1645-1649-1653-1657-1661-1665-1669-1673-1677-1681-1685-1689-1693-1697-1701-1705-1709-1713-1717-1721-1725-1729-1733-1737-1741-1745-1749-1753-1757-1761-1765-1769-1773-1777-1781-1785-1789-1793-1797-1801-1805-1809-1813-1817-1821-1825-1829-1833-1837-1841-1845-1849-1853-1857-1861-1865-1869-1873-1877-1881-1885-1889-1893-1897-1901-1905-1909-1913-1917-1921-1925-1929-1933-1937-1941-1945-1949-1953-1957-1961-1965-1969-1973-1977-1981-1985-1989-1993-1997-2001-2005-2009-2013-2017-2021-2025-2029-2033-2037-2041-2045-2049-2053-2057-2061-2065-2069-2073-2077-2081-2085-2089-2093-2097-2101-2105-2109-2113-2117-2121-2125-2129-2133-2137-2141-2145-2149-2153-2157-2161-2165-2169-2173-2177-2181-2185-2189-2193-2197-2201-2205-2209-2213-2217-2221-2225-2229-2233-2237-2241-2245-2249-2253-2257-2261-2265-2269-2273-2277-2281-2285-2289-2293-2297-2301-2305-2309-2313-2317-2321-2325-2329-2333-2337-2341-2345-2349-2353-2357-2361-2365-2369-2373-2377-2381-2385-2389-2393-2397-2401-2405-2409-2413-2417-2421-2425-2429-2433-2437-2441-2445-2449-2453-2457-2461-2465-2469-2473-2477-2481-2485-2489-2493-2497-2501-2505-2509-2513-2517-2521-2525-2529-2533-2537-2541-2545-2549-2553-2557-2561-2565-2569-2573-2577-2581-2585-2589-2593-2597-2601-2605-2609-2613-2617-2621-2625-2629-2633-2637-2641-2645-2649-2653-2657-2661-2665-2669-2673-2677-2681-2685-2689-2693-2697-2701-2705-2709-2713-2717-2721-2725-2729-2733-2737-2741-2745-2749-2753-2757-2761-2765-2769-2773-2777-2781-2785-2789-2793-2797-2801-2805-2809-2813-2817-2821-2825-2829-2833-2837-2841-2845-2849-2853-2857-2861-2865-2869-2873-2877-2881-2885-2889-2893-2897-2901-2905-2909-2913-2917-2921-2925-2929-2933-2937-2941-2945-2949-2953-2957-2961-2965-2969-2973-2977-2981-2985-2989-2993-2997-3001-3005-3009-3013-3017-3021-3025-3029-3033-3037-3041-3045-3049-3053-3057-3061-3065-3069-3073-3077-3081-3085-3089-3093-3097-3101-3105-3109-3113-3117-3121-3125-3129-3133-3137-3141-3145-3149-3153-3157-3161-3165-3169-3173-3177-3181-3185-3189-3193-3197-3201-3205-3209-3213-3217-3221-3225-3229-3233-3237-3241-3245-3249-3253-3257-3261-3265-3269-3273-3277-3281-3285-3289-3293-3297-3301-3305-3309-3313-3317-3321-3325-3329-3333-3337-3341-3345-3349-3353-3357-3361-3365-3369-3373-3377-3381-3385-3389-3393-3397-3401-3405-3409-3413-3417-3421-3425-3429-3433-3437-3441-3445-3449-3453-3457-3461-3465-3469-3473-3477-3481-3485-3489-3493-3497-3501-3505-3509-3513-3517-3521-3525-3529-3533-3537-3541-3545-3549-3553-3557-3561-3565-3569-3573-3577-3581-3585-3589-3593-3597-3601-3605-3609-3613-3617-3621-3625-3629-3633-3637-3641-3645-3649-3653-3657-3661-3665-3669-3673-3677-3681-3685-3689-3693-3697-3701-3705-3709-3713-3717-3721-3725-3729-3733-3737-3741-3745-3749-3753-3757-3761-3765-3769-3773-3777-3781-3785-3789-3793-3797-3801-3805-3809-3813-3817-3821-3825-3829-3833-3837-3841-3845-3849-3853-3857-3861-3865-3869-3873-3877-3881-3885-3889-3893-3897-3901-3905-3909-3913-3917-3921-3925-3929-3933-3937-3941-3945-3949-3953-3957-3961-3965-3969-3973-3977-3981-3985-3989-3993-3997-4001-4005-4009-4013-4017-4021-4025-4029-4033-4037-4041-4045-4049-4053-4057-4061-4065-4069-4073-4077-4081-4085-4089-4093-4097-4101-4105-4109-4113-4117-4121-4125-4129-4133-4137-4141-4145-4149-4153-4157-4161-4165-4169-4173-4177-4181-4185-4189-4193-4197-4201-4205-4209-4213-4217-4221-4225-4229-4233-4237-4241-4245-4249-4253-4257-4261-4265-4269-4273-4277-4281-4285-4289-4293-4297-4301-4305-4309-4313-4317-4321-4325-4329-4333-4337-4341-4345-4349-4353-4357-4361-4365-4369-4373-4377-4381-4385-4389-4393-4397-4401-4405-4409-4413-4417-4421-4425-4429-4433-4437-4441-4445-4449-4453-4457-4461-4465-4469-4473-4477-4481-4485-4489-4493-4497-4501-4505-4509-4513-4517-4521-4525-4529-4533-4537-4541-4545-4549-4553-4557-4561-4565-4569-4573-4577-4581-4585-4589-4593-4597-4601-4605-4609-4613-4617-4621-4625-4629-4633-4637-4641-4645-4649-4653-4657-4661-4665-4669-4673-4677-4681-4685-4689-4693-4697-4701-4705-4709-4713-4717-4721-4725-4729-4733-4737-4741-4745-4749-4753-4757-4761-4765-4769-4773-4777-4781-4785-4789-4793-4797-4801-4805-4809-4813-4817-4821-4825-4829-4833-4837-4841-4845-4849-4853-4857-4861-4865-4869-4873-4877-4881-4885-4889-4893-4897-4901-4905-4909-4913-4917-4921-4925-4929-4933-4937-4941-4945-4949-4953-4957-4961-4965-4969-4973-4977-4981-4985-4989-4993-4997-5001-5005-5009-5013-5017-5021-5025-5029-5033-5037-5041-5045-5049-5053-5057-5061-5065-5069-5073-5077-5081-5085-5089-5093-5097-5101-5105-5109-5113-5117-5121-5125-5129-5133-5137-5141-5145-5149-5153-5157-5161-5165-5169-5173-5177-5181-5185-5189-5193-5197-5201-5205-5209-5213-5217-5221-5225-5229-5233-5237-5241-5245-5249-5253-5257-5261-5265-5269-5273-5277-5281-5285-5289-5293-5297-5301-5305-5309-5313-5317-5321-5325-5329-5333-5337-5341-5345-5349-5353-5357-5361-5365-5369-5373-5377-5381-5385-5389-5393-5397-5401-5405-5409-5413-5417-5421-5425-5429-5433-5437-5441-5445-5449-5453-5457-5461-5465-5469-5473-5477-5481-5485-5489-5493-5497-5501-5505-5509-5513-5517-5521-5525-5529-5533-5537-5541-5545-5549-5553-5557-5561-5565-5569-5573-5577-5581-5585-5589-5593-5597-5601-5605-5609-5613-5617-5621-5625-5629-5633-5637-5641-5645-5649-5653-5657-5661-5665-5669-5673-5677-5681-5685-5689-5693-5697-5701-5705-5709-5713-5717-5721-5725-5729-5733-5737-5741-5745-5749-5753-5757-5761-5765-5769-5773-5777-5781-5785-5789-5793-5797-5801-5805-5809-5813-5817-5821-5825-5829-5833-5837-5841-5845-5849-5853-5857-5861-5865-5869-5873-5877-5881-5885-5889-5893-5897-5901-5905-5909-5913-5917-5921-5925-5929-5933-5937-5941-5945-5949-5953-5957-5961-5965-5969-5973-5977-5981-5985-5989-5993-5997-6001-6005-6009-6013-6017-6021-6025-6029-6033-6037-6041-6045-6049-6053-6057-6061-6065-6069-6073-6077-6081-6085-6089-6093-6097-6101-6105-6109-6113-6117-6121-6125-6129-6133-6137-6141-6145-6149-6153-6157-6161-6165-6169-6173-6177-6181-6185-6189-6193-6197-6201-6205-6209-6213-6217-6221-6225-6229-6233-6237-6241-6245-6249-6253-6257-6261-6265-6269-6273-6277-6281-6285-6289-6293-6297-6301-6305-6309-6313-6317-6321-6325-6329-6333-6337-6341-6345-6349-6353-6357-6361-6365-6369-6373-6377-6381-6385-6389-6393-6397-6401-6405-6409-6413-6417-6421-6425-6429-6433-6437-6441-6445-6449-6453-6457-6461-6465-6469-6473-6477-6481-6485-6489-6493-6497-6501-6505-6509-6513-6517-6521-6525-6529-6533-6537-6541-6545-6549-6553-6557-6561-6565-6569-6573-6577-6581-6585-6589-6593-6597-6601-6605-6609-6613-6617-6621-6625-6629-6633-6637-6641-6645-6649-6653-6657-6661-6665-6669-6673-6677-6681-6685-6689-6693-6697-6701-6705-6709-6713-6717-6721-6725-6729-6733-6737-6741-6745-6749-6753-6757-6761-6765-6769-6773-6777-6781-6785-6789-6793-6797-6801-6805-6809-6813-6817-6821-6825-6829-6833-6837-6841-6845-6849-6853-6857-6861-6865-6869-6873-6877-6881-6885-6889-6893-6897-6901-6905-6909-6913-6917-6921-6925-6929-6933-6937-6941-6945-6949-6953-6957-6961-6965-6969-6973-6977-6981-6985-6989-6993-6997-7001-7005-7009-7013-7017-7021-7025-7029-7033-7037-7041-7045-7049-7053-7057-7061-7065-7069-7073-7077-7081-7085-7089-7093-7097-7101-7105-7109-7113-7117-7121-7125-7129-7133-7137-7141-7145-7149-7153-7157-7161-7165-7169-7173-7177-7181-7185-7189-7193-7197-7201-7205-7209-7213-7217-7221-7225-7229-7233-7237-7241-7245-7249-7253-7257-7261-7265-7269-7273-7277-7281-7285-7289-7293-7297-7301-7305-7309-7313-7317-7321-7325-7329-7333-7337-7341-7345-7349-7353-7357-7361-7365-7369-7373-7377-7381-7385-7389-7393-7397-7401-7405-7409-7413-7417-7421-7425-7429-7433-7437-7441-7445-7449-7453-7457-7461-7465-7469-7473-7477-7481-7485-7489-7493-7497-7501-7505-7509-7513-7517-7521-7525-7529-7533-7537-7541-7545-7549-7553-7557-7561-7565-7569-7573-7577-7581-7585-7589-7593-7597-7601-7605-7609-7613-7617-7621-7625-7629-7633-7637-7641-7645-7649-7653-7657-7661-7665-7669-7673-7677-7681-7685-7689-7693-7697-7701-7705-7709-7713-7717-7721-7725-7729-7733-7737-7741-7745-7749-7753-7757-7761-7765-7769-7773-7777-7781-7785-7789-7793-7797-7801-7805-7809-7813-7817-7821-7825-7829-7833-7837-7841-7845-7849-7853-7857-7861-7865-7869-7873-7877-7881-7885-7889-7893-7897-7901-7905-7909-7913-7917-7921-7925-7929-7933-7937-7941-7945-7949-7953-7957-7961-7965-7969-7973-7977-7981-7985-7989-7993-7997-8001-8005-8009-8013-8017-8021-8025-8029-8033-8037-8041-8045-8049-8053-8057-8061-8065-8069-8073-8077-8081-8085-8089-8093-8097-8101-8105-8109-8113-8117-8121-8125-8129-8133-8137-8141-8145-8149-8153-8157-8161-8165-8169-8173-8177-8181-8185-8189-8193-8197-8201-8205-8209-8213-8217-8221-8225-8229-8233-8237-8241-8245-8249-8253-8257-8261-8265-8269-8273-8277-8281-8285-8289-8293-8297-8301-8305-8309-8313-8317-8321-8325-83