

**Aus der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

(Direktor: Prof. Dr. H.-G. Schaller)

**Assoziationen der HLA-Merkmale A, B, Cw, DR und DQ zur aggressiven und
chronischen Parodontitis sowie zu parodontalen Leitkeimen**

H a b i l i t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent. habil.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dr. Stefan Karl Reichert
geboren am 10. Juni 1962 in Stralsund

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dagmar Barz
2. Prof. Dr. Christof Dörfer
3. Prof. Dr. Detlef Heidemann

Tag der Verteidigung: 22.09.2009 Beschlussdatum: 20.10.2009

Für Hannchen und Arno

Referat und bibliografische Beschreibung

HLA-Moleküle könnten die individuelle Wirtsabwehr bei einer Infektion des Parodonts beschränken, denn die T-lymphozytäre Antigenerkennung erfolgt erst nach Bindungprozessierter antigener Peptide an die hochpolymorphe Peptidbindungsregion der HLA-Moleküle. Das Ziel dieser Studie war deshalb, die Phänotypfrequenzen von HLA-A, -B, -Cw, -DR und -DQ Merkmalen bei aggressiver (N = 50) und chronischer Parodontitis (N = 102) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Parodontitis (N = 102) mit serologischer (MLCT) und molekularbiologischer Methode (PCR-SSP) zu bestimmen und mögliche Unterschiede zu diskutieren. Eine Gruppe von 157 Gelegenheitsblutspendern diente der Repräsentation der HLA-Normalverteilung innerhalb der Population. In einer weiteren Parodontitisgruppe (AP + CP, N = 68) sollte dann überprüft werden, ob bestimmte HLA-Merkmale mit dem molekularbiologischem Nachweis (PCR-SSO) von fünf parodontalen Markerkeimen (A.a., P.g., P.i., T.f., T.d.) assoziiert waren.

Bei aggressiver Parodontitis waren die Merkmale HLA-A*29 und HLA-DRB1*13 im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant häufiger, während HLA-DRBblank* und HLA-A*30+*31 vermindert bzw. nicht nachgewiesen wurden. Positiv zur CP waren die Merkmale HLA-A*11, -A*33 und -Cw*08:B*14 assoziiert, während HLA-A*03 seltener vorkam. Einige HLA-Assoziationen wiesen eine Geschlechtsabhängigkeit auf, wurden nur bei homozygotem Vorkommen auffällig bzw. beruhten auf Assoziationen von rechnerisch bestimmten HLA-Kombinationen zur Parodontitis. Bestimmte HLA-Merkmale und -Kombinationen waren mit erhöhtem bzw. vermindertem Risiko für eine Infektion mit einem der fünf Leitkeime assoziiert. Herauszustellen ist dabei die Assoziation des auch bei selektivem IgA-Mangel auffälligen Haplotyps HLA-B*08:Cw*07:DRB1*03:DRB3*:DQB1*02 zum Nachweis von A.a..

Die Ergebnisse dieser Studie weisen auf einen möglichen Einfluss von bestimmten HLA-Merkmalen oder HLA-Kombinationen auf die Pathogenese der Parodontitis hin. Der Mechanismus der HLA-Assoziation zur Parodontitis ist jedoch unbekannt. Die HLA-Assoziationen zu parodontalen Leitkeimen und die Definition von HLA-Ankerpositionen für das immundominante Peptid Ag 53 P.g., die noch durch Bindungstests bestätigt werden müssen, deuten auf eine HLA-abhängige antibakterielle Immunantwort bei Parodontitis hin. Aufgrund ungenügender Assoziationsstärke von auffälligen HLA-Markern zur Parodontitis ist die HLA-Typisierung zur Identifikation von parodontalen Risikopatienten nach heutigem Kenntnisstand noch nicht geeignet. Studien zur Bestimmung von immundominanten und protektiven Peptiden und ihre Bindung an HLA-Moleküle wären zum Verständnis der Immunabwehr bei Parodontitis sinnvoll und könnten für die Entwicklung neuer Therapiestrategien von Bedeutung sein.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Die aggressive Parodontitis (AP)	1
1.1.1. Definition und klinisches Bild der AP	1
1.1.2. Epidemiologie der AP	2
1.1.3. Ätiologische Faktoren der AP	3
1.1.4. Immunologische Aspekte der Wirtsanfälligkeit bei AP	4
1.2. Die chronische Parodontitis (CP)	5
1.2.1. Definition und klinisches Bild der CP	5
1.2.2. Epidemiologie der CP	5
1.2.3. Ätiologische Faktoren der CP	7
1.3. Genetische Aspekte der chronischen und aggressiven Parodontitis	7
1.4. Der Haupthistokompatibilitätskomplex des Menschen	11
1.4.1. Der HLA-Genkomplex	12
1.4.2. Molekülstruktur und Funktion von HLA-Klasse I- und II-Merkmalen	14
1.4.3. Nomenklatur des HLA-Systems	17
1.5. HLA und Krankheit	18
1.5.1. HLA und Parodontitis	20
2. Zielstellung	23
3. Material und Methode	24
3.1. Patienten mit Parodontitis und Kontrollprobanden	24
3.2. Parodontitispatienten mit Nachweis von fünf parodontalen Markerkeimen	27
3.3. Methodik der HLA-Klasse I- und II-Typisierung	28
3.3.1. Serologische Typisierung der HLA-A, -B und -Cw Merkmale	28
3.3.2. Molekularbiologischer Nachweis von HLA-A, -B, -Cw, -DRB1, -DRB3/4/5 und -DQ	30
3.3.2.1. Prinzip der molekularbiologischen HLA-Typisierung	30
3.3.2.2. Isolierung der Ausgangs-DNA	31
3.3.2.3. Durchführung der PCR-Amplifikation mit sequenzspezifischen Primern	32
3.3.2.4. Nachweis der Amplifikate mit der Gelelektrophorese	33
3.3.2.5. Differenzierungsgrad der HLA-Typisierung	34
3.4. Statistische Methoden	35
3.4.1. Demografische und klinische Daten	35
3.4.2. Auswertung der HLA-Typisierungsergebnisse	35
3.4.3. HLA-Assoziationen zu parodontalen Leitkeimen	37

	Seite
4. Ergebnisse	38
4.1. Demografische und klinische Daten bei Parodontitispatienten	38
4.2. Auffällige HLA-Klasse I- und II-Merkmale bei AP	39
4.2.1. Geschlechtsunterschiede bei AP	40
4.3. Auffällige HLA-Klasse I- und II-Merkmale bei CP	41
4.3.1. Geschlechtsunterschiede bei CP	42
4.4. Auffällige HLA-Klasse I- und II-Merkmale in einer Gesamtparodontitisgruppe (AP + CP)	44
4.4.1. Geschlechtsabhängige HLA-Phänotypfrequenzen in der Gesamtparodontitisgruppe	44
4.5. Zusammenfassung auffälliger HLA-Einzelmerkmale	46
4.6. HLA-Homozygotien und –Kombinationen bei AP und CP	47
4.6.1. Aggressive Parodontitis	47
4.6.2. Chronische Parodontitis	48
4.7. Assoziationen von HLA zu parodontalen Leitkeimen	51
4.7.1. Assoziationen zu <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> (A.a.)	53
4.7.2. Assoziationen zu <i>Porphyromonas gingivalis</i> (P.g.)	55
4.7.3. Assoziationen zu <i>Prevotella intermedia</i> (P.i.)	55
4.7.4. Assoziationen zu <i>Tannerella forsythensis</i> (T.f.)	57
4.7.5. Assoziationen zum „Roten Komplex“	57
4.8. Zusammenfassung der Assoziationen von HLA zu parodontalen Leitkeimen	58
5. Diskussion	59
5.1. Parodontitispatienten und Kontrollgruppen	59
5.2. Vergleich der Ergebnisse zu kaukasischen Studienkohorten	60
5.3. Vergleich der Ergebnisse zu nicht kaukasischen Studiengruppen	63
5.4. Bisher nicht beschriebene HLA-Assoziationen zur Parodontitis	66
5.5. Relation von HLA zu parodontalen Markerkeimen	68
6. Schlussfolgerungen	71
7. Zusammenfassung	72
8. Literaturverzeichnis	75
9. Anlagen	91

	Seite
10. Thesen	95
11. Lebenslauf	98
12. Eidesstattliche Erklärung	99
13. Danksagung	100

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

A	Adenin
A.a.	Actinobacillus actinomycetemcomitans
AdP	Erwachsenenparodontitis (adulte Parodontitis)
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
AP	aggressive Parodontitis
API	approximaler Plaqueindex
ATP	Adenosin-Triphosphat
B.f.	Bacteroides forsythus
BOP	Blutung auf Sondierung (bleeding on probing)
C	Cytosin
C5a	Komplementfaktor 5a
CAL	klinischer Attachmentverlust
CD	cluster of differentiation
CDC	komplementabhängige Zytotoxizität
CLIP	class-II-associated invariant chain peptide
CP	chronische Parodontitis
CPI	Community Periodontal Index
DGP	Deutsche Gesellschaft für Parodontologie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EBV	Epstein-Barr Virus
EOP	frühbeginnende Parodontitis (early-onset periodontitis)
ER	endoplasmatisches Retikulum
FMLP	Formyl-Methionyl-Leukyl-Phenylalanin
F.n.	Fusobacterium nucleatum
G	Guanin
G-EOP	generalisierte frühbeginnende Parodontitis (generalized early-onset periodontitis)
gf	Genotypfrequenz
GJP	generalisierte juvenile Parodontitis (generalized juvenile periodontitis)
GP110	G-Protein 110
HCMV	humanes Cytomegalovirus
Hcrtr2	Hypocretin-2-Rezeptor
HLA	humanes Leukozytenantigen (human leukocyte antigene)
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSP	Hitzeschockprotein
IDZ	Institut der Deutschen Zahnärzte

Ig	Immunglobulin
IgAD	selektive IgA-Defizienz
IL	Interleukin
IF	Interferon
IP	Intronpolymorphismus
JIA	juvenile idiopathische Arthritis
JP	juvenile Parodontitis
KD	Kilodalton
KIR	NK-Zell-Inhibitor-Rezeptor
L-EOP	lokalisierte frühbeginnende Parodontitis (localized early-onset periodontitis)
LJP	lokalisierte juvenile Parodontitis
LMP	large multifunctional proteasome
MIIC	MHC class II-compartment
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MLCT	Mikrolymphozytotoxizitätstest (microdroplet lymphocytotoxicity test)
n.s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NK	natürliche Killerzellen
NP	Kontrollpatienten ohne Parodontitis (no periodontitis)
n.s.	nicht signifikant
OD	optische Dichte
OR	Kreuzprodukt (odds ratio)
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PCR-SSO	PCR mit sequenzspezifischen Oligonucleotiden
PCR-SSP	PCR mit sequenzspezifischen Primern
PD	Taschentiefe (pocket depth)
P.g.	Porphyromonas gingivalis
PGAD	Polyglandular autoimmune disease
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PHA	Phythämagglutinine
pf	Phänotypfrequenz
P.i.	Prevotella intermedia
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PP	Promotorpolymorphismus
PPP	präpubertäre Parodontitis
RA	Rheumatoidarthritis

RCLB	red cell lysis buffer
RF	Rheumafaktor
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RPP	rapid progressive Parodontitis
RR	relatives Risiko
SBI	Sulkusblutungsindex
SILR	soluble interleucin receptor
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
T	Thymin
T _H	T Helferzelle
TAP	transporter associated with antigen processing
TCR	T-Lymphozyten-Rezeptor
T.d.	Treponema denticola
T.f.	Tannerella forsythensis
TNF	Tumornekrosefaktor

1. Einleitung

Die Kenntnisse über die Ätiologie der Parodontitis haben sich in den letzten 20 Jahren erheblich erweitert. Ging man ausschließlich von einer bakteriellen Ursache der Erkrankung aus, so weiß man heute, dass bestimmte weitere Risikofaktoren wie Diabetes mellitus Typ I und II, Nikotinkonsum, negativer Stress und sozioökonomische Faktoren Entstehung und Ausprägung parodontaler Erkrankungen beeinflussen können. Genetische Erkrankungen, die mit aggressiver Parodontitis bereits im Milchgebiss einhergehen, das im Vergleich zur Bevölkerung überproportional häufigere Vorkommen verschiedener Formen der aggressiven Parodontitis in einer Familie und die hinsichtlich klinischer Befunde bei chronischer Parodontitis höhere Konkordanzrate bei monozygoten im Vergleich zu dizygoten Zwillingspaaren könnten Hinweise darauf sein, dass genetische Faktoren die Empfindlichkeit für die Infektion mit bestimmten parodontopathogenen Bakterien und/oder die anschließende immunologische Wirtsreaktion beeinflussen könnten. Zur Evaluierung dieser Risiko- oder Resistenzfaktoren wurden u. a. auch Assoziationsstudien von HLA-Merkmalen zu verschiedenen Parodontitisformen durchgeführt. HLA-Moleküle dienen der Präsentationprozessierter bakterieller Peptide an den T-Zellrezeptor. Bedingt durch ihren außerordentlich hohen Polymorphismus könnten die Peptidbindung und nachfolgende Immunreaktion (T-Zellaktivierung) individuell unterschiedlich sein und somit auch Empfindlichkeit oder Resistenz für eine Parodontitis beeinflussen. Bisherige Studienergebnisse zu dieser Thematik sind teilweise inkonsistent. Es existiert bisher nur eine deutsche Studie mit serologischer Typisierungstechnik (*Marggraf et al. 1983*), die sich auf den Nachweis von HLA-Klasse I-Markern beschränkte. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit, die Verteilung der HLA-Merkmale A, B, Cw, DR und DQ bei deutschen Patienten mit chronischer (CP) und generalisierter aggressiver Parodontitis (AP) im Vergleich zu einer parodontitisfreien Kontrollgruppe zu bestimmen. Für signifikante Differenzen wurde das HLA abhängige individuelle Parodontitisrisiko bestimmt. Zusätzlich sollte in einer weiteren Parodontitisgruppe (AP + CP) untersucht werden, ob bestimmte HLA-Marker mit dem molekularbiologischen Nachweis von fünf parodontalen Markerkeimen assoziiert waren.

1.1. Die aggressive Parodontitis (AP)

1.1.1. Definition und klinisches Bild der AP

Aggressive Parodontitiden umfassen eine Gruppe von seltenen schweren Parodontitisformen, die durch relativ klare klinische Merkmale, ergänzt durch spezielle mikrobiologische Befunde, diagnostiziert werden können. Die Klassifizierung aggressiver Parodontitiden erfolgte in der Vergangenheit nicht einheitlich. So unterschied man unter Berücksichtigung des Eintrittsalters und Verteilung der parodontalen Läsionen zwischen präpubertärer Parodontitis (PPP),

lokalisierter juveniler Parodontitis (LJP), generalisierter juveniler Parodontitis (GJP) und rasch fortschreitender Parodontitis (RPP). Im englischen Sprachgebrauch wurde für die Begriffe GJP und RPP auch die Bezeichnung Generalized Early Onset Periodontitis (G-EOP) verwendet. Die aktuelle Klassifizierung der Parodontitisformen (*Armitage* 1999) berücksichtigt nicht mehr die Altersabhängigkeit, denn aggressive und chronische Parodontitis können, wenn auch mit unterschiedlicher Prävalenz, in jedem Lebensalter auftreten. Folgende Hauptmerkmale sind für die aggressive Parodontitis von Bedeutung (DGP Klassifikation der PAR-Erkrankungen 2002):

- Patient ist klinisch gesund

- rasch fortschreitende Gewebedestruktion

- auffällige familiäre Häufung

Als nicht durchgehend zu beobachtende Merkmale wurden ein Missverhältnis zwischen der Menge an bakteriellen Ablagerungen und dem Ausmaß der Gewebedestruktion, erhöhte Zahlen von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A.a.*) und in gewissen Populationen von *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) sowie eine abnormale Phagozytenfunktion bzw. ein hyperresponsiver Makrophagen-Phänotyp angeführt. Die lokalisierte aggressive Parodontitis unterscheidet sich hinsichtlich des Eintrittsalters, der betroffenen Zähne und dem Serumantikörpertiter gegen parodontopathogene Bakterien von der generalisierten Form. Bei der Diagnostik ist zu beachten, dass nicht alle Charakteristika notwendigerweise vorhanden sein müssen. Während der molekularbiologische Nachweis von parodontopathogenen Bakterien aufgrund angebotener Testkits und der Therapierelevanz etabliert ist, sind immunologische Verfahren zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen parodontale Bakterien nur selten verfügbar und deshalb für die Routinepraxis nicht geeignet.

Es ist nicht geklärt, ob die unterschiedlichen Formen der aggressiven Parodontitis phänotypische Variationen einer Erkrankung, verschiedene Stadien einer Erkrankung oder unterschiedliche Krankheitsbilder darstellen (*Tonetti* und *Mombelli* 1998). Eine lokalisierte aggressive Parodontitis kann später in die generalisierte Form übergehen. Weiterhin können verschiedene Formen einer aggressiven Parodontitis auch innerhalb einer Familie auftreten (*Caton* 1989).

1.1.2. Epidemiologie der AP

Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung und uneinheitlichen diagnostischen Kriterien sind Vergleiche epidemiologischer Daten zur aggressiven Parodontitis nur bedingt möglich. Die

umfangreichsten Untersuchungen wurden in amerikanischen Studien zur LJP durchgeführt. Die Prävalenz und Geschlechterverteilung der LJP variierte in Abhängigkeit von geografischer bzw. ethnischer Zuordnung. In der dunkelhäutigen Bevölkerung war die Prävalenz der LJP im Vergleich zur kaukasischen Rasse mit 1 % relativ hoch und Männer waren häufiger betroffen. Unter Kaukasiern lag die Prävalenz der LJP bei 0,1 % und der Anteil von Frauen war erhöht (Cogen et al. 1992, Loe und Brown 1991, Melvin et al. 1991). Für die RPP wird in kaukasischen Populationen eine Prävalenz von 1 – 2 % angegeben (Lindhe 1994). Bei einer RPP Typ A (wenig Plaque, beeinträchtigt Immunsystem) sind Frauen 2 – 3mal häufiger als Männer betroffen, während bei RPP Typ B (signifikante Plaqueakkumulation, intakte Immunabwehr) das Geschlechterverhältnis ausgeglichen war (Suzuki 1988). Daten über die Häufigkeit einer aggressiven Parodontitis im Milchgebiss existieren kaum. Sie schwanken von 0,9 – 4,5 % bei den 5-11jährigen (Birnstein et al. 1994, Sjodin und Matsson 1994, Sweeney et al. 1987). Mit Hilfe von Bissflügelaufnahmen und Beurteilung der Distanz Schmelz-Zementgrenze zur Oberkante des Alveolarknochens kann ein Screening dieser Altersgruppe auf aggressive Parodontitisformen hin erfolgen, denn die Messung des Attachmentverlustes mit einer Parodontalsonde ist im Wechselgebiss und an nicht vollständig durchgebrochenen Zähnen schwierig. Ein Wert von ≥ 2 mm kann bei Ausschluss anderer Ursachen (Approximalkaries, überhängende Füllungen, offene Approximalkontakte) auf eine aggressive Parodontitis hindeuten (Sjodin und Matsson 1992). Bei Jugendlichen und Erwachsenen erfolgt die Beurteilung des Attachmentverlustes mit der Parodontalsonde sowie anhand von Röntgenbildern.

1.1.3. Ätiologische Faktoren der AP

Die bakterielle Ätiologie der aggressiven Parodontitisformen ist weitgehend unstrittig. Die meisten Studien wurden zur LJP durchgeführt. Dabei konnten vor allem erhöhte Zahlen für *A.a.*, *Capnocytophaga spec.*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia (P.i.)* und *Campylobacter rectus* nachgewiesen werden (Slots 1979, Newman and Socransky 1977). Insbesondere *A.a.* wird als Schlüsselbakterium für die LJP mit Merkmalen eines echten infektiösen Agens betrachtet. So war *A.a.* zu 90 % mit LJP assoziiert während bei chronischer Parodontitis (CP) mit 50 % oder bei Gesunden mit 20-36 % der Keim signifikant seltener vorkam (Slots et al. 1980). Klinische Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen Behandlungsergebnis und *A.a.*-Keimzahl nach der Therapie (Slots und Rosling 1983). Gegen die Hypothese einer spezifischen Infektion sprach jedoch die Tatsache, dass *A.a.* allgemein eine hohe Prävalenz in einigen Populationen aus Entwicklungsländern zeigte (Gmur und Guggenheim 1994) und dass es LJP-Patienten gibt, bei denen die Erkrankung nicht mit *A.a.* assoziiert war (Loesche et al. 1985). Weiterhin wurden 5 verschiedene Serotypen (a-e) sowie 20 verschiedene Genotypen von *A.a.* mit verschiedener Virulenz differenziert (Asikainen et al.

1995). Bei LJP und Erwachsenenparodontitis wurde vor allem der Serotyp b nachgewiesen, während bei parodontal Gesunden der Serotyp c dominierte (Aiskainen et al. 1991, Zambon et al. 1996). Neben dem Nachweis von Bakterien wurden bei Patienten mit LJP in aktiven tiefen Läsionen Herpesviren nachgewiesen, die möglicherweise durch Beeinträchtigung der lokalen Abwehr das Wachstum von *A.a.* begünstigen könnten (Contreras et al. 2000).

Die G-EOP bzw. RPP war mit *P.g.*, *Treponema denticola* (*T.d.*) und *P.i.* signifikant und im geringeren Grad mit *Fusobacterium nucleatum* (*F.n.*) und *Campylobacter rectus* assoziiert. Eine signifikante Assoziation zu *A.a.* wurde dagegen nicht nachgewiesen (Albandar et al. 1997). Ag53, ein äußeres Membranprotein von *P.g.*, konnte von T-Zelllinien, die von EOP-Patienten stammten, erkannt werden. In In-vitro Versuchen konnte das Ag53 eine T-Zellaktivierung auslösen (Ohyama et al. 1998). Weiterhin war der Nachweis von *A.a.* und *P.g.* mit dem Ausmaß des klinischen Attachmentverlusts assoziiert (Flemmig et al. 1998).

Bei präpubertärer Parodontitis (PP) wurde vor allem eine Infektion mit *A.a.*, *P.i.*, *Capnocytophaga sp.*, *Eikenella corrodens*, *F.n.* (Delaney und Kornman 1987) und *P.g.* (Mishkin et al. 1986) nachgewiesen.

1.1.4. Immunologische Aspekte der Wirtsanfälligkeit bei AP

Bei verschiedenen Formen der aggressiven Parodontitis konnte bei einem Teil der Patienten ein herabgesetztes Phagozytosevermögen sowohl der lokalen (Sigusch 1998) als auch peripheren PMN's (Kimura et al. 1992) sowie von Monozyten (Page et al. 1983, Sigusch et al. 1998) nachgewiesen werden. Dabei war nicht nur die Anzahl phagozytierender Zellen vermindert, sondern auch das Phagozytosevermögen der einzelnen PMN-Zelle. Dieses veränderte sich nicht nach der Initialtherapie oder durch Zufügen von Plasma gesunder Kontrollprobanden (Kimura et al. 1992). PMN's von LJP-Patienten hatten auf ihrer Plasmamembran weniger Rezeptoren für chemotaktische Faktoren wie FMLP, C5a und GP110 (van Dyke et al. 1981, 1983, 1987). Der Rezeptormangel war jedoch nur für die LJP relevant und führte nicht zu anderen Infektionen. Mit Phytohemagglutinin aktivierte Monozyten von EOP-Patienten zeigten eine verringerte T_H1 Zytokinexpression (Interferon-gamma, Interleukin-2) und HLA-DR-Oberflächenexpression (Sigusch et al. 1998). Im Gewebe und in der Sulkusflüssigkeit konnten erhöhte Werte für Prostaglandin E₂ (PGE₂), Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) nachgewiesen werden (Masada et al. 1990, Offenbacher et al. 1993). In der Sulkusflüssigkeit (Ebersole et al. 1985), im Speichel (Hägeward et al. 2002) und im Serum (Page et al. 1983, Lu et al. 1993) wurden spezifische Antikörper gegen bei EOP vorkommende Bakterien gefunden. Die Serumkonzentration von Immunglobulinen gegen *A.a.* Serotyp b war für IgG am höchsten, gefolgt von IgA und IgM. Dabei kam IgG₂ die höchste Bedeutung zu (Lu et al. 1993). Der Antikörpertiter und die Avidität der Antikörper könnten die Anzahl der vom Attachmentverlust betroffenen Parodontien

beeinflussen. Hohe IgG₂-Titer gegen A.a. mit hoher Avidität wurden bei LJP-Patienten nachgewiesen, während G-EOP-Patienten häufig seronegativ waren oder niedrige Titer mit geringer Avidität zeigten (Tew et al. 1996). Neben Defiziten in der humoralen Abwehr berichteten Kinane et al. (1989) über eine bei LJP und RPP gegenüber Kontrollprobanden signifikant verringerte CD4/CD8-Ratio. Somit sind in der Ätiologie aggressiver Parodontitiden auch Defizite in der T-zellulären Abwehr denkbar.

1.2. Die chronische Parodontitis (CP)

1.2.1. Definition und Klinisches Bild der CP

Wie die aggressive Parodontitis ist die chronische Parodontitis (CP) eine Infektions-erkrankung. Obwohl die Erkrankung typischerweise nach dem 35igsten Lebensjahr beginnt, kann sie auch bei Jugendlichen und im Milchgebiss auftreten. Deshalb wurden die Begriffe Adulte Parodontitis und Erwachsenenparodontitis durch den der „Chronischen Parodontitis“ ersetzt (Colin und Putnins 2000). Folgende Merkmale sind für die CP charakteristisch (DGP 2002):

- Kommt überwiegend bei Erwachsenen vor
- Destruktion steht mit lokalen (natürliche u./o. iatrogene Reizfaktoren) in klarem Zusammenhang
- variable Plaquezusammensetzung
- subgingivaler Zahnstein häufig
- vorwiegend langsame Progression
- Aktivitätsschübe können vorkommen

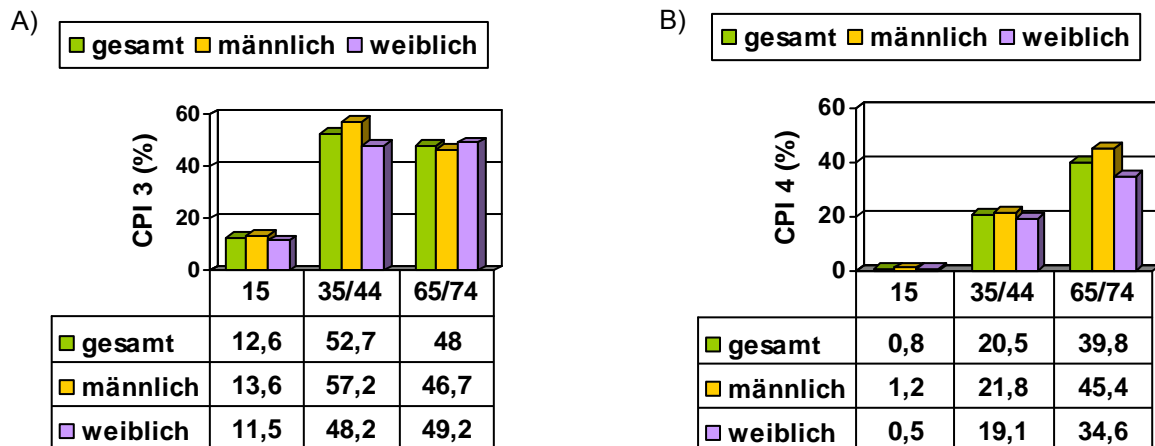
In Abhängigkeit von Ausmaß und Schwere des Attachmentverlustes unterscheidet man eine lokalisierte (< 30% der Zahnflächen befallen) von einer generalisierten Form (> 30 % der Zahnflächen befallen).

1.2.2. Epidemiologie der CP

Die Prävalenz parodontaler Erkrankungen ist altersabhängig. Legt man die für Parodontitis

diagnostisch relevanten Sondertiefen von 4 - 5 mm (Grad 3) und ≥ 6 mm (Grad 4) des „Community Periodontal Index“ (CPI) zugrunde, so ergibt sich laut der vierten deutschen Mundgesundheitsstudie (Hoffmann 2006) des Instituts Deutscherrahnrärzte (IDZ) für das Jahr 2005 folgendes Bild (Abb. 1 A und B):

Abb. 1 Prävalenz der Maximalwerte des Community Periodontal Index Grad 3 (A) und Grad 4 (B) in der Altersgruppe 15 Jahre (N = 1282), 35-44 Jahre (N = 915) und 65-74 Jahre (N = 803).



12,6% der Jugendlichen wiesen bereits Sondertiefen von 4-5 mm auf, 0,8% zeigten sogar Sondertiefen von ≥ 6 mm. 51,7% der Probanden hatten eine Gingivitis (CPI Grad 1) und 33,4% zusätzlich supra- und subgingivalen Zahnstein (CPI Grad 2). Lediglich 1,5 % wiesen keinerlei klinische Symptomatik auf (CPI Grad 0). In der Altersgruppe 35-44 waren 52,7 % von moderaten Sondertiefen von 4-5 mm betroffen und 20,5 % hatten eine schwere Parodontitis mit Sondertiefen von 6 mm und mehr. 11,8 % der Probanden wiesen dagegen Gingivitis (CPI Grad 1) und 14,4 % supra- oder subgingivalen Zahnstein ohne erhöhte Sondertiefen auf. Lediglich 0,5 % der Probanden wurden mit CPI Grad 0 bewertet. Unter den Senioren (Altersgruppe 65-74 Jahren) nimmt der Anteil von Probanden mit CPI Grad 4 weiter zu. Nur 12,2% wiesen keinen Attachmentverlust auf. Generell kann konstatiert werden, dass Männer etwas häufiger von schweren Parodontitiden (CPI Grad 4) betroffen waren und die Prävalenz schwerer Parodontitiden im Vergleich zur III. Mundgesundheitsstudie (DMS III) zunahm. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass durch Fortschritte in Prophylaxe und Therapie der Karies durchschnittlich mehr Zähne vorhanden sind, die von einer Parodontitis betroffen sein können (Hoffmann et al. 2006).

Epidemiologische Studien aus Schweden (Salonen et al. 1991) und den USA (Grossi et al. 1995, Albandar et al. 1999) bestätigten die Zunahme des Attachmentverlustes mit dem Alter und den für Männer im Vergleich zu Frauen höheren Attachmentverlust bzw. Alveolarknochenabbau. In den USA hatte eine milde Parodontitis eine Prävalenz von 21,8 % und eine moderate bis schwere Form kam zu 12,6 % vor. Dabei war die dunkelhäutige und mexikanische im Vergleich zur weißen Bevölkerung mehr betroffen (Albandar et al. 1999).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die chronische Parodontitis unter Erwachsenen und Senioren sehr häufig ist und dass das Ausmaß des Attachmentverlustes mit dem Alter ansteigt. Männer sind im Vergleich zu Frauen häufiger vom Attachmentverlust betroffen. Schwere Parodontitiden mit Sondiertiefen von 6 mm und mehr kommen mit einer Prävalenz von 20-40 % vor.

1.2.3. Ätiologische Faktoren der CP

Die chronische Parodontitis ist eine durch bakterielle Beläge verursachte entzündliche Infektionserkrankung. In der subgingivalen Plaque aktiver Parodontien konnte eine Prädominanz von *A.a.*, *P.g.* und *P.i.* nachgewiesen werden (Slots 1986), wobei die Assoziation von *A.a.* im Vergleich zur LJP weniger streng ist. *P.g.* wird als Major-Pathogen für die schwere Erwachsenenparodontitis angesehen und kam in den USA häufiger in der spanisch sprechenden Bevölkerung, bei Asiaten und Farbigen im Vergleich zu Kaukasiern vor. Bei stagnierender chronischer Parodontitis ist die Plaquezusammensetzung ähnlich der einer Gingivitis mit einer Prädominanz grampositiver aerober Kokken und Stäbchen und Anaerobierinfektion im Bereich von Schlupfwinkeln (Kleber 1996). Verschiedene *P.g.* und *A.a.* Stämme unterscheiden sich in ihrer Virulenz und könnten somit auch Unterschiede im klinischen Bild *A.a.*- oder *P.g.*-assoziierter Parodontitiden bedingen (Slots 1999). Daneben werden auch für die chronische Parodontitis genetisch prädisponierende Faktoren diskutiert (s.u.). Wie bei den meisten anderen chronischen Erkrankungen auch, beeinflussen neben der Mundhygiene bestimmte soziodemografische Faktoren, wie der Status der Schulbildung oder das Inanspruchnahmeverhalten der zahnärztlichen Therapie (beschwerden- bzw. kontrollorientiert) die Ausprägung der Parodontitis (Reich et al. 1996). Weiterhin müssen als Risikofaktoren vor allem Tabakkonsum (u.a. Ismail et al. 1983), Diabetes mellitus Typ 1 (Firatli 1997) und Typ 2 (Emrich et al. 1991) sowie HIV-Infektion bzw. AIDS (Holmstrup und Westergaard 1998, Robinson 2002) angesehen werden. Die vermutete Bedeutung der Rheumatoïdarthritis (Mercado et al. 2000 und 2001), der Osteoporose (Tezal 2002) und des psychosozialen Stresses (Mengel et al. 2000) als Risikoindikatoren bzw. Risikofaktoren für Parodontitis müssen noch durch Studien mit höherer Probandenzahl bestätigt werden.

1.3. Genetische Aspekte der chronischen und aggressiven Parodontitis

Erste Hinweise für die Existenz von genetischen Risikofaktoren für Parodontitis kamen von Erkrankungen wie dem Papillon-Lefèvre-Syndrom, dem Ehlers-Danlos-Syndrom Typ IV, VII, IX, der zyklischen und chronischen Neutropenie, dem Chédiak-Higashi-Syndrom, der Glykogenspeicherkrankheit 1b, der Hypophosphatasie und der Akatalasie, die häufig mit einer der aggressiven Parodontitis ähnliche intraoralen Symptomatik einhergingen (Genco and Loe

1993, *Sofaer* 1990, *Hart* 1996). Da diese genetischen Syndrome durch verschiedene Genmutationen verursacht sind mit Beeinträchtigung unterschiedlicher Gewebe (Epithel, Wurzelzement, Bindegewebe), der Enzymaktivität (Katalase, alkalische Phosphatase) bzw. Abwehrzellen (PMN) ist es wahrscheinlich, dass auch die Disposition für die früh beginnende Parodontitis bei allgemein gesunden Probanden heterogen beeinflusst wird (*Hart* 1996). Der genetische Anteil unter allen anderen Risikofaktoren (Heritabilität) an einer Erkrankung lässt sich durch den Vergleich der klinischen Befunde von genetisch identischen monozygoten mit genetisch nicht identischen dizygoten Zwillingen abschätzen. Bei chronischer Parodontitis betrug der für andere Risikofaktoren adjustierte genetische Faktor für Schwere (Mittelwert Sondiertiefe und Attachmentverlust) und Ausdehnung der Erkrankung (prozentualer Anteil von Parodontien mit Attachmentverlust > 2 und 3 mm oder Sondiertiefen > 4 und 5 mm) annähernd 50 %, während der Gingivitisindex von genetischen Faktoren unabhängig war (*Michalowicz et al.* 2000).

Bei aggressiven Parodontitisformen wurden vor allem Familienstudien und Segregationsanalysen durchgeführt. Das ist darauf zurückzuführen, dass die juvenile Parodontitis in der lokalisierten oder generalisierten Form mit ca. 40 % betroffener Geschwister überproportional häufig in einer Familie auftrat (*Long et al.* 1987, *Beaty et al.* 1987, *Marazita et al.* 1994, *Saxen and Nevanlinna* 1984), wobei bei 71 % der parodontal erkrankten Geschwister eine verminderte PMN-Chemotaxis festgestellt wurde (*Boughman et al.* 1992). Die Mehrzahl der Studien mit LJP geht nach Korrektur des wahrscheinlich überschätzten Anteils betroffener Frauen (*Hart et al.* 1992) von einem autosomal dominanten Erbgang aus (*Beaty et al.* 1987, *Saxen and Nevanlinna* 1984), wobei die Penetranz der beteiligten Gene auf über 70 % geschätzt wurde (*Marazita et al.* 1994). Da die meisten Untersuchungen an Afroamerikanern durchgeführt wurden, sind jedoch in anderen Populationen auch andere Erbgänge (X-chromosomal) möglich (*Hodge et al.* 2000). Die beschriebenen Familienanalysen und Segregationsstudien ließen nur Schlussfolgerungen über den Erbgang einer genetischen Eigenschaft zu, ohne dass eine Aussage über die daran beteiligten Gene möglich war. Erst mit Hilfe molekularbiologischer Methoden wurde die Identifikation verschiedener Gene möglich, die im Wesentlichen die Funktion der PMN's betrafen und die Möglichkeit, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) an Monozyten zu binden (*Hart* 1996). Bindungsanalysen in einer großen Familie der Brandywine Bevölkerung identifizierten einen möglichen Kandidatengenort für die LJP auf dem langen Arm des Chromosoms 4 in der Nähe der Genorte für die Dentinogenesis imperfecta hereditaria Typ II und III (*Boughman et al.* 1986), der jedoch von *Hart et al.* (1993) in anderen Populationen nicht bestätigt werden konnte. Neben sogenannten Hauptsuszeptibilitätsgenen für aggressive Parodontitis könnten andere, von diesen unabhängig vererbte modifizierende Gene, die z.B. die IgG-Immunität regulieren, existieren, die die phänotypische Ausprägung der Erkrankung beeinflussen (*Schenkein et al.* 1994, *Marazita* 1996, *Hart* 1996). Weiterhin wurde

die Beziehung von verschiedenen Genpolymorphismen zur Parodontitis untersucht, wobei insbesondere Polymorphismen im Interleukin(IL)-1, -4 und -10 Gencluster sowie Polymorphismen für TNF- α und die IgG-Rezeptoren FCRIIa und FCRIIIb berücksichtigt wurden.

IL-1 kommt in zwei Formen, IL-1 α und IL-1 β , vor. IL-1 stimuliert die Endothelzellen zur Expression von Adhäsionsmolekülen, induziert die Produktion von Kollagenasen und anderen Matrixmetalloproteasen, fördert die Knochenresorption und hemmt die Kollagen- und Knochenbildung (*Deschner* 2001). Der IL-1B +3953 (TT) Genotyp war bei Diabetikern mit einer erhöhten Freisetzung von IL-1 β aus peripheren Monozyten nach LPS-Stimulation assoziiert (*Pociot et al.* 1992). Weiterhin erhöhte das gemeinsame Vorkommen der Polymorphismen IL-1A – 889 [+ 4845] (C->T) und IL-1B + 3953 [+ 3954] (C->T) in der Altersgruppe zwischen 40 – 60 Jahren das Risiko für eine schwere Erwachsenenparodontitis bei Nichtrauchern nordeuropäischen Ursprungs (*Kornman et al.* 1997). Die Entdeckung von *Kornman* führte zur Etablierung eines kommerziell verfügbaren IL-1 Risikotests für Parodontitis. Als IL-1 positiv werden Patienten bezeichnet, die an den Genorten für IL-1A und B jeweils mindestens einmal das mutante Allel 2 aufweisen bzw. mindestens an einem Genort homozygot für das mutante Allel sind. Die Bedeutung des IL-1 Polymorphismus wurde in weiteren Studien belegt. So war in einer norddeutschen Parodontitispopulation der IL-1A/IL-1B Polymorphismus bei Rauchern signifikant mit dem Attachmentverlust korreliert (*Meisel et al.* 2002). Recall-Patienten mit positivem IL-1 Genotyp, die über 14 Jahre beobachtet wurden, hatten ein 2,7fach erhöhtes Risiko für den Zahnverlust und in Kombination mit Rauchen stieg dieses auf das 7,7fache an (*McGuire und Nunn* 1999). In einer prospektiven 5 Jahresstudie einer australischen Population zeigten IL-1 Genotyp positive Nichtraucher mit einem Alter über 50 Jahre erhöhte Sondiertiefen im Vergleich zu Genotyp negativen Personen (*Cullinan et al.* 2001). Der IL-1 β Level in der Sulkusflüssigkeit IL-1 Genotyp positiver Patienten war im Vergleich zu IL-1 Genotyp negativen Probanden von der Tendenz in flachen Taschen von < 4 mm erhöht. Nach Parodontalthherapie konnte der IL-1 β Level nur bei IL-1 Genotyp negativen, nicht aber IL-1 positiven Patienten, gesenkt werden. In tieferen Taschen waren diese Unterschiede weniger auffällig (*Engbretson et al.* 1999). Kaukasische Probanden mit generalisierter früh beginnender Parodontitis (G-EOP) zeigten keine Assoziation zum IL-1A/IL-1B Genotyp, auch wenn Rauchen als Kovariate berücksichtigt wurde (*Hodge et al.* 2001). Vielmehr war bei europäischen EOP-Patienten unter Rauchern eine Homozygotie des Allels 1 (CC) von IL-1B signifikant häufiger. Dieser Genotyp könnte synergistisch mit Rauchen zu einer verminderten IL-1 β -Sekretion und damit insuffizienten Immunabwehr führen (*Parkhill et al.* 2000). Dieses Ergebnis zeigt, dass der zurzeit verfügbare IL-1 Parodontitisrisikotest nicht für die aggressive Parodontitis geeignet ist. Außerdem muss beachtet werden, dass die Häufigkeit des IL-1 Polymorphismus ethnischen Unterschieden unterliegt (*Armitage et al.* 2000, *Walker et al.* 2000).

IL-4 ist u.a. ein Inhibitor der Makrophagenfunktion mit verminderter Sekretion von PGE₂ und Zytokinen und induziert die Apoptose von Monozyten. Dies führte zu der Hypothese, dass eine Abwesenheit von IL-4 die Entstehung einer Parodontitis triggern könnte (*Shapira et al. 1992*). In einer Gruppe von EOP-Patienten zeigten 27,8 % einen Polymorphismus in der IL-4 Promotorregion (PP+) an Position -590 (C->T) und einen Polymorphismus im Intron 2 (IP+), während keine der alterskorrelierten Kontrollprobanden diese Polymorphismen aufwiesen. Weiterhin waren beide Polymorphismen mit einem signifikant niedrigeren Serumspiegeln für IL-4 (unter der Detektionsgrenze) assoziiert (*Michel et al. 2001*).

Weitere Studien untersuchten die Assoziation von Parodontitis zu Promotor-Polymorphismen im IL-10 Gencluster. IL-10 hat einen pleiotropen Effekt auf Immunregulation und Entzündungsantwort. Einerseits terminiert IL-10 die Freisetzung von IL-12, IL-18 und TNF- α aus Makrophagen und inhibiert die Expression von MHC-Klasse II-Molekülen. Andererseits ist IL-10 ein starker Stimulator von natürlichen Killer Zellen (NK) sowie CD-8 positiven T-Zellen. Weiterhin triggert IL-10 die B-Zell Proliferation und Differentiation (*Turner et al. 1997*). Eine begrenzte Zahl von Studien untersuchte IL-10 Promotorpolymorphismen an drei Positionen, -1082 (-1087) G->A, -819 (-824) C->T und -590 (-592) C->A sowie zwei Mikrosatelliten. Die Ergebnisse waren teilweise inkonsistent. Während unter englischen, deutschen und japanischen Parodontitispatienten keine Assoziationen zu IL-10 Polymorphismen nachgewiesen werden konnten (*Kinane et al. 1999, Yamazaki et al. 2001, Gonzales et al. 2002*), beschrieben *Berglundh et al. (2003)* eine positive Assoziation der chronischen Parodontitis zum -1082 G->A Polymorphismus. In einer brasilianischen CP-Gruppe (*Scarel-Carminaga et al. 2004*) wurde unter Patientinnen eine positive Assoziation zum ATA-Haplotyp gezeigt. In einer weiteren deutschen Studie (*Reichert et al. 2008*) wurde im Unterschied zu den Ergebnissen von *Scarel-Carminaga* der Haplotyp ATA unter Berücksichtigung der Kofaktoren Alter, Geschlecht, Rauchen und Plaqueindex als Risikofaktor für die aggressive Parodontitis identifiziert.

TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin mit der Fähigkeit, parodontale Gewebedestruktion und Knochenabbau zu induzieren. Bei den Polymorphismen handelt es sich um Transitionen von G nach A, drei an den Promotorpositionen (-376, -308, -238) und eine im ersten Intron an Position +489. In einer chinesischen (*Qian et al. 2002*) und amerikanischen Erwachsenenpopulation (*Galbraith et al. 1999*) wurde der 1/1 TNF- α -308 Genotyp als Risikofaktor für schwere Parodontitis identifiziert. In einer deutschen Studie war die Haplotypkombination -308, -238 GG-GG mit einem erhöhten Risiko für eine subgingivale Infektion mit P.i. assoziiert (*Schulz et al. 2008*). Dagegen war unter jüdischen L-EOP-Patienten (*Shapira et al. 2001*) und niederländischen Patienten mit Erwachsenenparodontitis (*Craandijk et al. 2002*), auch bei Berücksichtigung des Rauchverhaltens, keine Assoziation zu einem der TNF- α Polymorphismen erruierbar.

Fc γ -Rezeptoren bilden eine Familie von Oberflächenmolekülen, die sich an den Fc-Anteil von

Immunglobulinen binden. Sie werden u.a. auf Makrophagen, PMNs und Langerhanszellen exprimiert. Es existieren zwei Fc γ -R-Klassen, Fc γ -RIIa (CD32) und Fc γ -RIIIb (CD16). Ein Polymorphismus im Fc γ -RIIA-Gen an Position 494 (G oder A) bestimmt, ob an Position 131 des Fc γ RIIA Proteins Arginin (R) oder Histidin (H) exprimiert wird. Fc γ RIIA-H131 hatte eine hohe Affinität zu IgG₂, während Fc γ RIIA-R131 eine niedrige Affinität zu IgG₂ aufwies (Osborne et al. 1994). PMNs von LJP-Patienten, die Fc γ RIIA-R131 exprimierten, zeigten eine verminderte Phagozytose von A.a. (Wilson und Kalmar 1996). Von Fc γ RIIIb gibt es zwei allele Formen, die sich in vier Aminosäuren unterscheiden können. PMN`s, die Fc γ -RIIIb (NA2/NA2) exprimierten, zeigten ein geringeres Phagozytosevermögen für IgG₁- und IgG₃-Immunkomplexe im Vergleich zu denen, die Fc γ -RIIIb (NA1/NA1) aufwiesen. Fc γ -RIIIb (NA2/NA2 oder NA1/NA2) und Fc γ RIIA-R131 waren bei japanischen Probanden signifikant bzw. von der Tendenz mit rekurrenter Erwachsenenparodontitis assoziiert (Kobayashi 1997).

Die teilweisen inkonsistenten Ergebnisse der beschriebenen Assoziationsstudien verdeutlichen die Notwendigkeit, nach geeigneteren diagnostischen Prädiktoren für die Parodontitis bzw. subgingivalen Keimbesiedelung zu suchen. Dabei gewannen Studien zum HLA-Systems (**H**uman **L**eucocyte **A**ntigen) in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung (s.u.). Es ist bekannt, dass bestimmte HLA-Merkmale mit verschiedenen Krankheiten assoziiert sind (Svejgaard und Ryder 1979), wobei das HLA-System ein flexibles Schutzsystem gegenüber Pathogenen zu bilden scheint, indem aus einer Anzahl frei kombinierbarer Grundelemente (Petrov 1983) die antigene Individualität aller Organismen verschiedener Populationen abgesichert wird.

1.4. Der Haupthistokompatibilitätskomplex des Menschen

Historisch basiert die Entdeckung bestimmter immunogener Zelloberflächenproteine auf Transplantationsexperimenten an Mäuse-Inzucht-Stämmen. Je enger der Verwandtschaftsgrad der Tiere war, desto langsamer erfolgte die Transplantatabstoßung (Gorer 1936). Der Genort, der für diese Moleküle kodiert, wurde deshalb Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) genannt und die kodierten Proteine MHC-Moleküle. Die Erforschung des MHC beim Menschen begann in den 50iger Jahren des vorherigen Jahrhunderts durch die Entdeckung der „*Humanen Leukocyten Antigene (HLA)*“. Nach multiplen Bluttransfusionen wurden in Seren von Patienten Antikörper gefunden, die in der Lage waren, körperfremde Leukozyten zu agglutinieren oder in Anwesenheit von Komplement zu lysieren (Dausset 1954).

MHC-Moleküle spielen individuell eine zentrale Rolle bei der Unterscheidung zwischen „fremd“ und „eigen“, sowohl bei der Prägung des Immunsystems als auch durch die Fähigkeit, pathogene körperfremde oder körpereigene Peptide zu selektieren und zu binden (Mayr 1994) und diese an der Zelloberfläche in fragmentierter Form verschiedenen Arten von T-Zellen zu

präsentieren (*Carcassi et al. 1991, Germain 1986*), damit sie durch das Immunsystem erkannt und zerstört werden können (*Lechler 1994*). Der individuelle Schutz vor Krankheitserregern wird durch zwei separate Mechanismen gewährleistet. Erstens gibt es mehrere MHC-Klasse I- und II-Gene, die für MHC-Moleküle mit unterschiedlichen Peptidbindungsspezifitäten kodieren, d.h. der MHC ist polygen. Zweitens gibt es für jedes Gen im MHC mehrere Allele, die die Peptidbindungsmöglichkeiten der MHC-Moleküle von MHC-Klasse I- und II-Genen individuell variieren können, d.h. die Gene im MHC und damit die Genprodukte verfügen über einen ausgeprägten Polymorphismus (*Hughes und Hughes 1995*).

1.4.1. Der HLA-Genkomplex

Die Gene des menschlichen HLA-Komplexes sind auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert und erstrecken sich nach neueren Untersuchungen über einen DNA-Bereich von ca. 7×10^6 Basenpaaren (*Beck und Trowsdale 1999, 2000*). Die Genloci des HLA-Genkomplexes werden drei Klassen (I-III) zugeordnet. Die Gene der HLA-Klasse II liegen zentromerwärts, ihnen schließt sich die Klasse-III-Region an und telomerwärts liegen die Gene der HLA-Klasse I. Die Hauptgene für die schweren α -Ketten der HLA-Klasse I-Moleküle werden mit HLA-A, -B und -C bezeichnet. Die zusätzlichen Gene in der Klasse I-Region, HLA-E, -F, -G, exprimieren Klasse-IB-Moleküle, die u.a. die zytotoxische Aktivität von Natürlichen Killer(NK)-Zellen inhibieren können (*Allan et al. 2002*). Das Gen für das β_2 -Mikroglobulin liegt, obwohl es einen Teil des HLA-Klasse I-Moleküls kodiert, auf Chromosom 15 des Menschen. Die Gene der HLA-Klasse III kodieren für die Komplementfaktoren C2, C4A, C4B und Bf, die Zytokine Tumornekrosefaktor (TNF) α und β , das Hitzeschockprotein (HSP) 70 und die Steroid-21-Hydroxylase (CYP 21 B) (*Wassmuth 1995, Bodmer et al. 1997*). Die HLA-Klasse II-Region lässt sich in die Subregionen HLA-DR, -DP und DQ untergliedern. Der HLA-DR-Locus enthält ein monomorphes α -Kettengen (DRA) und mehrere β -Kettengene. Dabei exprimieren DRB1, 3, 4 und 5 HLA-Moleküle, während DRB2, 6, 7, 8 und 9 wahrscheinlich Pseudogene darstellen. Das polymorphe DRB1-Gen kodiert für die Merkmale DR1-18. Die Genprodukte von DRB3, DRB4 und DRB5 sind die β -Ketten der Merkmale DR52, DR53 und DR51. Im Gegensatz zu DRB1 sind die Gene von DRB3, 4 und 5 nicht immer vorhanden (*Wassmuth 1995*). In der kaukasischen Bevölkerung liegt HLA-DRB3 in haplotypischer Kopplung (als Haplotyp wird eine Vererbungseinheit bezeichnet, die en bloc vererbte Allele eng benachbarter Gene trägt) mit den HLA-DRB1-Genen DR4, DR7 und DR9 vor. HLA-DRB4 kodiert zusammen mit den HLA-DRB1-Genen DR3, DR5 und DR6. Das HLA-DRB5-Gen tritt bei kaukasischen Individuen mit dem HLA-DR2-Merkmal auf (*Campbell und Trowsdale 1993*). In der DQ-Region finden sich zwei α -Kettengene (DQA1, DQA2) und drei β -Kettengene (DQB1, DQB2, DQB3). Dabei sind DQA1 und DQB1 polymorph, während DQA2, DQB2 und DQB3 Pseudogene darstellen. Auch die HLA-DP Region umfasst zwei α -Kettengene (DPA1,

DPA2) und zwei β -Kettengene (DPB1, DPB2). Ähnlich wie in der DQ-Region werden DPA1 und DPB1 exprimiert während DPA2 und DPB2 Pseudogene darstellen. Weitere Gene innerhalb der Klasse II-Region sind DOA, DOB, DMA und DMB. Die HLA-DM Gene kodieren ein DM-Heterodimer, welches sich in angesäuerten endozytotischen Vesikeln an MHC II-Moleküle binden kann. Dadurch erfolgt die Freigabe des sogenannten CLIP-Fragments (class-II-associated invariant chain peptide) aus der Bindungsgrube des MHC II-Moleküls und die Bindung von pathogenen Peptiden wird ermöglicht. Außerdem entfernt HLA-DM instabil an MHC-II gebundene Peptide um sicher zu stellen, dass nur Peptide gebunden werden, die auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zelle ausreichend lange CD4-Zellen präsentiert werden können (*Kropshofer et al. 1997, Jensen et al. 1999*). Die DMA- und DOB-Gene kodieren ein DO-Molekül, das einen negativen Regulator für DM darstellt (*Alfonso et al. 1999*). In der Nähe der Klasse II-Gene befinden sich wichtige Gene für die Antigenprozessierung. LMP2 und LMP7 kodieren Untereinheiten des Proteasoms (*Niedermann et al. 1999*). TAP1 und TAP2 exprimieren Moleküle, die den Transport kurzer Peptide vom Zytosol in das endoplasmatische Retikulum ermöglichen, wo sie sich an MHC-Klasse I-Moleküle binden können (*Lankat-Buttgereit und Tampe 1999*).

Die Expression von MHC-Allelen ist kodominant, d.h. die Genprodukte der HLA-Allele des mütterlichen und väterlichen HLA-Haplotyps werden bei heterozygoten Individuen in den entsprechenden Zellen exprimiert und sind in der Lage, T-Zellen Antigene zu präsentieren.

Der schon erwähnte Polymorphismus des HLA-Systems führt zu Differenzen in den HLA-Allelen von bis zu 20 Aminosäuren. Im Wesentlichen sind Aminosäuren betroffen, die den peptidbindenden Spalt auskleiden oder Aminosäuren benachbarter Regionen, die einen direkten Kontakt mit dem T-Zellrezeptor eingehen. Durch den Polymorphismus des HLA-Systems werden das Spektrum der Peptide, die Konformation der gebundenen Peptide und die Wechselwirkung der HLA-Moleküle mit dem T-Zellrezeptor beeinflusst (*So 1994, Wassmuth 1995*).

Kennzeichnend für das HLA-System ist weiterhin, dass die beobachtete Häufigkeit der gemeinsamen Vererbung von Allelen benachbarter Gene von dem statistisch zu erwarteten Wert abweicht. Das Auftreten bevorzugter Allelkombinationen bei gleicher Crossing-over-Wahrscheinlichkeit wird als Kopplungsungleichgewicht (engl. linkage disequilibrium) bezeichnet. Normalerweise lässt sich das Auftreten einer bestimmten Kombination von Allelen durch Multiplikation aus der beobachteten Frequenz der einzelnen Allele berechnen (Erwartungswert). Bei Vorliegen eines Kopplungsungleichgewichtes kommt es zu einer Differenz (Δ) zwischen dem Erwartungswert für die Häufigkeit einer Kombination und dem tatsächlich beobachteten Wert. Ein besonders hohes Kopplungsungleichgewicht wird für die Allele des DR- und DQ-Locus beschrieben. Die Gründe für diese Abweichungen sind nicht geklärt. Möglicherweise stellte eine bestimmte Kombination von Allelen einen Selektionsvorteil da (*Bodmer 1973, Bodmer und Bodmer 1978*). Eine zweite Theorie nimmt an, dass während

der Evolution noch nicht genügend Zeit für das Erreichen eines vollständigen Gleichgewichts in der Verteilung der Allele zur Verfügung stand. Schließlich ist es möglich, dass die Rekombinationsorte nicht gleichmäßig verteilt sind und sogenannte „hot spots“ für die Rekombination innerhalb der Haplotypen auftreten (*Baenkler* 1996).

1.4.2. Molekülstruktur und Funktion von HLA Klasse I- und II-Merkmalen

HLA-Klasse I- und II-Moleküle unterscheiden sich strukturell und funktionell voneinander und werden auch unterschiedlich auf den Körperzellen exprimiert. Trotzdem gibt es auch Gemeinsamkeiten in ihrer Gesamtstruktur. Bei beiden Molekülen handelt es sich um an der Zelloberfläche verankerte heterodimere Glykoproteine, die sich in eine hypervariable Peptidbindungsregion, eine der Zellmembran nahen Immunglobulin-ähnliche Region, eine Transmembranregion und eine zytoplasmatische Region unterteilen lassen. HLA-Klasse I-Moleküle bestehen aus einer α -Kette (Molekulargewicht 43 kDa), die sich durch die Membran erstreckt und dem β_2 -Mikroglobulin (11,5 kDa), welches nichtkovalent mit der α -Kette assoziiert ist. Dieses Molekül durchspannt die Membran nicht. Die α -Kette enthält drei extrazelluläre Domänen α_1 , α_2 und α_3 . Die α_1 und α_2 Domänen lagern sich so aneinander, dass die achtsträngige β -Faltblattstruktur dieser beiden Domänen eine Plattform bildet, auf der quer zwei α -Helices parallel angeordnet sind (*Bjorkmann et al.* 1987 a). Diese Faltung erzeugt die peptidbindende Grube (*Bjorkmann et al.* 1987 b). Die α_3 -Domäne und das β_2 -Mikroglobulin weisen in ihrer Aminosäuresequenz und in der Faltung Ähnlichkeiten mit konstanten Domänen von Immunglobulinen auf.

HLA-Klasse II-Moleküle bestehen aus zwei transmembranen α - (34 kDa) und β -Ketten (29 kDa) mit jeweils 2 Domänen (α_1 und α_2 sowie β_1 und β_2). Dabei stellen die α_2 und β_2 Domänen die Immunglobulin-ähnliche Region, während die α_1 und β_1 Domänen die Peptidbindungsregion bilden. Da die Domänen, die den peptidbindenden Spalt bilden, unterschiedlichen Ketten angehören, sind sie im Unterschied zu HLA-Klasse I-Molekülen nicht kovalent verbunden. Die Peptidbindungsgrube ist nicht wie bei Klasse I-Molekülen geschlossen sondern an beiden Enden offen (*Brown et al.* 1993).

Eine wesentliche Funktion der Immunabwehr ist die Erkennung von „selbst“ und „nicht-selbst“ (*Petrov* 1983). Antigen-spezifische T-Lymphozyten erkennen Antigene nur dann, wenn sie von HLA-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Dieses Phänomen wird als MHC-Restriktion bezeichnet. Die Antigenerkennung findet durch einen trimolekularen Komplex statt, der aus dem HLA-Molekül, dem proteolytisch aufbereiteten (prozessierten) und an das HLA-Molekül gebundenen antigenen Peptidfragment sowie dem T-Lymphozyten-Rezeptor (TCR) besteht. Die Spezifität eines TCR wird somit vom HLA-Molekül und dem gebundenen Peptidfragment bestimmt. Dieser HLA-Peptid-Komplex bildet dabei eine Kombination von „selbst“ (HLA-Molekül) und „nicht-selbst“ (Antigenpeptid). Er wird allelspezifisch vom TCR

erkannt, was zur Proliferation und Differenzierung der T-Zellen führt, während nur „selbst“ keine Aktivierung nach sich zieht.

Die Bindung von antigenen Peptiden und ihre Präsentation auf der Zelloberfläche ist eine wichtige Funktion der HLA-Moleküle (*Madden et al. 1992*). Antigen Peptide werden mit einer hohen Affinität gebunden wobei die Fähigkeit, ein breites Peptidspektrum zu binden, erhalten bleibt. Die gebundenen Peptide sind dabei integraler Bestandteil der MHC-Moleküle und notwendig für ihre Stabilität auf der Zelloberfläche (*Stern und Wiley 1994*). Klasse I- und II-Moleküle unterscheiden sich in der Art der präsentierten Peptide, in der Art der T-Zelle, die den HLA-Peptidkomplex erkennt und in der nachfolgend ausgelösten immunologischen Reaktion. HLA-Klasse I-Moleküle binden im endoplasmatischen Retikulum (ER) der Zelle synthetisierte zytoplasmatische körpereigene oder körperfremde Peptide (z.B. Viren oder zytosolische Bakterien) und präsentieren sie CD8⁺ T-Zellen (*Germain 1986*). Der proteolytische Abbau der Peptide zu Peptidfragmenten, die an HLA-Klasse I-Moleküle binden können, erfolgt durch zwei Untereinheiten des Proteasoms LMP2 und LMP7 (*Goldberg und Rock 1992, Robertson 1991, Niedermann 1999*). Der Transport der Peptidfragmente in das ER wird durch 2 in der Membran des ER verankerte ATP-abhängige Transportproteine TAP1 und TAP2 (Transporters associated with Antigen Processing-1 und -2) gewährleistet (*Monaco 1992, Lankat-Buttgereit und Tampe 1999*). HLA-I-Moleküle binden kurze, acht bis zehn Aminosäuren lange Peptide. Das Peptid liegt in ausgestreckter Konformation vor. Für die Bindung des Peptids in der Grube sind sechs sogenannte „Peptidbindungstaschen“ ausgebildet. Vier Taschen B, C, D und E liegen an der Grenze zwischen β -Faltblatt und den α -Helices und dienen der Bindung mit sogenannten „Ankeraminosäuren“ des antigenen Peptids (*Baenkler 1996*). Diese Ankeraminosäuren müssen nicht identisch aber immer verwandt sein. Somit ist gewährleistet, dass ein HLA-Molekül unterschiedliche Peptide binden kann (*Matsumura et al. 1992*). An den Enden der Gruben zwischen den beiden α -Helices befinden sich die Bindungstaschen A und F. Dabei handelt sich um konservierte Positionen zur Aufnahme freier NH₂- und COOH-Gruppen des Peptids, die im Wesentlichen die Stabilität der HLA-Peptidbindung gewährleisten (*Bouvier und Wiley 1994*) und die Länge des gebundenen Peptids festlegen. Gewisse Variationen der Peptidlänge lassen sich wahrscheinlich durch Knicken des Peptidrückrates anpassen (*Fremont et al. 1996*). Nach der Peptidbindung erfolgt die vollständige Faltung des HLA-I-Moleküls, der Transport zur Zelloberfläche und die Präsentation an CD8⁺ T-Zellen. Die Aufgabe der CD8-T-Zellen besteht in der Vernichtung der infizierten Zellen, die sie spezifisch über den T-Zellrezeptor erkennen.

HLA-Klasse II-Moleküle präsentieren Peptidfragmente von Proteinen und Krankheitserregern, die extrazellulär von Makrophagen, unreifen dendritischen Zellen, B-Zellen und anderen antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen wurden oder die von Bakterien oder Parasiten stammen, die in die Zelle eingedrungen sind, um sich in intrazellulären Vesikeln zu vermehren, CD4⁺ T-Zellen. Die aufgenommenen Proteine werden in angesäuerten Vesikeln

durch Proteasen wie Cathepsin S und L aufgespalten (*Chapman 1998, Nakagawa und Rudensky 1999*). Neu im ER synthetisierte HLA-Klasse II-Moleküle werden zunächst mit einem Protein (invariante Kette - Ii) zusammen gebaut, welches die Peptidbindungsgrube blockiert und die vorzeitige Anlagerung von Peptiden schon im ER verhindert (*Brachet et al. 1997*). Weiterhin wird durch Ii der Transport der HLA-II-Moleküle vom ER zu Endosomen mit niedrigem pH-Wert gesteuert. HLA-II-Moleküle werden dann im Golgi-Apparat mit Hilfe spezieller intrazellulärer Vesikel (MHC-II-Kompartiment - MIIC) an die Zelloberfläche transportiert. Wahrscheinlich erfolgt im MIIC die Abspaltung von Ii und die Beladung mit antigenen Proteinen (*Kleijmeer et al. 1997*). Voraussetzung für die Freisetzung des die Peptidbindungsgrube blockierenden CLIP-Fragments (class-II-associated invariant-chain peptide) und anschließende Bindung des prozessierten Antigens ist die Anlagerung eines MHC-II ähnlichen HLA-DM Moleküls an das MHC-II-Molekül (*Kropshofer et al. 1997, Jensen et al. 1999*). Im Vergleich zu HLA-Klasse I-Molekülen fehlen bei Klasse-II-Molekülen die spezifischen Bindungstaschen an den beiden Enden der peptidbindenden Grube und die NH₂- und COOH-Gruppen des Peptids sind nicht an der Bindung beteiligt. Peptide, die an HLA-II-Moleküle binden, sind mindestens 13 Aminosäuren lang, liegen in ausgestreckter Konformation in der Peptidbindungsfurche und können an beiden Enden herausragen (*Rudensky et al. 1991*). Bestimmte Aminosäureseitenketten an den Positionen 1, 4, 6 und 9 des Peptids können in flache und tiefe Bindungstaschen des HLA-II-Moleküls hineinragen. Diese Taschen können ein größeres Spektrum an verschiedenen Aminosäureseitenketten im Vergleich zu Klasse-I-Molekülen aufnehmen. Da die Länge der gebundenen Peptide variieren kann, erhält der erste Verankerungsrest die Bezeichnung 1. An Position 4 findet man häufig Aminosäuren wie Asparaginsäure (D) und Glutaminsäure (E) mit einem negativ geladenen Rest, an Position 9 Aminosäuren mit hydrophobem Rest, z. B. Tyrosin (Y), Leucin (L), Prolin (P) und Phenylalanin (F) (*Rammensee 1995*). Eine Peptidbindung kann schon mit drei, ganz selten sogar mit zwei passenden Ankeraminosäuren erfolgen. Hochaffine Peptide besitzen aber meist 4 passende Ankeraminosäuren. Das Rückrat des gebundenen Peptids interagiert mit Seitengruppen konservierter Aminosäurereste, die die Peptidbindungsfurchen auskleiden. Die gebundenen Peptide sorgen, ähnlich wie bei HLA-I-Molekülen auch, für die Stabilität der an der Zellmembran verankerten HLA-II-Moleküle (*Rammensee 1995*).

Dem unterschiedlichen Spektrum präsentierter Peptide entspricht eine unterschiedliche Gewebeexpression von HLA-Klasse I- und II-Merkmalen.

Da Viren alle kernhaltigen Zellen befallen können, exprimieren fast alle HLA-I-Moleküle an ihrer Oberfläche. Ausnahmen sind neuronale Zellen im Gehirn, Spermien und Trophoblastenzellen der Plazenta. Der Umfang der Expression schwankt jedoch, Zellen des Immunsystems exprimieren viele HLA-I-Moleküle, Hepatozyten relativ wenig und kernlose Erythrocyten wenige oder keine (*Germain 1986*). Durch die Abtötung infizierter Zellen durch CD8⁺ T-Zellen können sich Viren und zytosolische Bakterien nicht mehr vermehren und die

Infektion wird gestoppt. HLA-Klasse II-Moleküle findet man dagegen auf B-Lymphocyten, dendritischen Zellen, aktivierten T-Zellen und Makrophagen (*Wassmuth* 1995). CD4+ T-Zellen, die an einen Peptid-HLA-II-Komplex binden, können andere Zellen aktivieren. Dabei unterscheidet man zwei funktionelle Klassen von CD4+ T-Zellen. T_H1-Zellen aktivieren Makrophagen, so dass diese intravesikuläre Bakterien lysieren können. T_H2-Zellen regen B-Zellen zur Antikörperproduktion an. Verschiedene Klassen von HLA-Molekülen gewährleisten somit, dass der geeignete T-Zelltyp als Reaktion auf ein bestimmtes Pathogen aktiviert wird (*Baenkler* 1996).

1.4.3. Nomenklatur des HLA-Systems

HLA-Merkmale können serologisch, zellulär, biochemisch und molekularbiologisch nachgewiesen und definiert werden. Praktische Bedeutung erlangten dabei vor allem serologische und nach der Einführung der Polymerasekettenreaktion (PCR) molekularbiologische Nachweisverfahren. Durch verschiedene PCR-Techniken wie z.B. PCR-SSP (sequenzspezifische Amplifikation) oder PCR-SSO (sequenzspezifische Oligonucleotide) können HLA-Merkmale auf DNA-Ebene definiert werden. Dadurch wurde es möglich, bereits serologisch oder zellulär definierte Allele differenzierter und reproduzierbar bestimmen zu können und bisher unbekannte Allele zu beschreiben.

Die gültige Nomenklatur von bislang bekannten und neuen Genen, Allelen und Spezifitäten des HLA-Systems wird durch das WHO-Nomenklaturkomitee festgelegt. So wurden von 2000 – 2002 42 HLA-A, 79 HLA-B und 19 HLA-C, 52 HLA-DRB, ein HLA-DRA, ein HLA-DQA1, acht HLA-DQB1, ein HLA-DPA1 und sechs HLA-DPB1 Allele neu benannt (*Marsh et al.* 2002). Weiterhin wurden infolge genauerer molekularbiologischer Techniken inkorrekt bezeichnete Allele umbenannt, z.B. HLA-A*2416 in HLA*3108 bzw. es wurden falsch benannte Allele wie z.B. HLA-Cw*1301 entfernt. Die **ImMunoGeneTics** (IMGT)/HLA Sequence Database (*Robinson und Marsh* 2000) listet aktuell via internet (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>) die Gesamtheit aller HLA-Allele auf.

Bei serologisch definierten Merkmalen kann man individuelle Determinanten (Feinspezifitäten, Splits) von allgemeinen Determinanten (Hauptspezifitäten) unterscheiden. Das heißt, dass einige Spezifitäten bestimmte Epitope gemeinsam haben („public“), andererseits aber durch allelspezifische Epitope charakterisiert sind, die auf anderen Allelen nicht nachweisbar sind und somit durch Antikörper nicht weiter differenziert werden können („private“). Weiterhin gibt es im Bereich von HLA-B eine sogenannte supertypische (übergeordnete) Determinante, durch die HLA-B-Antigene einer Bw4- oder Bw6-Hauptgruppe zugeordnet werden können.

Unter den Klasse-I-Merkmalen wurden im Jahr 2002 250 HLA-A-Allele, 490 HLA-B-Allele und 119 HLA-Cw-Allele unterschieden. Diesen entsprachen auf serologischer Ebene 28 HLA-A-,

61 HLA-B- und 10 HLA-Cw-Antigene. Weiterhin wurden sechs HLA-E, ein HLA-F und 15 HLA-G Allele definiert. Somit ergab sich im Jahre 2002 eine Gesamtzahl von 881 offiziell benannten HLA-Klasse I-Allelen. (*Marsh et al. 2002*).

Im Bereich der Klasse-II-Merkmale konnten auf DNA-Ebene drei HLA-DRA-Allele und 315 HLA-DRB1-Allele unterschieden werden. Diesen entsprachen serologisch 21 HLA-DR-Antigene. Weiterhin wurden ein HLA-DRB2, 38 HLA-DRB3-Allele, die für das Antigen HLA-DR52 kodieren, 12 HLA-DRB4-Allele, die zu HLA-DR53 gehören, und 15 HLA-DRB5-Allele, die dem Antigen HLA-DR51 zuzuordnen sind, unterschieden (*Marsh et al. 2002*). Dabei sind DR52 mit DR3, 11, 12, 13 und 14, DR53 mit DR4, 7 und 9 sowie DR51 mit DR 15 und 16 (selten auch mit DR1) gekoppelt, wobei DR51, DR52 und DR53 supertypische Antigene darstellen (*Wassmuth 1995*). Schließlich wurden noch drei HLA-DRB6, ein HLA-DRB8 und ein HLA-DRB9 Allel definiert.

Bei den HLA-DQ-Merkmalen wurden 22 HLA-DQA1-Allele und 53 HLA-DQB1-Allele definiert. Serologisch sind 9 HLA-DQ-Antigene zu unterscheiden. Weiterhin findet man im Bereich von HLA-DP 20 HLA-DPA1-Allele und 99 HLA-DPB1-Allele, denen 6 zellulär definierte HLA-DPw-Merkmale gegenüberstehen. Mit den acht definierten HLA-DOA, acht –DOB, vier –DMA und sechs –DMB Allelen wurden im Jahr 2002 611 HLA-Klasse II-Allele unterschieden (*Marsh et al. 2002*).

Die Bezeichnung eines serologisch definierten HLA-Merkmals setzt sich aus dem Namen des Genortes und der Nummer des mit spezifischen Antikörpern (Spezifitäten) bestimmten Merkmals zusammen. Bei der Angabe der Nummerierung wird zunächst die individuelle Spezifitätennummer und in Klammern die allgemeine Spezifität angegeben, z.B. „HLA-A23(9)“. Die Einfügung eines „w“ zwischen Genortsbezeichnung und Spezifitätennummer charakterisiert die Spezifität als vorläufig. Das w in Bw4 und Bw6 dient der Abgrenzung von anderen HLA-B-Spezifitäten. HLA-C-Merkmale können durch das w von Komplementfaktoren abgegrenzt werden. Molekulargenetisch definierte Allele werden mit der Genortsbezeichnung und einer Allelnummer angegeben, beide durch ein Sternchen „*“ voneinander getrennt. Die Allelnummer umfasst üblicherweise vier Ziffern, wobei die ersten beiden die Hauptgruppe und die letzten beiden die Nebengruppe angeben, z.B. „HLA-A*2301“ (*Wassmuth 1995*).

1.5. HLA und Krankheit

Das HLA-System stellt neben dem Blutgruppensystem die stärkste Transplantationsbarriere da (*van Rood et al. 1977*) und eine Übereinstimmung in den HLA-Haplotypen ist vor allem für die Knochenmark- und Nierentransplantation eine bedeutende Voraussetzung. Daneben hat das HLA-System Bedeutung für die Antigenpeptidbindung und Präsentation. Durch den MHC-Polymorphismus ist gewährleistet, dass eine große Anzahl individuell unterschiedlicher HLA-Moleküle für die Peptidbindung zur Verfügung steht und sich ein Pathogen durch Mutationen nicht vollständig der Erkennung durch T-Lymphozyten entziehen kann (*Baenkler 1996*). Für

die Mehrzahl der Erkrankungen mit HLA-Assoziation wird eine immunologisch-autoreaktive Genese angenommen (*Tiwari und Terasaki 1985*). Um die Stärke potentieller HLA-Assoziationen zu bestimmen ist es notwendig, die Anzahl der Merkmale bei Erkrankten und Gesunden zu zählen, eine Vierfeldertafel zu bilden und dann das Kreuzprodukt (OR) zu berechnen. Für eine positive Assoziation gilt $OR > 1$ und für eine negative Assoziation $OR < 1$. Das Kreuzprodukt kann unter bestimmten Voraussetzungen als Näherungswert für das relative Risiko (RR) angesehen werden. Dieser statistische Wert kann zur Risikoabschätzung für ein Individuum, die Erkrankung während eines bestimmten Zeitraumes zu bekommen, genutzt werden (*Wassmuth 1995*).

Für über 40 Erkrankungen (z.B. Narkolepsie, insulinpflichtiger Diabetes mellitus, chronische Polyarthrit, Zöliakie) sind Assoziationen bzw. Kopplungen sowohl zu HLA-Klasse I- als auch HLA-Klasse II-Merkmalen bekannt (*Heard 1994, Svejgaard und Ryder 1979, Wegener 1994*). Da Familienuntersuchungen häufig nicht möglich sind, liegen für die meisten Erkrankungen Daten zur HLA-Assoziation vor. Herausragend ist die Assoziation von HLA-B27 mit der Spondylitis ankylosans (M. Bechterew) mit einem RR von 81 % (*Brewerton et al. 1973*) und die Assoziation des HLA-DR15:DQ6 Haplotyps mit der Narkolepsie und einem RR von 100 % (*Wasmuth 1995*).

Es existieren verschiedene Theorien über die pathogenen Mechanismen einer HLA-Assoziation. Dabei können HLA-Gene direkt für die Erkrankung verantwortlich sein oder bisher unbekannte Suszeptibilitäts- oder Resistenzgene, die im Kopplungsungleichgewicht zu HLA-Genen stehen, sind für die Assoziation bzw. Kopplung von HLA mit einer Erkrankung verantwortlich und die HLA-Merkmale wirken nur als Risikoindikatoren, ohne ursächlich an der Erkrankung beteiligt zu sein. Im Falle des direkten Einflusses von HLA-Genen werden u.a. folgende Hypothesen diskutiert (*Wassmuth 1995*):

1. Immunmodulation

Beeinflussung der Antigenbindung und T-Zell-Präsentation durch den Polymorphismus der HLA-Genprodukte.

2. Immunsuppression

Die Immunantwort führt zur Bildung von Suppressor-T-zellen mit antigenspezifisch erniedrigter Immunantwort, als Grundlage für HLA-abhängige Disposition oder Protektion.

3. Klonale Deletion

Eine HLA-abhängige Deletion von T-Lymphozytenklonen während der Maturation von T-Lymphozyten führt zu einer Lücke im Repertoire dieser Zellen gegen bestimmte Pathogene.

4. Molekulare Mimikry

Eine Epitopgemeinschaft zwischen dem HLA-Molekül und einem Fremdanigen kann zur Kreuztoleranz des als „eigen“ verkannten Fremdanigens führen oder zur Autoimmunreaktion gegen Zellen, die das entsprechende HLA-Molekül exprimieren.

5. Assoziation mit HLA-Haplotypen

Einem einzelnen HLA-Gen oder mehreren Genen in einer Kopplungsgruppe kommt pathologische Bedeutung zu.

6. Rezeptorhypothese

HLA-Moleküle können als Rezeptoren für Viren bzw. Medikamente fungieren (*Tiwari* und *Terasaki* 1985)

Die strukturellen Mechanismen der HLA-Assoziationen müssen durch molekularbiologische Untersuchungen, z.B. Bindungstests HLA-Molekül – Antigen (*Vogt* et al. 1994), aufgeklärt werden, um die Grundlagen für neue Konzepte in Diagnostik und Therapie HLA-assoziierter Erkrankungen zu schaffen.

1.5.1. HLA und Parodontitis

Eine mögliche Relation von HLA-Klasse II-Molekülen zu parodontpathogenen Bakterien (*Waasenaar* et al. 1998) oder HLA-Klasse I-Merkmalen zu parodontpathogenen Herpesviren (*Contreras* et al. 2000) könnte darin bestehen, dass die Peptidbindung an ein HLA-Molekül und die anschließende Bindung an den T-Zellrezeptor durch den hohen Polymorphismus des HLA-Systems beeinflusst wird. Eine weitere Ursache für eine mögliche Assoziation von HLA mit Parodontitis wäre durch molekulare Mimikry von HLA-Molekülen mit parodontpathogenen Bakterien denkbar (*Hirata* und *Terasaki* 1970). Schließlich könnten bestimmte HLA-Allele im Kopplungsungleichgewicht mit bisher unbekanntem genetischen Suszeptibilitäts- bzw. Resistenzfaktoren für Parodontitis stehen. In der Vergangenheit wurden Assoziationen von verschiedenen Parodontitisformen zu HLA-Klasse I- und II-Merkmalen untersucht (Tab. 1).

Terasaki et al. (1975) wiesen erstmals auf eine mögliche Assoziation des HLA-A Locus zur juvenilen und adulten Parodontitis hin. Es folgten weitere Studien mit meist serologischer HLA-Typisierungstechnik und Bewertung von Klasse-I-Merkmalen. Die ersten Arbeiten mit molekularbiologischer Typisierungstechnik wurden Mitte der neunziger Jahre des vorigen Jahrhunderts durchgeführt. Für kaukasische Patienten sind folgende HLA-Assoziationen bekannt:

Bei Patienten mit Erwachsenenparodontitis (AdP) wurden vermehrt die Klasse-I-Merkmale

HLA-A9 (*Balndin-Texier et al. 1986*) bzw. dessen Splits HLA-A23 und A24 sowie HLA-B35 (*Markgraf et al. 1983*) nachgewiesen. Unter den HLA-Klasse II-Merkmalen waren DR4, DR53 und DQ3 (*Alley et al. 1993, Dyer et al. 1997*) häufiger. Dagegen wiesen *Terasaki et al. (1975)* und *Kaslick et al. (1980)* ein geringeres Vorkommen von HLA-A2 nach.

Bei kaukasischen Patienten mit juveniler Parodontitis (JP) wurde eine positive Assoziation zu den HLA-Merkmalen A9, A28, B15 (*Reinholdt et al. 1977*) und A*33 und DR2 (*Cogen et al. 1986*) evaluiert, während unter englischen Patienten (*Cullinan et al. 1980*) keine Assoziationen von HLA-Merkmalen zur JP nachgewiesen wurden. Wie bei Erwachsenenparodontitis war HLA-A2 bei JP seltener (*Terasaki et al. 1975, Kaslick et al. 1980*).

Bei kaukasischen Patienten mit Rapid progressiver Parodontitis (RPP) war die Phänotypfrequenz für HLA-A9 höher (*Klouda et al. 1986, Amer et al. 1988*), während HLA-A10 seltener nachgewiesen wurde (*Amer et al. 1988*).

Weiterhin wurden HLA-Assoziationen in verschiedenen ethnischen Gruppen mit Parodontitis beschrieben. In einer ethnisch gemischten Gruppe mit Erwachsenenparodontitis waren die HLA-Merkmale B5 und A28 verringert (*Goteiner und Goldman 1984*). *Katz et al. (1987)* beschrieben eine positive Assoziation von HLA-DR4 zu 10 jüdischen Patienten mit RPP und wiesen erstmals auf eine vergleichbare Assoziation dieses Merkmals zur Rheumatoidarthritis hin. *Firatli et al. (1996)* fanden unter türkischen Patienten mit JP bzw. RPP vermehrt die HLA-Merkmale A9(24) und DR4 sowie eine verminderte Frequenz von HLA-A1 und -A2. *Bonfil et al. (1999)* bestätigten mit molekularbiologischer Typisierungstechnik eine positive Assoziation bestimmter HLA-DR4 Allele, die auch für Rheumatoidarthritis als auffällig beschrieben wurden, zur RPP, wobei die ethnische Zuordnung der Patienten uneinheitlich war. Untersuchungen zur HLA-Assoziation bei japanischen Patienten bezogen sich auf Patienten mit Early-Onset Periodontitis (EOP). Die Typisierungen wurden teilweise mit molekularbiologischen Techniken durchgeführt, beschränkten sich aber auf Klasse-II-Merkmale. *Ohyama et al. (1996)* fanden bei 24 EOP-Patienten mit PCR-RFLP eine vermehrte Frequenz der HLA-Allele DRB1*1401,*1501 und DQB1*0503,*0602 und im Kontrast zu *Bonfil et al. (1999)* wurden HLA-DRB1*0405 und HLA-DRB1*0401 vermindert nachgewiesen.

HLA-Typisierungen wurden auch bei Erkrankungen vorgenommen, die mit Parodontitis assoziiert vorkommen. So wurden bei 2 von 3 Patienten mit Papillon-Lefèvre-Syndrom die HLA-Allele DRB1*0406, *08032 sowie DQB1*0302 und *06011 nachgewiesen. Diese kommen unter der japanischen Normalbevölkerung mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:40 vor (*Nitta et al. 2000*). Cyclosporin bzw. Nifedipin induzierte Gingivahyperplasien bei Patienten mit erfolgter Nierentransplantation waren mit HLA-A19 assoziiert (*Margiotto et al. 1996*).

Die Expression von HLA-DP, DQ und DR auf Langerhanszellen konnte sowohl im oralen Gingivaepithel und im Taschenepithel nachgewiesen werden. HLA-DR war auch in oralen Keratinozyten nachweisbar (*Nunes et al. 1994*). Bei Parodontitis zeigten T-Lymphozyten in der Sulkusflüssigkeit eine wesentlich höhere HLA-DR Expression (Maß für ihre Aktivierung) als

Lymphozyten im peripherem Blut oder entzündetem Gingivagewebe (*Takeuchi et al. 1991*). Die Expression von MHC-II-Proteinen auf Endothelzellen, stimuliert durch humanes Gamma-Interferon, konnte durch Cysteinproteasen (Arg-gingipain und Lys-gingipain) von *P. gingivalis* inhibiert werden (*Yun et al. 1999*).

Tab. 1 Darstellung der Ergebnisse bisheriger Studien zur Assoziation von HLA-Antigenen bei verschiedenen Formen von Parodontitis. Die Pfeile verdeutlichen, ob ein Merkmal häufiger (↑) oder seltener (↓) gefunden wurde

Autoren	Jahr	Population	Diagnose/(N)	Typisierung	Assoziierte HLA-Merkmale
<i>Terasaki et al.</i>	1975	Kaukasier (USA)	JP (19) AdP (28)	CDC	A2 (↓) A2 (↓)
<i>Reinholdt et al.</i>	1977	Kaukasier (Dänemark)	JP (39) AdP (29)	CDC	A9 (↑), A28 (↑), B15 (↑) Keine Assoziation
<i>Kaslick et al.</i>	1980	Kaukasier (USA)	JP (33) AdP (41)	CDC	A2 (↓) A2 (↓)
<i>Cullinan et al.</i>	1980	Kaukasier (England) Negroide (Indien)	JP (12) JP (18)	CDC	Keine Assoziation B35 (↑)
<i>Marggraf et al.</i>	1983	Kaukasier (Deutschland)	Profunde P. (50)	CDC	A9 (↑), A23 (↑), A24 (↑), B35 (↑), B44, Cw4 (↑)
<i>Goteiner, Goldman</i>	1984	Kaukasier Negroide (England)	+ AdP (25)	CDC	B5 (↓), A28 (↓)
<i>Saxen u. Koskimies</i>	1984	Kaukasier (Finnland)	JP (19)	CDC	Keine Assoziation
<i>Cogen et al.</i>	1986	Kaukasier (USA)	JP (13)	CDC	DR2 (↑), A33 (↑)
<i>Klouda et al.</i>	1986	Kaukasier (England)	RPP (44)	CDC	A9 (↑), A24 (↑)
<i>Katz et al.</i>	1987	Juden (Israeli)	RPP (10)	CDC	DR4 (↑)
<i>Amer et al.</i>	1988	Kaukasier (England)	RPP (49)	CDC	A9 (↑), A10 (↓)
<i>Izumi et al.</i>	1990	Review	JP RPP	CDC	A2 (↓), A9 (↑) A9 (↑), DR2 (↑), DR4 (↑), DQw1 (↑)

Fortsetzung Tab. 1

<i>Alley et al.</i>	1993	Kaukasier (USA)	AdP (30)	CDC	DR4 (↑), DR53 (↑), DQ3 (↑)
<i>Shapira et al.</i>	1994	Juden (Non-Ashkenazi, Afrika)	LJP (11) schwere P. (15)	CDC	A9 (↑), B15 (↑) A9 (↑), B15 (↑)
<i>Takashiba et al.</i>	1994	Japaner	EOP + AdP (70) EOP+AdP (20) u. (40)	CDC PCR-RFLP	Keine Assoziation atypische <i>Bam</i> HI-Restriktionsstelle im DQB1-Gen
<i>Nakagawa et al.</i>	1996	Japaner	Familienuntersuchung RPP (1) LJP (2)	CDC	DRw52-DQ1
<i>Moses et al.</i>	1994	Negroide (Afro-Kariben)	JP (38)	CDC	A1 (↑), B22 (↑), DR7 (↑), A68 (↓), B5 (↓), DR2 (↓)
<i>Firatli et al.</i>	1996	Türken	JP (30) RPP (30)	CDC	A24 (↑), DR4 (↑), A1 (↓), A2 (↓) A9 (↑), DR4 (↑), A1 (↓), A2 (↓)
<i>Ohyama et al.</i>	1996	Japaner	EOP (24)	PCR-RFLP	DRB1*1401,*1501 (↑) DQB1*0503,*0602 (↑) DRB1*0405,*0401 (↓) DRB1*1501-DQB1*0602 (↑)
<i>Dyer et al.</i>	1997	Kaukasier (USA)	AdP (60)	CDC	DR4 (↑), DR53 (↑), DQ3 (↑)
<i>Bonfil et al.</i>	1999	Gemischt (Frankreich)	RPP (12)	PCR-SSO	DRB1*0401,*0404, *0405,*0408 (↑)
<i>Hodge et al.</i>	1999	Kaukasier (UK)	G-EOP	PCR-RFLP	Keine Assoziation zu atypische <i>Bam</i> HI-Restriktionsstelle im DQB1-Gen
<i>Takahashi et al.</i>	2001	Japan	G-EOP (50) L-EOP (18)	PCR-FRLP	DQB1*0503 (↑)

CDC, Komplement abhängige Zytotoxizität; RFLP, Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus; SSP, sequenzspezifische Primer; SSO, sequenzspezifische Oligonukleotide; PCR, Polymerase-Kettenreaktion; JP, juvenile Parodontitis; LJP, lokalisierte juvenile Parodontitis; AdP, Erwachsenenparodontitis; RPP, rapid progressive Parodontitis; G-EOP, generalisierte frühbeginnende Parodontitis; L-EOP, lokalisierte frühbeginnende Parodontitis.

2. Zielstellung

Verschiedene Studien wiesen nach, dass genetische Faktoren prädisponierend für chronische und aggressive Parodontitisformen sein könnten. In diesem Zusammenhang wurden auch

Assoziationen von HLA-Merkmalen zu verschiedenen Parodontitisformen nachgewiesen. Die Ergebnisse dieser Assoziationsstudien sind bei der Bewertung der Gesamtheit der Arbeiten teilweise inkonsistent. Dafür verantwortlich könnten Populations- bzw. ethnische Unterschiede in der Verteilung der HLA-Merkmale, die Verwendung unterschiedlicher Kriterien für die Definition der Patienten- und Kontrollgruppen, eine zu geringe Anzahl von Erkrankten bzw. Kontrollprobanden mit schwierigem Nachweis seltener HLA-Merkmale sowie die überwiegend serologische Bestimmung der HLA-Genprodukte mit unsicherem Nachweis von Klasse-II-Merkmalen sein. Bis zum Beginn dieser Arbeit existierte nur eine deutsche Studie mit Beschränkung auf den serologischen Nachweis von Klasse-I-Merkmalen bei Patienten mit schwerer Parodontitis.

Das Ziel dieser Arbeit bestand deshalb darin, die Verteilung von HLA-Klasse I- und II-Merkmalen bei deutschen Patienten (Kaukasier) mit generalisierter aggressiver Parodontitis (AP) und chronischer Parodontitis (CP) zu untersuchen. Erstmals sollten dabei auch Assoziationen von HLA-Homozygoten und –Kombinationen zur Parodontitis berücksichtigt werden. Zur HLA-Typisierung sollten serologische und zur Absicherung, Erweiterung und Präzisierung molekularbiologische HLA-Typisierungstechniken angewandt werden. Im Unterschied zu anderen Studien sollten parodontitisfreie Probanden mit unzureichender Mundhygiene (API > 30 %) als Kontrollgruppe rekrutiert werden. Dadurch würde ein höherer Kontrast zwischen „erkrankt“ und „gesund“ erreicht werden. Eine zusätzlich HLA-typisierte Gruppe von Gelegenheitsblutspendern ohne parodontale Untersuchung würde dagegen die Normalverteilung repräsentieren. Durch den Vergleich der beiden Gruppen mit Parodontitis auf der einen Seite und der parodontitisfreien Kontrollgruppe auf der anderen Seite sollte ein HLA-abhängiges Parodontitisrisiko berechnet und diskutiert werden.

Die immunologischen Grundlagen für HLA-Assoziationen zur Parodontitis sind bisher unbekannt. Eine HLA-abhängige Bindung parodontalpathogener Peptide oder molekulare Mimikry von HLA-Molekülen mit bakteriellen Peptiden könnte dabei von Bedeutung sein. Deshalb bestand ein weiteres Ziel der Arbeit darin, HLA-Assoziationen zu fünf in einer Gesamtparodontitisgruppe (AP + CP) molekularbiologisch nachgewiesenen parodontalen Markerkeimen nachzuweisen und zu diskutieren.

3. Material und Methode

3.1. Patienten mit Parodontitis und Kontrollprobanden

Zur Evaluierung Parodontitis assoziierter HLA-Merkmale wurden 50 Patienten mit Generalisierter Aggressiver Parodontitis (AP) und 102 Patienten mit Chronischer Parodontitis (CP) klinisch-parodontologisch untersucht und HLA typisiert. Als Kontrollgruppe und zur Erhöhung des Kontrastes zwischen erkrankt und gesund wurden 102 Probanden ohne

Parodontitis klinisch und hinsichtlich auffälliger HLA-Marker untersucht. 157 Gelegenheitsblutspender, bei denen keine parodontale Befundung erfolgte, repräsentierten hinsichtlich der HLA-Marker die Normalverteilung. Alle Patienten und Kontrollgruppen waren kaukasischer Abstammung, untereinander nicht verwandt und hatten keine Allgemeinerkrankungen mit bekannter Assoziation zur Parodontitis bzw. zu bestimmten HLA-Markern. Alle Patienten und Kontrollprobanden wurden mündlich und anhand eines Informationsblattes (siehe Anlage) über die Ziele der vorliegenden Studie aufgeklärt. Eine Blutabnahme erfolgte erst nach Unterzeichnung der Einverständniserklärung (siehe Anlage).

Von 4131 Patienten mit verschiedenen parodontalen Erkrankungen, die die Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg aufsuchten, wurden über eine Periode von 4 Jahren 50 Patienten mit AP nach folgenden Mindestkriterien (*Tonetti* und *Mombelli* 1998) ausgewählt:

- Erkrankungsbeginn vor dem 35. Lebensjahr (Es wurden auch Patienten in die Studie eingeschlossen werden, die zum Zeitpunkt der HLA-Typisierung älter als 35 Jahre waren, wenn anamnestische Angaben des Patienten und/oder ältere Röntgenbilder eindeutig erkennen ließen, dass die Erkrankung vor dem 35. Lebensjahr begann und sich relativ rasch entwickelte.)
- Patient war allgemeinmedizinisch gesund.
- Mindestens 8 Zähne hatten einen klinischen Attachmentverlust (CAL) von 4 mm und mehr, mindestens 3 der betroffenen Zähne waren keine ersten Molaren oder zentralen Inzisivi.
- Sondierblutung an den betroffenen Parodontien
- Zahnlockerung
- häufig mehr vertikaler als horizontaler Knochenverlust im Röntgenbild erkennbar
- häufig Missverhältnis zwischen der Menge an mineralisierter Plaque und dem Ausmaß der Gewebedestruktion
- geringere Akkumulation mineralisierter Plaque im Vergleich zur chronischen Parodontitis

Die Bestimmung der Sondiertiefen (Distanz Taschenfundus – marginale Gingiva = PD) und des klinischen Attachmentverlustes (Distanz Taschenfundus – Schmelz-Zementgrenze = CAL) erfolgten bei AP-Patienten in Sechspunktmessung mit einer parodontalen Sonde in mm Skalierung (Parodontometer PCPUNC 156, Fa. Hu-Friedy, Chicago, Illinois, USA), wobei nur die Maximalwerte beider Größen pro Zahn in die Untersuchung gingen (*Beck et al.* 1996). 10 – 30 sec nach der Sondierung wurden die Zähne auf provozierte Reizblutung bewertet und die prozentuale Anzahl von Zähnen mit Sondierblutung (BOP %) berechnet. Zur Beurteilung der Mundhygiene wurde der approximale Plaqueindex (API) (*Lange et al.* 1977) bestimmt.

Dazu wurde mit einem Plaquerevelator (Mira-2-Ton, Hager & Werken, Duisburg) die Plaque innerhalb der Approximalräume des I. und III. Quadranten von oral sowie des II. und IV. Quadranten von vestibulär angefärbt. Nach einmaligem Ausspülen wurde bewertet, ob an den untersuchten Stellen Plaque vorlag oder nicht. Das Ergebnis wurde anschließend in Prozent angegeben (Anzahl positiver Messpunkte / Anzahl vorgenommener Messungen x 100). Die Erhebung der Messdaten erfolgte für alle AP-Patienten vor der Initialtherapie.

Die Patienten mit chronischer Parodontitis (CP) wurden aus einer Gesamtkohorte von 6800 Patienten, die 2 Zahnarztpraxen (Burg, Bremen) über eine Periode von 4 Jahren besuchten, nach folgenden Kriterien selektiert (*Gautsch 2002*):

- Alter \geq 30 Jahre
- Patient war allgemeinmedizinisch gesund
- mindestens 10 Zähne waren vorhanden
- mindestens 5 Zähne hatten einen CAL von 4 mm und mehr
- Sondierblutung
- Zahnlockerung
- häufig mehr horizontaler als vertikaler Knochenverlust im Röntgenbild erkennbar
- signifikante Mengen mineralisierter Plaque mit eindeutiger Beziehung zur Gewebedestruktion
- langsamer Verlauf

Die Auswahl der Patienten mit chronischer Parodontitis erfolgte retrospektiv erst nach systematischer PAR-Therapie, um anhand des Therapieverlaufes Patienten mit aggressiver Parodontitis, die in der Regel ungenügend auf eine alleinige mechanische Therapie ansprechen, mit hoher Sicherheit ausschließen zu können. Die zur Definition der CP-Gruppe angeführten Sondiertiefen und Werte für den klinischen Attachmentverlust wurden mit der WHO-Parodontalsonde (Nr. DB 767, Fa. Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) in 4 Punktmessung 2–4 Wochen nach der Initialtherapie erhoben, wobei nur die Maximalwerte für PD und CAL/Zahn in die Berechnungen eingingen. Zur Bewertung der Mundhygiene und gingivalen Entzündung wurde der API und der modifizierte Sulkus-Blutungs-Index (SBI) nach *Mühlemann* und *Son* (1971) erhoben. Beim SBI wurde durch schonendes Ausstreichen des gingivalen Sulkus im I. und III. Quadranten von oral sowie im II. und IV. Quadranten von vestibulär nach ca. 30 Sekunden das Auftreten einer Blutung beurteilt. Die positiven Resultate wurden in Prozent pro Patient angegeben (Summe der positiven Blutungspunkte / Anzahl vorgenommener Messungen x 100).

Die 102 Kontrollpatienten ohne Parodontitis (NP) wurden aus 2 Zahnarztpraxen (Burg und

Bremen) aus dem gesamten Patientengut (N = 6800) mit Hilfe eines Statistikmoduls (Diagnose: Gingivitis) sowie aus dem Patientengut der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie über einen Zeitraum von 5 Jahren nach folgenden Kriterien evaluiert:

- Alter \geq 38 Jahre
- Proband allgemeinmedizinisch gesund
- Sondiertiefe \leq 3,5 mm
- Rezession von maximal 4 mm auf oralen oder fazialen Flächen nicht durch Parodontitis bedingt
- API > 30%, SBI > 10%
- Röntgenologisch fehlender horizontaler und/ oder vertikaler Knochenabbau

Gezielt wurden Patienten mit unzureichender Mundhygiene ausgewählt. Zur Bewertung der Mundhygiene und der Gingivaentzündung wurden vor der Initialtherapie der API und der modifizierte SBI ermittelt. Die Bestimmung von PD und CAL erfolgten mit einer Parodontalsonde nach WHO – Empfehlung (Nr. DB 767, Fa. Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) in Sechspunktmessung, wobei nur die Maximalwerte/Zahn in die Mittelwertberechnung eingingen.

Die 157 HLA typisierten Blutspender waren nach den „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“ (*Bundesministerium für Gesundheit* 2000) zur Blutspende zugelassen. Insbesondere Probanden mit HIV 1 oder 2 Infektion oder jeder Art von Infektion mit Hepatitisviren wurden von der Blutspende ausgeschlossen. Eine parodontologische Untersuchung wurde nicht durchgeführt

3.2. Parodontitispatienten mit Nachweis von fünf parodontalen Leitkeimen

In einer Gesamtgruppe von 68 Patienten mit generalisierter Parodontitis (35 chronisch, 33 aggressiv, mindestens 30% der Zähne zeigten einen Attachmenverlust von 4 mm und mehr), die die Poliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie der Martin-Luther Universität aufsuchten (*Reichert et al.* 2005), wurde überprüft, ob eine subgingivale Infektion mit *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.), *Porphyromonas gingivalis* (P.g.), *Prevotella intermedia* (P.i.), *Tannerella forsythensis* (T.f.) und *Treponema denticola* (T.d.) vorlag. Dazu wurden bei jedem Patienten nach supragingivaler Zahnreinigung und relativer Trockenlegung jeweils aus dem Parodont mit der höchsten Sondiertiefe jedes Quadranten subgingivale Plaqueproben mit sterilen Papierspitzen entnommen. Anschließend wurden diese in einem

Eppendorfröhrchen gepoolt. Der molekularbiologische Nachweis der fünf Markerkeime erfolgte durch die Fa. Hain Diagnostika, Nehren, Deutschland mit dem micro-Ident® Test nach DNA-Isolierung, Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte mit PCR und reverser Hybridisierung (PCR-rSSO). Die Nachweisgrenze (cutt-off) betrug für A.a. (10^3 genome equivalents) und für P.g., P.i., T.f. und T.d. 10^4 genome equivalents. Alle Patienten wurden zusätzlich HLA-Klasse-I und -II typisiert und die klinischen Parameter API, BOP, PD, CAL sowie der Attachmentverlust an der Probenentnahmestelle (CAL_{Bakt}) bestimmt.

3.3. Methodik der HLA-Klasse I- und II-Typisierung

Die HLA-Typisierung für Klasse I- und II-Merkmale erfolgte standardisiert nach dem National Institute of Health (NHI, Bethesda/USA) im interdisziplinären HLA-Labor (GHATT) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Verantwortung des damaligen Leiters des Labors, Herrn Dr. rer. nat. Helmut KG. Machulla. Die mit der Neuzertifizierung des HLA-Labors verbundenen Qualitätskontrollen wurden jährlich durch das Institut für Standardisierung und Demonstration in Medizinischen Laboratorien (INSTAND e.V., Düsseldorf, Deutschland) und vom „International DNA Exchange, Tissue Typing DNA Laboratory“ (University of California, Los Angeles, USA) vorgenommen. Die Bestimmung der HLA-Klasse I-Marker erfolgte serologisch und zur Sicherung und Erweiterung der Befunde zusätzlich molekularbiologisch. Da der serologische Nachweis von HLA-Klasse II-Merkmalen generell unsicher ist, wurden HLA-DRB1, -DRB3/4/5 und -DQB1 in der Regel nur molekularbiologisch nachgewiesen. Die Kohorten wurden als Gesamtgruppe ausgewertet (*Machulla et al. 2002*) und getrennt für Frauen und Männer (*Reichert et al. 2003*).

3.3.1. Serologische Typisierung der HLA-A, -B und -Cw Merkmale

Die serologische Bestimmung der HLA-Antigene A, B, Cw erfolgte auf der Basis des Mikrolymphozytotoxizitätstest (MLCT) nach *Terasaki* und *McClelland* (1964). Da HLA-Klasse I-Merkmale in hoher Dichte auf Lymphozyten vorkommen und Lymphozyten relativ unkompliziert aus dem peripheren Blut gewonnen werden können, stellen sie die geeignetsten Zellen zur serologischen HLA-Typisierung da. Jedem Patienten und den Probanden der Vergleichsgruppen wurden mit Monovetten (Fa. Saarestedt, 9 NC/10 ml) 20 ml Venenblut entnommen bei gleichzeitiger Versetzung mit gerinnungshemmenden Natriumzitrat. Die Lymphozytenpräparation erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation nach dem Prinzip von *Böym* (1968). Das Zitratblut wurde dazu mit isotonischer Pufferlösung (PBS, Fa. Bica, Frankfurt/O., Deutschland) im Verhältnis 3 Teile Blut 7 Teile Puffer verdünnt und im Verhältnis 1:1 auf eine Gradientenflüssigkeit mit der Durchschnittsdichte von Lymphozyten (Lymphoprep, Dichte = $1,076\text{g/cm}^3$, pH = 7,4; Biotest Dreieich, Deutschland) überschichtet und in 15-ml-

Glaszentrifugenröhrchen zu jeweils 4 ml vorgelegt. Dieser Ansatz wurde dann 20 Minuten bei 3200 U/min [ohne Bremse] (Rotana-Zentrifuge AP, Typ 4302, Fa. Hettich, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert. Durch die Zentrifugation lagerten sich die Lymphozyten, Thrombozyten und z. T. Monozyten an der Grenze zwischen Plasma und Trennmedium als trübe Schicht an, während die Erythrozyten auf Grund ihrer hohen Dichte und durch die durch Ficoll geförderte Agglutination auf den Boden des Röhrchens sedimentierten. Der Lymphozytenring wurde anschließend mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in ein weiteres Zentrifugationsröhrchen transferiert, mit 10 ml PBS aufgefüllt und bei 900 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Die im Überstand verbliebenen Thrombozyten wurden dekantiert und das verbliebene Lymphozytenpellet in ca. 100 µl PBS resuspendiert. 1 µl der Zellsuspension wurde dann in eine leere Kavität der Mikrotestkammer getropft und nach Zusatz von 2 µl Ethidiumbromid/Acridinorange-Färbelösung und 2 µl Hämopath 3 Minuten inkubiert und unter dem invertierten Fluoreszenzmikroskop auf Vitalität und Zellzahl überprüft. Bei einer Vitalität von mindestens 90 % wurden die Zellen auf ca. 2000 Zellen/µl eingestellt (geschätzt) und damit für die Typisierung der HLA-Klasse I-Merkmale vorbereitet.

Das Prinzip des MLCT besteht darin, dass der Nachweis einzelner HLA-Klasse I-Spezifitäten durch Inkubation mit Antikörpern (Alloantikörper) in Gegenwart von Komplement zur Lyse der Testzellen (zytotoxische Reaktion) im Falle der Anwesenheit der korrespondierenden Spezifität führt. Der anschließend zugegebene Farbstoff dringt in die lysierte Zelle ein und färbt die DNA (positive Reaktion). Tragen die Lymphozyten das HLA-Merkmal nicht, unterbleibt die zytotoxische Reaktion, so dass der Farbstoff nicht in die Zelle eindringen kann (negative Reaktion). In der Durchführung wurden kommerzielle Typisierungssets der Firmen Biotest (Italia-ABC 144, Biotest AG, Dreieich), BAG (BAG-ABC 144, BAG, Lich) und One Lambda (BmT-C, One Lambda, Krefeld) benutzt. Insgesamt enthielten die Testkammern 142 standardisierte HLA-Klasse I-Antiseren, wobei jede Anti-HLA-Spezifität durch mindestens zwei Antiseren vertreten war. Ein multispezifisches Antilymphozytenserum diente als Positiv-Kontrolle sowie ein antikörperfreies, nichtzytotoxisches AB-Serum als Negativ-Kontrolle für den MLCT.

Jede Kavität war mit 1 µl Testserum beschickt und zum Schutz vor Verdunsten mit 5 µl Paraffinöl überschichtet. Die Testkammern wurden tiefgefroren bei -20 °C aufbewahrt und erst unmittelbar vor Testbeginn 20 min bei Raumtemperatur aufgetaut.

Von der vorbereiteten Lymphozytensuspension wurde mit Hilfe eines Dispensers (PB 600 Dispenser, Fa. Hamilton, Bonaduz AG, Schweiz) jeweils 1 µl in das unter dem Paraffinöl befindliche Antiserum übertragen. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Kammern für 30 Minuten bei Raumtemperatur (23 °C) (Inkubator WTC Binder, Tuttlingen). Mit einem Mehrfachdispenser (Terasaki Dispenser, Fa. Hamilton, Bonaduz AG, Schweiz) wurden dann pro Kavität 5 µl Kaninchenkomplement zugesetzt und der Ansatz für weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbung der Testkammern erfolgte durch 2 µl

Ethidiumbromid/Acridinorange-Lösung in PBS (siehe Anlage) pro Kavität mit Mehrfachdispenser. Die Kontrastierung des Hintergrundes wurde mit 2 µl Hämoglobin (Hämopath, Pharma Dessau) vorgenommen. Ethidiumbromid als Letalfarbstoff diffundiert in die lysierte Zelle und färbt die DNA. Unter UV-Licht emittiert Ethidiumbromid nur rotes Licht, so dass die Positivreaktion durch Rotfärbung unter dem invertierten Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird. Der Vitalfarbstoff Acridinorange wird durch Pinocytose nur von vitalen Zellen aufgenommen und intrazellulär angereichert. Unter UV-Anregung emittiert der Farbstoff nach UV-Bestrahlung grünes Licht, die Negativreaktion wird somit durch Grünfärbung angezeigt. Die Bewertung der einzelnen Reaktionen erfolgte am invertierten Fluoreszenzmikroskop (CK2, Fa. Olympus, Hamburg; Okular CWHK 01x/18L, Objektiv A 10 PL [10x] unter Auflicht mit Fluoreszenzanregung bei $\lambda=509$ nm. Die Reaktionsstärke in jeder Kavität wurde aus dem Verhältnis lysierter zu vitalen Zellen ermittelt und verschiedenen Reaktionsstufen zugeordnet (Tab. 2)

Tab. 2 Bewertung der Reaktionsstufen beim Mikrolymphozytotoxizitätstest (MLCT)

% Anteil lysierter Lymphozyten	Score (Reaktionsstärken)	Bedeutung der Reaktion
0 bis 10	1	negativ
11 bis 30	2	fraglich negativ
31 bis 40	4	fraglich positiv
41 bis 80	6	positiv
81 bis 100	8	stark positiv
nicht ablesbar	0	

Die Score-Werte 4, 6 und 8 wurden als positiv bewertet. Ein HLA-Merkmal galt dann als nachgewiesen, wenn gleichzeitig bis auf das zweite Merkmal dieses Locus alle anderen ausgeschlossen werden konnten.

3.3.2. Molekularbiologischer Nachweis von HLA-A, -B, -Cw, -DRB1, -DRB3/4/5 und -DQ

3.3.2.1. Prinzip der molekularbiologischen HLA-Typisierung

Der Einsatz molekularbiologischer Verfahren kennzeichnet den Übergang vom Phänotyp zum Genotyp in der HLA-Typisierung. Molekularbiologische Verfahren zeichnen sich gegenüber den serologischen durch ihre reproduzierbare Genauigkeit und vor allem ihre erweiterten Differenzierungsmöglichkeiten aus. Dadurch wurde z.B. die Definition neuer Allele möglich. Voraussetzung für die molekularbiologische HLA-Typisierung ist die In-vitro Vermehrung von

DNA-Molekülen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis et al. 1997, Saiki et al. 1988). Die Vermehrung der Ausgangs-DNA (Amplifikation) beruht auf drei sich zyklisch wiederholenden Prozessen. Zunächst wird der zu amplifizierende DNA-Abschnitt durch Hitze ($\geq 95\text{ }^{\circ}\text{C}$) aufgespalten und in eine Einzelstrang-DNA überführt (Denaturierung). Synthetische einsträngige Oligonucleotide dienen dann als Starter-Primer und lagern sich nach Abkühlung auf ca. $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ an komplementäre Sequenzen der Matrizen-DNA (Annealing) an. Dann erfolgt eine Inkubation mit Taq-Polymerase und den vier Desoxyribonukleotid-Triphosphaten (dNTP), so dass die Synthese neuer komplementärer Tochter-DNA-Stränge erfolgen kann. Durch die Thermostabilität der Taq-Polymerase wird die je Zyklus erforderliche Zugabe einer DNA-Polymerase vermieden und die PCR kann automatisiert ablaufen. Nach jedem Zyklus wird die Matrizen-DNA fast zu 100 % verdoppelt. Die Linearität dieses Zusammenhanges gilt jedoch nur für eine beschränkte Anzahl von Zyklen, denn der Verbrauch von dNTP und die abnehmende Aktivität der Polymerase wirken selbstlimitierend. Außerdem beeinflusst die Fragmentlänge, die Basenzusammensetzung, das Temperaturprofil u.a. die Effizienz der PCR. Trotzdem liegt am Ende der etwa 25 Zyklen eine millionenfache Kopie der Ausgangs-DNA vor.

Bei der vorliegenden Bestimmung der HLA-Merkmale wurde die PCR-SSP (SSP = sequenzspezifische Primer) angewandt. Die Differenzierung von HLA-Allelen bzw. Allelgruppen erfolgt durch den Einsatz Allel- bzw. Gruppenspezifischer Primer auf der Ebene der Amplifikation, denn diese läuft nur bei Komplementarität zwischen dem 3'-Ende des Primers und der Zielsequenz ab (Olerup et al. 1992). Nur bei abgelaufener Amplifikation kann ein für ein bestimmtes HLA-Allel bzw. Allelgruppe sequenzspezifisches PCR-Produkt nachgewiesen werden.

3.3.2.2. Isolierung der Ausgangs-DNA

Die für die HLA-Typisierung benötigte DNA wurde aus Zitratblut mit der Aussalzmethode nach Miller et al. (1988) gewonnen. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 4000 U/min wurden die kernhaltigen Zellen aus dem Citratblut abgetrennt und der Plasmaüberstand verworfen. Durch Zugabe von 45 ml 1 x Red Cell Lysis Buffer (RCLB; siehe Anlage) wurden die noch vorhandenen Erythrozyten lysiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde den sedimentierten kernhaltigen Zellen erneut RCLB zugesetzt und diese erneut zentrifugiert. Diese „Waschung“ wurde bis zur restlichen Entfernung der Erythrozyten 2- bis 3-mal wiederholt. Die so präparierten kernhaltigen Zellen wurden in ein Eppendorf Cap (Fa. Eppendorf, Hamburg) pipettiert, in 1 ml 1 x RCLB resuspendiert und bei 14000 U/min eine Minute lang zentrifugiert (Eppendorfsentrifuge, Fa. Eppendorf, Hamburg). Nach Absaugen des Überstandes erfolgte die Zugabe von 200 μl 0,5 x RCLB und 50 μl Proteinase K-Lösung (Fa. Boehringer, Mannheim) zum Verdau der kernhaltigen Zellen. Außerdem wurden 30 μl SDS-

Lösung (Sodium Dodecyl Sulfat 10 %, Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg) zugegeben und das Zellpellet 1 Stunde lang bei 65 °C im Eppendorf-Thermomixer inkubiert. Durch den Zusatz von 100 µl gesättigter NaCl-Lösung (Wasserentzug durch Salze) und anschließender Inkubation für 30 Minuten bei 4 °C wurden die Proteine ausgefällt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 1 Minute bei 14000 U/min wurde die im Überstand befindliche DNA in ein Saarestedt Cap mit 750 µl vorgelegtem Isopropanol (Laborchemie Apolda GmbH) überführt und die DNA unter vorsichtigem Schwenken ausgefällt. Das als weißer Faden sichtbare DNA-Pellet wurde erneut für 3 Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert und nach Dekantieren des Überstandes in 200 µl Aqua dest. (Pharmacia & Upjohns AS, Halden/Norwegen) resuspendiert. Abschließend wurde das DNA-Pellet für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und bei -72 °C gelagert. Dadurch war es auch für spätere eventuell detailliertere Untersuchungen zugänglich.

Der DNA-Gehalt bzw. Reinheitsgrad wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) am Spektrometer (UV/VIS-Spektrometer, Fa. Pharmacia, Uppsala) bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm entsprach die Extinktion einer DNA-Probe von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Verunreinigungen durch Proteine wurden berücksichtigt, indem deren Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen wurde und mit der optischen Dichte bei 260 nm ins Verhältnis gesetzt wurde. Wenn der Reinheitsindex der DNA (OD_{260} / OD_{280}) kleiner 1,8 war, wurde die Konzentration auf 50 ng/µl eingestellt.

3.3.2.3. Durchführung der PCR-Amplifikation mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP)

Für die Typisierung der HLA-Klasse I-Merkmale wurden kommerzielle Primer-Kits der Firmen Deutsche Dynal (Hamburg) und CTS (Universität Heidelberg) eingesetzt. Für die Klasse II-Typisierung standen die Primer-Kits HLA-DRB/DQB1 der Firmen BAG (Lich) und One Lambda (Conaga, USA) sowie die Primer-Kits HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5 und DQB1 der Firma Deutsche Dynal GmbH (Hamburg) zur Verfügung.

Die für den Reaktionsansatz notwendigen Materialien wurden in einem Mastermix und Primermix bereitgestellt. Der Mastermix bestand aus jeweils 3 µl PCR-Lösung (mit dNTPs zu gleichen Anteilen; s. Anlage), 2 µl der Proben-DNA mit 100 ng DNA-Gehalt und 0,1 µl Taq-Polymerase (0,4 Units AmpliTaq, AGS, Heidelberg). Der Primermix enthielt jeweils ein spezifisches Primerpaar, das die Amplifikation von DNA-Abschnitten bestimmter HLA-Allele bzw. Allelgruppen gestattet, sowie ein Kontroll-Primerpaar, das an nichtallelische Sequenzen bindet. Pro PCR-Reaktion wurden aus einem Set verschiedener Primermischungen jeweils 5 µl des Primermixes einer entsprechenden HLA-Spezifität in einem Eppendorf Cap vorgelegt und 5 µl PCR-Mastermix hinzugefügt. Für die Amplifikationsreaktion wurde ein programmierter Thermocycler (Gene Amp 9600, Perkin Elmer, Weiterbach) verwendet mit folgenden Temperaturzyklen:

- 2 Minuten Denaturierung bei 94 °C
- 10 Zyklen mit jeweils 10 sec bei 94 °C (Denaturierung) und 60 sec bei 65 °C (Annealing und Extension)
- 20 Zyklen mit 10 sec bei 94 °C (Denaturierung), 50 sec bei 65 °C (Annealing und Extension), 30 sec bei 72 °C (Extension)

3.3.2.4. Nachweis der Amplifikate mit der Gelelektrophorese

Der Nachweis von HLA-Allel bzw. HLA-gruppenspezifischer Amplifikate erfolgte mit horizontaler Agarosegelelektrophorese. Dabei handelt es sich um ein biochemisches Analyseverfahren, bei dem organische Verbindungen mit Dipolcharakter aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Stärke des elektrischen Feldes, der Größe und Ladung des Analyten sowie der Porengröße des aus vernetzten Molekülen bestehenden Trägers ab.

DNA-Fragmente sind negativ geladene Makromoleküle, die nach Anlegen einer elektrischen Spannung in einem Laufpuffer (pH = 7,2) in Richtung Anode wandern und nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Parallel mit den PCR-Produkten aufgetragene Längenstandards aus DNA-Fragmenten bekannter Größe bzw. der Vergleich der Laufweite der verschiedenen Amplifikate ermöglichen die Ermittlung der Größe der PCR-Produkte. Somit kann beurteilt werden, ob eine HLA-sequenzspezifische Amplifikation stattgefunden hat.

Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurden 3 g Agarose (Agarose N, Pharmacia, Uppsala) in 100 ml 1 x TBE-Laufpuffer (s. Anlage) unter Bestrahlung in einer Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen auf 60 °C wurden 100 ml des Gels 30 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Fa. Merck, Darmstadt) zugesetzt. Durch den Zusatz von Ethidiumbromid als DNA-Farbstoff war eine Auswertung der Elektrophorese unter UV-Licht möglich. Das Gel wurde in Gelträger gegossen und noch vor der Erstarrung des Gels mit Kämmen (24 Vertiefungen pro Kamm) Slots für die Aufnahme der Amplifikate gebildet. Nach der Erstarrung des Agarosegels konnte dieses in eine mit Puffer gefüllte und mit Elektroden versehene Elektrophoresekammer (10 x 20 cm, Pharmacia Biotech, Fa. Biometra, Berlin) überführt werden. Die DNA-Amplifikate wurden mit jeweils 2 µl Blue-Ethidiumbromid-Marker (siehe Anlage) versetzt und in die Slots des Agarosegels eingefüllt. Die Elektrophorese lief unter einer Spannung von 100 V für ca. 15 Minuten. Die anschließende Auswertung erfolgte unter UV-Licht-Bestrahlung an einem Transilluminator (Gel Print 1000i+, MWG Biotech, Ebersberg).

3.3.2.5 Differenzierungsgrad der HLA-Typisierung

Mit der serologischen Technik (MLCT) konnten HLA-Klasse I-Merkmale sowie deren Splits nachgewiesen werden. Der Nachweis der Merkmale HLA-Cw und der Splits HLA-B*44 (12) und -B*45 (12) war durch unzureichende Antikörperspezifitäten unsicher. Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Antiseren könnten eine weitere Fehlerquelle darstellen. HLA-A*68 und -A*69 wurden zu HLA-A*28 sowie HLA-B*64 und -B*65 zu HLA-B*14 zusammengefasst. HLA-Cw*blank konnte zum Zeitpunkt der Arbeit nicht weiter in HLA-Cw*12-18 aufgelöst werden.

Insgesamt wurden mit MLCT und PCR-SSP 20 HLA-A, 40 HLA-B-, 9 HLA-Cw-, 13 HLA-DRB1, je 1 HLA-DRB3*, -DRB4* und -DRB5* Merkmal sowie 9 HLA-DQB1 Merkmale nachgewiesen (Tab. 3).

Tab. 3 Darstellung der untersuchten HLA-Merkmale. Die serologischen Hauptmerkmale sind jeweils in Klammern angegeben. HLA-DRBblank* bedeutet, dass keines der Supermerkmale DRB3*/DRB4*/DRB5* nachweisbar war

HLA-A	HLA-B			HLA-Cw	HLA-DR	HLA-DQ
A*01	B*51 (5)	B*50 (21)	B*73	Cw*01	DRB1*01	DQB1*05 (1)
A*02	B*52 (5)	B*54 (22)	B*78	Cw*02	DRB1*15 (2)	DQB1*06 (2)
A*03	B*07	B*55 (22)		Cw*03	DRB1*16 (2)	DQB1*02
A*23 (9)	B*08	B*56 (22)	Bw4	Cw*04	DRB1*03	DQB1*0301 (7)
A*24 (9)	B*44 (12)	B*27	Bw6	Cw*05	DRB1*04	DQB1*0304 (7)
A*25 (10)	B*45 (12)	B*35		Cw*06	DRB1*11 (5)	DQB1*0302 (8)
A*26 (10)	B*13	B*37		Cw*07	DRB1*12 (5)	DQB1*0303 (9)
A*34 (10)	B*14	B*60 (40)		Cw*08	DRB1*13 (6)	DQB1*0308 (9)
A*66 (10)	B*62 (15)	B*61 (40)		Cw*blank	DRB1*14 (6)	DQB1*04
A*11	B*63 (15)	B*41			DRB1*07	
A*29 (19)	B*75 (15)	B*42			DRB1*08	
A*30 (19)	B*76 (15)	B*46			DRB1*09	
A*31 (19)	B*77 (15)	B*47			DRB1*10	
A*32 (19)	B*38 (16)	B*48				
A*33 (19)	B*39 (16)	B*53			DRB3* (DR52)	
A*74 (19)	B*57 (17)	B*59			DRB4* (DR53)	
A*68,*69 (28)	B*58 (17)	B*67			DRB5* (DR51)	
A*36	B*18	B*71 (70)			DRBblank*	
A*80	B*49 (21)	B*72 (70)				

3.4. Statistische Methoden

3.4.1. Demografische und klinische Daten

Mittelwerte unabhängiger Stichproben wurden mit dem Levene-Test auf Varianzgleichheit getestet und Unterschiede mit dem T-Test auf Signifikanz überprüft ($p \leq 0,05$). Korrelationen wurden mit dem Pearson-Korrelationskoeffizienten bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ bzw. $p \leq 0,01$ berechnet. Der Einfluss mehrerer Faktoren auf eine dichotome Variable wurde mit logistischer Regression (rückwärts, schrittweise) und Berechnung der Odds ratio (OR) bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ bestimmt.

3.4.2. Auswertung der HLA-Typisierungsergebnisse

Alle statistischen Berechnungen basierten auf der 2 x 2 Kontingenztafel (Tab. 4)

Tab. 4 2 x 2 Felder-Tafel. a, b, c, d = Anzahl der für das Merkmal positiv bzw. negativ typisierten Probanden.

	positiv für das HLA-Antigen	negativ für das HLA-Antigen	Σ
Patienten	a	b	U
Kontrollen	c	d	V
Σ	Y	Z	$N = (a + b + c + d)$

Die Phänotypfrequenz (pf) eines Merkmals oder Allels in den Patienten- bzw. Kontrollgruppen wurde nach Formel (1) berechnet.

$$pf_{\text{Patienten}} = a/U \times 100 \qquad pf_{\text{Kontrollen}} = c/V \times 100 \qquad (1)$$

Ein HLA-Merkmal wurde dann als homozygot bewertet, wenn innerhalb eines HLA-Locus kein zweites Merkmal nachgewiesen werden konnte.

Die Stärke der Assoziation eines HLA-Merkmals, einer HLA-Homozygotie oder einer HLA-Kombination mit einer Erkrankung wurde durch die Odds ratio (OR) definiert (Formel 2). Sie kann als Näherungswert des tatsächlichen relativen Risikos angesehen werden (Wassmuth 1995).

$$OR = ad / bc \quad (2)$$

Für Fälle mit $a < 5$ oder $b < 5$ wurde bei der Berechnung der OR eine Modifikation nach *Haldane* (1956) verwendet:

$$OR = (2a+1)(2d+1) / (2b+1)(2c+1). \quad (3)$$

$OR > 1$ bedeutete eine positive und $OR < 1$ eine negative Assoziation bestimmter HLA-Merkmale mit einer Erkrankung. Dabei wird angegeben, um welchen Faktor sich bei Trägern bzw. Nichtträgern dieses HLA-Merkmals das Krankheitsrisiko erhöht bzw. vermindert. Eine Odds ratio von 1 entsprach einer fehlenden Krankheitsassoziation. Die Testung der statistischen Signifikanz einer Assoziation erfolgte mit dem χ^2 -Test nach Formel 4.

$$\chi^2 = \sum (O-E)^2/E \quad (O = \text{engl. observed, beobachtet; } E = \text{engl. expected, erwartet}) \quad (4)$$

Da die χ^2 -Werte keine kontinuierliche Verteilung sondern nur die Annäherung an die wahre Verteilung wiedergeben können, wurde eine Berichtigung der Werte mit Hilfe der Yates-Korrektur (Continuity Correction) durchgeführt. (p_y). Einen Freiheitsgrad vorausgesetzt entsprach ein χ^2 -Wert von $> 3,84$ einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$. In diesem Fall wurde die Nullhypothese H_0 (es existiert kein Zusammenhang zwischen HLA-Merkmal und Erkrankung) abgelehnt und die Gegenhypothese H_1 (es besteht ein Zusammenhang zwischen HLA-Merkmal und Erkrankung) angenommen und die Assoziation als statistisch signifikant bewertet. Wenn eine der Variablen der 2×2 Felder-Tafel einen Wert ≤ 5 annahm, wurde p durch den Fisher`s-Exact-Test (p_F) berichtigt (*Dyer* und *Warrens* 1994). Soweit eine Assoziation eines HLA-Merkmals nicht aus früheren Studien bekannt war, musste mit Hilfe der Bonferroni-Ungleichheitsmethode korrigiert und eine durch multiple Vergleiche innerhalb eines HLA-Locus entstehende zufällige Assoziation ausgeschlossen werden. Hierzu wurden die jeweils erhaltenen p -Werte mit der Anzahl pro Locus untersuchten HLA-Spezifitäten multipliziert.

HLA-Homozygotien sowie HLA-Kombinationen (*Stein* et al. 2003) wurden in jeder möglichen Konstellation untersucht (Tab. 5).

Tab. 5 Anzahl der untersuchten HLA-Kombinationen

Kombinationen innerhalb eines HLA locus	Anzahl untersuchter Konstellationen	Kombinationen zwischen zwei HLA-Loci	Anzahl untersuchter Konstellationen
A, A	210	A, B	800
B, B	820	A, Cw	180
Cw, Cw	45	A, DRB1	260
DRB1, DRB1	91	A, DQB1	140
DRB3/4/5, DRB3/4/5	10	B, Cw	360
DQB1, DQB1	28	B, DRB1	520
-----	-----	B, DQB1	280
-----	-----	Cw, DRB1	117
-----	-----	Cw, DQB1	63
-----	-----	DRB1, DQB1	91

Mit Hilfe der Bestimmung des Delta-Wertes (Δ) nach Formel 5 wurden Zweilocuskombinationen mit positivem Kopplungsungleichgewicht ($\Delta > 0$) ermittelt und wahrscheinliche HLA-Kombinationen für nicht verwandte Probanden nach der Methode von (Mattiuz et al. 1970) ermittelt.

$$\Delta = \sqrt{d/n} - \sqrt{b+d/n} \times \sqrt{c+d/n} \quad (5)$$

dabei war:

- a = Anzahl der Probanden, die beide Gene tragen
- b, c = Anzahl der Probanden, die jeweils nur ein Gen tragen
- d = Anzahl der Probanden, die beide Gene nicht tragen, d.h. $d = n - (a+b+c)$
- n = Gesamtanzahl der Probanden

3.4.3. HLA-Assoziationen zu parodontalen Leitkeimen

Hierbei sollte untersucht werden, ob bei Parodontitis auffällige HLA-Einzelmarker, HLA-Homozygotien und HLA-Kombinationen oder auch bisher unauffällige HLA-Marker zu den parodontalen Leitkeimen A.a., P.g., P.i., T.f. und T.d. assoziiert waren. Um HLA-abhängige Unterschiede im Nachweis der 5 Markerkeime auf Signifikanz zu überprüfen, wurde der Chi²-Test angewandt. Wenn eine der Variablen einen Wert ≤ 5 annahm, wurde p durch den

Fisher's Exact-Test (p_F) berichtigt. Die Richtung der Assoziation wurde mit dem Korrelationskoeffizient nach Pearson bestimmt. Die individuelle Odds Ratio (OR) eines HLA-Markers für eine Infektion mit einem der parodontalen Leitkeime wurde mit binärer logistischer Regression (schrittweise, rückwärts) unter Berücksichtigung der Kofaktoren Alter, Geschlecht, Nikotinkonsum und Attachmentverlust an den Entnahmestellen für den mikrobiologischen Test (CAL_{Bakt}) ermittelt. Der Ausschlusstest basierte auf der Likelihood-Analyse. Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe der Software-Programme SPSS 10 und Microsoft Excel durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Demografische und klinische Daten bei Parodontitispatienten

Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis waren im Vergleich zu den Kontrollprobanden signifikant jünger. In allen untersuchten Gruppen wurden mehr Frauen als Männer untersucht. Auch der prozentuale Anteil von Rauchern war jeweils bei Männern höher. Hinsichtlich der Geschlechtsratio und des Anteils von Rauchern existierten jedoch keine signifikanten Differenzen zwischen den Studiengruppen (Tab. 6).

Tab. 6 Demografische Daten und Raucherstatus bei Parodontitispatienten und Kontrollprobanden

Variable	Aggressive Parodontitis (N = 50)	Chronische Parodontitis (N = 102)	keine Parodontitis (N = 102)	Blutspender (N = 157)
Alter (Jahre)	35,5 ± 6,7*	52,5 ± 11,1*	61,0 ± 15,1	29,2 ± 9,7
Frauen %	56	61,8	60,8	59,9
Raucher %	35,6	44	41,8	nicht best.
Raucher % ♂/♀	40/32	62,5/34,8	48,0/38,0	nicht best.

* $p \leq 0,05$

Im Vergleich zur parodontitisfreien Kontrollgruppe hatten Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis einen signifikant verringerten Plaqueindex aber signifikant erhöhte Werte für PD und CAL. Die Mittelwerte für API, PD und CAL unterschieden sich innerhalb der Kohorten in Abhängigkeit vom Geschlecht nicht signifikant voneinander. Die Anzahl von Zähnen mit Blutung auf Sondierung (BOP %) bzw. der SBI war dagegen bei Patientinnen und weiblichen Kontrollprobanden signifikant erhöht (Tab. 7).

Tab. 7 Approximaler Plaque Index (API), Sulkus-Blutungs-Index (SBI) oder Zähne mit Sondierblutung (BOP) sowie Sondiertiefen (PD) und klinischer Attachmentverlust (CAL) bei Parodontitispatienten und Probanden ohne Parodontitis

Variable	Aggressive Parodontitis (N = 50)	Chronische Parodontitis (N = 102)	Probanden ohne Parodontitis (N = 102)
API (%)			
Total	42,7*	18,8*	56,9
Männer/Frauen	36,4/47,4	17,6/19,4	55,5/57,8
SBI, BOP (%)			
Total	55,36	19,1*	60,8
Männer/Frauen	44,6/64,0*	14,7/21,3*	54,9/64,6*
PD (mm)			
Total	5,7*	4,9*	1,9
Männer/Frauen	5,6/5,8	5,0/4,9	1,9/2,0
CAL (mm)			
Total	6,7*	5,7*	3,4
Männer/Frauen	6,7/6,7	5,8/5,6	3,2/3,5

*p ≤ 0,05

4.2. Auffällige HLA-Klasse I- und II-Merkmale bei AP

Im Vergleich zu den Probanden ohne Parodontitis zeigten die HLA-Marker A*11, A*29, A*68/*69, A*33, B*44, B*18, DRB1*16, DRB1*13 und DRB1*07 bei Patienten mit AP eine erhöhte Phänotypfrequenz, während die HLA-Marker A*31, A*30+*31, DRBblank* und DQB1*05 nicht oder mit verminderter Phänotypfrequenz vorkamen. Die positiven Assoziationen von HLA-A*29 und HLA-DRB1*13 sowie die negativen Assoziationen von HLA-A*31, HLA-A*30+31, HLA-DRBblank* erreichten nach Yateskorrektur bzw. Fisher's Exact-Test statistische Signifikanz. Die Odds ratio (OR) für HLA-A*29 positive Patienten betrug 6,55 und für HLA-DRB1*13 positive 2,17 (Tab. 8).

Tab. 8 Auffällige HLA-Klasse I- und II-Phänotypfrequenzen bei Patienten mit Aggressiver Parodontitis (AP) im Vergleich zu Probanden ohne Parodontitis (NP). Die Pfeile verdeutlichen die Abweichung der Frequenzen innerhalb jeder Gruppe von der Normalverteilung (Blutspender)

HLA-	AP (N = 50)		NP (N = 102)		Chi ²	p _c	OR
	n	pf (%)	n	pf (%)			
A*02	19	38,00 ↓	52	50,98	2,271	>0,05	
A*11	6	12,00 ↑	6	5,88 ↓	1,727	> 0,05	
A*29	4	8,00 ↑	1	0,98 ↓	5,197	0,040	6,55
A*31	0	0,00 ↓	9	8,82 ↑	4,689	0,024	0,10
A*30+*31	0	0,00 ↓	12	11,76 ↑	6,387	0,007	0,07
A*68/*69	11	22,00 ↑	10	9,80	4,191	> 0,05	
A*33	1	2,00 ↑	0	0,00 ↓	2,054	> 0,05	
B*51	3	6,00 ↓	12	11,76	1,254	> 0,05	
B*44	15	30,00 ↑	18	17,65	3,012	> 0,05	
B*18	7	14,00 ↑	7	6,86	2,044	> 0,05	
DRB1*16	3	6,00 ↑	1	0,98 ↓	3,299	> 0,05	
DRB1*13	18	36,00 ↑	21	20,59 ↓	4,178	0,046	2,17
DRB1*07	18	36,00 ↑	24	23,53 ↓	2,609	> 0,05	
DRBblank*	9	18,00 ↓	35	34,31 ↑	4,342	0,036	0,42
DQB1*0302	4	8,00 ↓	20	19,61 ↑	3,400	> 0,05	
DQB1*04	2	4,00 ↓	9	8,82	1,163	> 0,05	

p_c, p korrigiert (Yates oder Fisher); OR, Odds ratio.

4.2.1 Geschlechtsunterschiede bei AP

Bei der für AP-Männer und -Frauen separat durchgeführten Auswertung der HLA-Typisierung war von Interesse, ob die bisher in der Gesamtgruppe beschriebenen HLA-Deviationsen in beiden Geschlechtern gleichermaßen auftraten oder nur bei Männern bzw. Frauen. Weiterhin bestand die Möglichkeit, bisher unauffällige, geschlechtsabhängige HLA-Assoziationen zu finden.

HLA-A*68/*69 (A28) war nur unter AP-Patientinnen aber nicht in der Gesamtgruppe signifikant häufiger, während HLA-DQB1*05 nur bei Patientinnen eine verringerte Phänotypfrequenz zeigte. Bei AP-Männern wurden keine signifikanten HLA-Assoziationen nachgewiesen. Die

positive Assoziation von HLA-A*29 zur AP wurde vorwiegend durch eine nicht signifikant erhöhte Phänotypfrequenz dieses Merkmals unter AP-Männern hervorgerufen, während die Phänotypfrequenz von HLA-A*29 unter Patientinnen der Normalverteilung entsprach. Dagegen wurde die positive Assoziation von HLA-DRB1*13 zur AP vorwiegend durch Patientinnen hervorgerufen. Die negative Assoziation von HLA-DRBblank* war bei AP-Männern und -Frauen nachweisbar, erreichte jedoch nur in der Gesamtgruppe und bei Patientinnen statistische Signifikanz (Tab. 9).

Tab. 9 Geschlechtsabhängige signifikant erhöht oder verminderte HLA-Phänotypfrequenzen (pf %) bei Patienten mit Aggressiver Parodontitis (AP) im Vergleich zu Kontrollprobanden ohne Parodontitis (NP). Die Pfeile verdeutlichen die Abweichung der Frequenzen innerhalb jeder Gruppe von der Normalverteilung (Blutspender)

	total			Frauen			Männer		
	AP	NP		AP	NP		AP	NP	
	N=50	N=102		N=28	N=62		N=22	N=40	
HLA-	n/ pf %	n/ pf %	p _c / OR	n/ pf %	n/ pf %	p _c / OR	n/ pf %	n/ pf %	p _c / OR
A*68/*69	11/ 22.00↑	10/ 9.80	n.s.	8/ 28.57↑	4/ 6.45↓	0.007/ 5.39	3/ 13.64	6/ 15.00	n.s.
A*29	4/ 8.00↑	1/ 0.98↓	0.040/ 6.55	1/ 3.57	0/ 0.00↓	n.s.	3/ 13.64↑	1/ 2.50	n.s.
A*31	0/ 0.00↓	9/ 8.82↑	0.024/ 0.10	0/ 0.00↓	6/ 9.86↑	n.s.	0/ 0.00↓	3/ 7.50↑	n.s.
A*30+*31	0/ 0.00↓	12/ 11.76↑	0.007/ 0.07	0/ 0.00↓	7/ 11.29↑	n.s.	0/ 0.00↓	5/ 12.50↑	n.s.
DRBblank*	9/ 18.00↓	35/ 34.31↑	0.036/ 0.42	5/ 17.86↓	26/ 41.94↑	0.026/ 0.30	4/ 18.18↓	9/ 22.50↓	n.s.
DQB1*05	11/ 22.00↓	35/ 34.31↑	n.s.	5/ 17.86↓	27/ 43.55↑	0.019/ 0.28	6/ 27.27	8/ 20.00↓	n.s.
DRB1*13	18 36.00↑	21 20.59↓	0.046/ 2.17	12/ 42.86↑	15/ 24.19	n.s.	6/ 27.27	6/ 15.00↓	n.s.

p_c, p korrigiert (Yates oder Fisher); OR, Odds ratio.

4.3. Auffällige HLA-Klasse I- und II-Merkmale bei CP

Die HLA-Marker A*11, A*29, A*33, B*14, B*18 und Cw*08 waren positiv und die Merkmale

A*03, A*31, A*30+*31, B*51 und DQB1*04 negativ mit CP assoziiert, wobei die Assoziationen von HLA-A*03, -A*11, -A*29 und -Cw*08 zur CP nach Yates- bzw. Fisher-Korrektur statistische Signifikanz erreichten. Bei den Merkmalen HLA-A*29, -A*31, -A*30+*31, -B*14 und -Cw*08 entsprach die Phänotypfrequenz der Normalverteilung und die evaluierten Unterschiede beruhten auf einer verminderten (A*29, B*14, Cw*08) oder erhöhten Phänotypfrequenz (A*31, A*30+*31) innerhalb der parodontitisfreien Kontrollgruppe (Tab. 10).

Tab. 10 Auffällige HLA-Klasse I- und II-Phänotypfrequenzen bei Patienten mit Chronischer Parodontitis (CP) im Vergleich zu Probanden ohne Parodontitis (NP). Die Pfeile verdeutlichen die Abweichung der Frequenzen innerhalb jeder Gruppe von der Normalverteilung (Blutspender)

HLA-	CP (N = 102)		NP (N = 102)		Chi ²	p _c	OR
	n	pf (%)	n	pf (%)			
A*03	20	19,61 ↓	33	32,35 ↑	4,308	0,039	0.51
A*11	15	14,71 ↑	6	5,88 ↓	4,300	0,041	2.76
A*29	7	6,86	1	0,98 ↓	4,684	0,032	5.00
A*31	4	3,92	9	8,82 ↑	2,054	>0,05	
A*30+*31	6	5,88	12	11,76 ↑	2,194	>0,05	
A*33	5	4,90 ↑	0	0,00 ↓	5,126	0,030	11,00
B*14	6	5,88	0	0,00 ↓	6,182	0,014	13.8
B*51	8	7,84 ↓	12	11,76	0,887	>0,05	
B*18	12	11,76 ↑	7	6,86	1,451	>0,05	
Cw*08	6	5,88	0	0,00 ↓	6,182	0,014	13.8
DQB1*04	4	3,92 ↓	9	8,82	2,054	> 0,05	

p_c, p korrigiert (Yates oder Fisher); OR, Odds ratio.

4.3.1. Geschlechtsunterschiede bei CP

In der Gesamt-CP-Gruppe unauffällig waren HLA-DQB1*06,06 und HLA-DRB3*(DR52) bei CP-Patientinnen signifikant erhöht. HLA-DQB1*0303, in der Gesamt-CP-Gruppe vermindert, war bei Patientinnen nicht nachweisbar. Die bei CP-Patientinnen signifikant verminderte Phänotypfrequenz von HLA-B*27 beruhte ausschließlich auf der auch gegenüber den Blutspendern (Normalverteilung) erhöhten Phänotypfrequenz dieses Merkmals in der weiblichen Kontrollgruppe. Die positiven bzw. negativen Assoziationen der HLA-Marker A*03, A*33, B*14 und Cw*08 wurden durch ähnliche HLA-Deviations in beiden Geschlechtern verursacht. Die schon in der CP-Gesamtgruppe ermittelte positive Assoziation von HLA-A*11

war auch bei CP-Frauen signifikant, während dieses Merkmal bei CP-Männern von der Tendenz erhöht war. Bei männlichen CP-Patienten existierten keine signifikanten HLA-Deviations (Tab. 11).

Tab. 11 Geschlechtsabhängige signifikant erhöht oder verminderte HLA-Phänotypfrequenzen (pf %) bei Patienten mit Chronischer Parodontitis (CP) im Vergleich zu Kontrollprobanden ohne Parodontitis (NP). Die Pfeile zeigen die Abweichung von der Normalverteilung (Blutspender)

	total			Frauen			Männer		
	CP	NP		CP	NP		CP	NP	
	N=102	N=102		N=63	N=62		N=39	N=40	
HLA-	n/ pf %	n/ pf %	p _c / OR	n/ pf %	n/ pf %	p _c / OR	n/ pf %	n/ pf %	p _c / OR
A*03	20/ 19.61↓	33/ 32.35↑	0.039/ 0.51	13/ 20.63↓	21/ 33.87↑	n.s.	7/ 17.95↓	12/ 30.00	n.s.
A*11	15/ 14.71↑	6/ 5.88↓	0.041/ 2.76	10/ 15.87↑	3/ 4.84↓	0.040/ 3.34	5/ 12.82↑	3/ 7.50	n.s.
A*29	7/ 6.86	1/ 0.98↓	0.040/ 5.00	4/ 6.35	0/ 0.00	n.s.	3/ 7.69↑	2.50	n.s.
A*33	5/ 4.90↑	0/ 0.00↓	0.030/ 11.0	3/ 4.76↑	0/ 0.00↓	n.s.	2/ 5.13↑	0/ 0.00↓	n.s.
B*14	6/ 5.88	0/ 0.00↓	0.014/ 13.8	4/ 6.35	0/ 0.00↓	n.s.	2/ 5.13	0/ 0.00↓	n.s.
B*27	9/ 8.82	15/ 14.71↑	n.s.	4/ 6.35	11/ 17.74↑	0.045/ 0.34	5/ 12.82↑	4/ 10.00	n.s.
Cw*08	6/ 5.88	0/ 0.00↓	0.041/ 13.8	4/ 6.35	0/ 0.00↓	n.s.	2/ 5.13	0/ 0.00↓	n.s.
DQB1*0303	3/ 2.94↓	7/ 6.86	n.s.	0/ 0.00↓	5/ 8.06	0.028/ 0.08	3/ 7.69	2/ 5.00↓	n.s.
DQB1*06,06	10/ 9.80↑	5/ 4.90	n.s.	7/ 11.11↑	1/ 1.61↓	0.032/ 5.54	3/ 7.69	4/ 10↑	n.s.
DRB3*	69/ 67.65	60/ 58.82↓	n.s.	46/ 73.02	34/ 54.88↓	0.035/ 2.23	23/ 58.97↓	26/ 65.00	n.s.

p_c, p korrigiert (Yates oder Fisher); OR, Odds ratio.

4.4. Auffällige HLA-Klasse I- und II-Merkmale in einer Gesamtparodontitisgruppe (AP + CP)

Obwohl chronische und aggressive Parodontitisformen vom immunologischen Background her Unterschiede zeigen, könnten für Parodontitis generell bestimmte HLA-Merkmale ätiologisch von Bedeutung sein.

Die schon in der AP- bzw. CP-Gruppe evaluierten positiven Assoziationen von HLA-A*29, HLA-A*11 und HLA-A*33 sowie die negativen Assoziationen von HLA-A*31 und -A*30+*31 wurden bestätigt. Eine erhöhte Phänotypfrequenz von HLA-B*18 und verminderte Phänotypfrequenzen von HLA-B*51 und HLA-DQB1*04 wurden sowohl in der AP-, CP- und in der AP + CP-Parodontitisgruppe gefunden, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen. (Tab. 12)

Tab. 12 Erhöht oder verminderte HLA-Phänotypfrequenzen (pf %) in einer Gesamt-Parodontitisgruppe (AP + CP) im Vergleich zu Kontrollprobanden ohne Parodontitis (NP). Die Pfeile verdeutlichen die Abweichung der Frequenzen innerhalb jeder Gruppe von der Normalverteilung (Blutspender)

HLA-	AP+CP (N = 152)		NP (N = 102)		Chi ²	p _c	OR
	n	pf (%)	n	pf (%)			
A*11	21	13,82 ↑	6	5,88 ↓	4,044	0,044	2,56
A*29	11	7,24 ↑	1	0,98 ↓	5,308	0,021	5,50
A*31	4	2,63	9	8,82 ↑	4,819	0,028	0,30
A*30+*31	6	3,95	12	11,76 ↑	5,665	0,017	0,31
A*33	6	3,95 ↑	0	0,00 ↓	4,124	0,044	8,74
B*51	11	7,24 ↓	12	11,76	1,520	>0,05	
B*18	19	12,50 ↑	7	6,86	2,111	>0,05	
Cw*8	7	4,61	0	0,00 ↓	4,830	0,026	10,08
DQB1*04	6	3,95 ↓	9	8,82	2,621	>0,05	

p_c, p korrigiert (Yates oder Fisher); OR, Odds ratio.

4.4.1. Geschlechtsabhängige HLA-Phänotypfrequenzen in der Gesamtparodontitisgruppe

Wie in der Gruppe von Patienten mit CP kam eine Homozygotie für HLA-DQB1*06 nur bei Patientinnen signifikant häufiger vor. HLA-A*31 war in der Gesamtgruppe und bei Patientinnen signifikant vermindert. Unter männlichen Patienten war HLA-A*24 signifikant seltener,

während die Phänotypfrequenz dieses Merkmals in der Gesamtgruppe und bei Patientinnen der Normalverteilung entsprach. Die signifikant positive Assoziation von HLA-B*60 wurde durch ein Fehlen dieses Markers unter männlichen Kontrollprobanden hervorgerufen, denn die Phänotypfrequenz bei Patienten entsprach der Normalverteilung. HLA-A*11 und –A*33, positiv assoziiert mit der AP + CP–Gesamtgruppe, zeigte ähnliche Abweichungen bei Patientinnen und Patienten, aber ohne statistische Signifikanz. Vergleichbar mit der AP–Gruppe, beruhte die signifikant positive Assoziation von HLA-A*29 auf einem Fehlen dieses Markers in der weiblichen Kontrollgruppe und einer nicht signifikant erhöhten Phänotypfrequenz unter männlichen Patienten (Tab. 13).

Tab. 13 Geschlechtsabhängige signifikant erhöht oder verminderte HLA-Phänotypfrequenzen (pf %) in einer Gesamtgruppe (AP + CP) von Patienten mit Parodontitis im Vergleich zu Kontrollprobanden ohne Parodontitis (NP). Die Pfeile zeigen die Abweichung von der Normalverteilung (Blutspender)

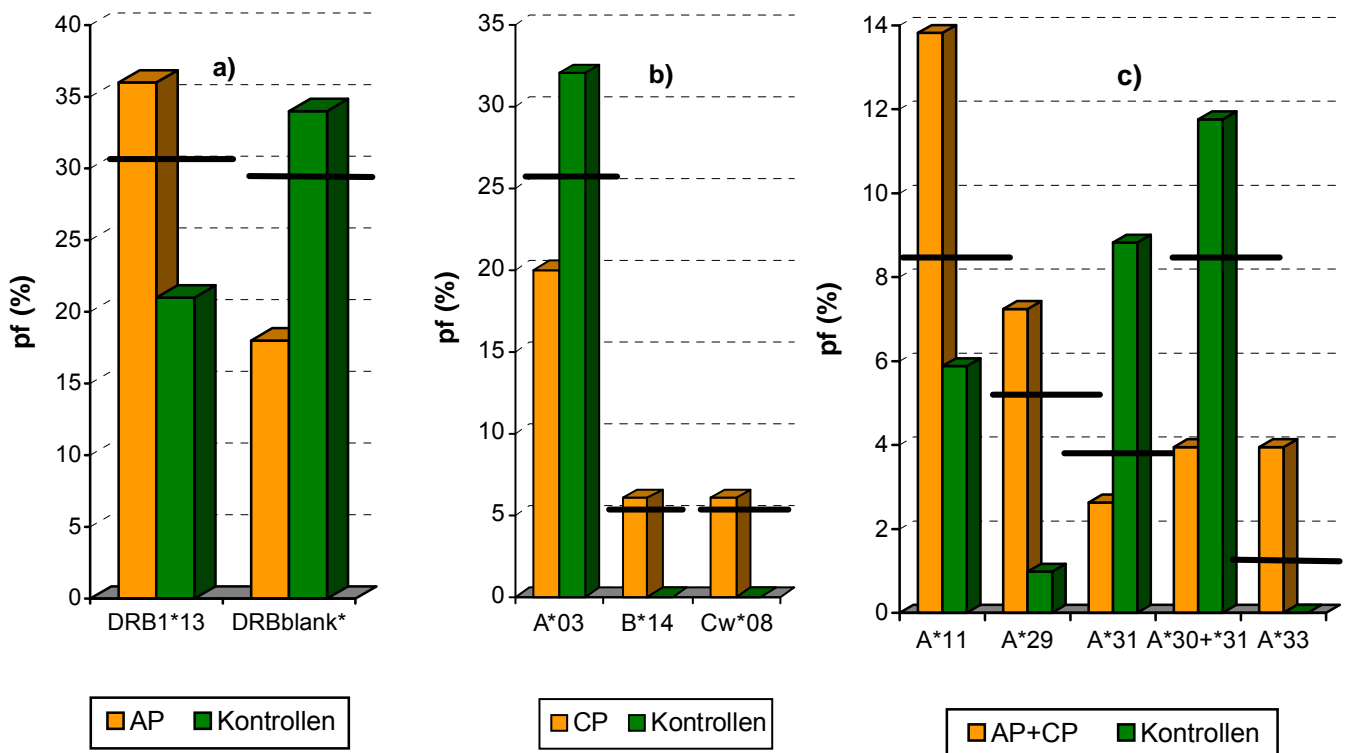
	total			Frauen			Männer		
	AP+CP	NP		AP+CP	NP		AP+CP	NP	
	N=152	N=102		N=91	N=62		N=61	N=40	
HLA-	n/ pf %	n/ pf %	p _c / OR	n/ pf %	n/ pf %	p _c / OR	n/ pf %	n/ pf %	p _c / OR
A*11	21/ 13.82↑	6/ 5.88	0.044/ 2.56	13/ 14.29↑	3/ 4.84↓	n.s.	8/ 13.11↑	3/ 7.50	n.s.
A*24	24/ 15.79	21,57	n.s.	18/ 19.78	12/ 19.35	n.s.	6/ 9.84↓	10/ 25.00	0.049/ 0.33
A*29	11/ 7.24↑	1/ 0.98↓	0.017/ 5.50	5/ 5.49	0/ 0.00↓	n.s.	6/ 9.84↑	1/ 2.50↓	n.s.
A*31	4/ 2.63↓	9/ 8.82↑	0.029/ 0.30	2/ 2.20↓	6/ 9,68↑	0.048/ 0.24	2/ 3.28	3/ 7.50↑	n.s.
A*30+*31	6/ 3.95↓	12/ 11.76↑	0.022/ 0.31	3/ 3.30↓	7/ 11.29↑	n.s.	3/ 4.92↓	5/ 12.50↑	n.s.
A*33	6/ 3,95↑	0/ 0,00↓	0,044/ 8,74	4/ 4,40↑	0/ 0,00↓	n.s.	2/ 3,28↑	0/ 0,00↓	n.s.
B*60 (B40)	23/ 15.13↑	11/ 10.78	n.s.	16/ 17.58↑	11/ 17.74↑	n.s.	7/ 11.48	0/ 0.00↓	0.025/ 11.15
DQB1*06,06	16 10.53↑	5/ 4.90	n.s.	10/ 10.99↑	1/ 1.61↓	0.024/ 5.28	6/ 9.84	4/ 10.00	n.s.

p_c, p korrigiert (Yates oder Fisher); OR, Odds ratio.

4.5. Zusammenfassung auffälliger HLA-Einzelmerkmale

Es existierten HLA-Merkmale, die nur bei AP oder CP signifikante Deviationen zeigten und HLA-Assoziationen, die offenbar für beide Parodontitisformen von Bedeutung waren. Nur bei AP waren HLA-DRB1*13 sowie HLA-DRBblank* positiv bzw. negativ mit der Erkrankung assoziiert (Abb. 2a). Ausschließlich bei CP-Patienten war im Vergleich zur parodontitisfreien Kontrollgruppe (hier waren beide Merkmale nicht nachweisbar) das Vorkommen der HLA-Merkmale B*14 und Cw*08 signifikant erhöht, wobei die Phänotypfrequenz beider Merkmale unter Patienten annähernd der Normalverteilung entsprach. Weiterhin war HLA-A*03 nur mit CP signifikant negativ assoziiert (Abb. 2b). Positive bzw. negative Assoziationen der HLA-Merkmale A*11, A*29, A*33, A*31 und A*30+*31 wurden dagegen, wenn auch nicht konsistent signifikant, in allen Patientengruppen nachgewiesen (Abb. 2c). Keine der bisher unbekanntenen HLA-Assoziationen blieb nach Bonferroni-Korrektur signifikant.

Abb. 2 a-c Signifikante Abweichungen in den HLA-Phänotypfrequenzen von 152 Patienten mit Parodontitis verglichen mit 102 Kontrollprobanden ohne Parodontitis. a) Abweichungen nur unter 50 AP – Patienten b) Abweichungen nur unter 102 CP Patienten c) Abweichungen unter allen 152 Parodontitispatienten (AP + CP). Die Phänotypfrequenz der Merkmale unter den Blutspendern (Normalverteilung) wird durch einen Querstrich „ — „ dargestellt.



4.6. HLA-Homozygotien und -Kombinationen bei AP und CP

4.6.1. Aggressive Parodontitis

Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Phänotypfrequenz homozygot auftretender HLA-Merkmale gefunden. Dennoch ist unter Patienten eine tendenziell erhöhte Phänotypfrequenz für die Merkmale HLA-B*44, HLA-B*62, HLA-Cw*03, HLA-DRB1*15, HLA-DRB5* und HLA-DQB1*06 auffällig, während Homozygotien für HLA-DRBblank* und HLA-DQB1*03 im Vergleich zu den parodontal gesunden Kontrollen vermindert auftraten (Tab. 14).

Tab. 14 Homozygotiefrequenzen (pf%) von HLA-Merkmalen bei Patienten mit aggressiver Parodontitis (AP) im Vergleich zu Kontrollprobanden ohne Parodontitis (NP). Die Pfeile verdeutlichen die Abweichung der Frequenzen innerhalb jeder Gruppe von der Normalverteilung (Blutspender)

homozygot HLA-	AP (N = 50)		NP (N = 102)		Chi ²	p _c
	n	pf (%)	n	pf (%)		
B*44	2	4,00 ↑	0	0,00 ↓	4,134	n.s.
B*62	2	4,00 ↑	1	0,98	1,581	n.s.
Cw*03	3	6,00 ↑	2	1,96	1,721	n.s.
DRB1*15	2	4,00 ↑	1	0,98 ↓	1,581	n.s.
DRB5*	2	4,00 ↑	1	0,98	1,581	n.s.
DRBblank*	1	2,00	5	4,90 ↑	0,745	n.s.
DQB1*06	6	12,00 ↑	5	4,90	2,518	n.s.
DQB1*03	2	4,00 ↓	13	12,75	2,885	n.s.

p_c, p korrigiert (Yates oder Fisher)

Die Kombination HLA-DQB1*06:DQB1*0303 war bei AP signifikant häufiger und HLA-A*02:A*03 signifikant seltener. HLA-DQB1*02:DQB1*0301 war unter Probanden ohne Parodontitis signifikant vermindert während die Phänotypfrequenz bei AP der Normalverteilung (Blutspendergruppe) entsprach (Tab. 15a). Die zwei-Locuskombinationen HLA-A*68/*69:B*18, -A*68/*69:Cw*07 und -DRB1*13:DQB1*06 waren signifikant positiv und HLA-DRB1*04:DQB1*0302 signifikant negativ mit AP assoziiert (Tab. 15b).

Tab. 15 Phänotypfrequenzen (pf%) von ein-Locus- (A) und zwei-Locuskombinationen (B) bei Patienten mit aggressiver Parodontitis (AP) im Vergleich zu Probanden ohne Parodontitis (NP). Die Pfeile zeigen die jeweilige Abweichung von der Blutspendergruppe an

(A)

HLA-	AP (N = 50)		NP (N = 102)		OR	p _c
	n	pf (%)	n	pf (%)		
A*02:A*03	1	2,00 ↓	12	11,76 ↑	0,22	0,040
DQB1*02:DQB1*0301/4	6	12,00	2	1,96 ↓	5,87	0,016
DQB1*06:DQB1*0303	5	10,00 ↑	2	1,96	4,86	0,039

(B)

HLA-	AP (N = 50)			NP (N = 102)			OR	p _c
	n	pf (%)	Δ	n	pf (%)	Δ		
A*28:B*18	3	6,00 ↑	0,018	0	0,00 ↓	-0,004	15,11	0,034
A*28:Cw*07	7	14,00 ↑	0,007	4	3,92 ↓	-0,025	3,77	0,031
DRB1*04:DQB1*0302	4	8,00 ↓	0,038	20	19,61 ↑	0,000	0,39	0,050
DRB1*13:DQB1*06	17	34,00 ↑	0,124	19	18,63 ↓	-0,003	2,25	0,041

p_c, p korrigiert (Yates oder Fisher); OR, Odds ratio; Δ, Kopplungsungleichgewicht berechnet nach *Mattiuz et al. (1970)*.

4.6.2. Chronische Parodontitis

Nur eine Homozygotie für HLA-DRBblank* war in der CP-Gruppe nach Yates-Korrektur signifikant seltener. Nach Fisher's Exakt-Test konnte kein signifikanter Unterschied mehr ermittelt werden. Die HLA-Merkmale -Cw*07 und -DQB1*03 kamen homozygot bei Patienten mit CP von der Tendenz seltener vor, während eine Homozygotie für die HLA-DRB1*15, -DRB5* und DQB1*06, wie bei AP, von der Tendenz häufiger war (Tab. 16).

Tab. 16 Homozygotiefrequenzen ausgewählter HLA-Merkmale bei Patienten mit chronischer Parodontitis (CP) im Vergleich zu Kontrollprobanden ohne Parodontitis (NP). Die Pfeile verdeutlichen die Abweichung der Frequenzen innerhalb jeder Gruppe von der Normalverteilung (Blutspender)

homozygot HLA-	CP (N=102)		NP (N=102)		Chi ²	p _c
	n	pf (%)	n	pf (%)		
Cw*07	8	7,84	15	14,71 ↑	2,401	n.s.
DRB1*15	4	3,92 ↑	1	0,98 ↓	1,845	n.s.
DRB5*	5	4,90 ↑	1	0,98 ↓	2,747	n.s.
DRBblank*	0	0,00 ↓	5	4,90 ↑	5,126	0,035 (Yates)
DQB1*06	10	9,80 ↑	5	4,90	1,799	n.s.
DQB1*03	4	3,92 ↓	13	12,75 ↑	0,865	n.s.

p_c, p korrigiert (Yates oder Fisher).

Bei Patienten mit CP war HLA-A*01:A*03 signifikant vermindert. Die zwei-Locus-Kombinationen A*11:B*18 und B*44:DRB1*13 waren bei CP signifikant häufiger. HLA-Cw*08:B*14 kam in der Kontrollgruppe nicht vor und war in der CP-Gruppe normal verteilt (Tab. 17 A und B).

Tab. 17 Ein-Locus- (A) und zwei-Locuskombinationen (B) bei Patienten mit chronischer Parodontitis (CP) im Vergleich zu Probanden ohne Parodontitis (NP). Die Pfeile zeigen die jeweilige Abweichung von der Blutspendergruppe an

(A)

HLA-	CP (N = 102)		NP (N = 102)		OR	p _c
	n	pf (%)	n	pf (%)		
A*01:A*03	1	0,98 ↓	7	6,86 ↑	0,19	0,032

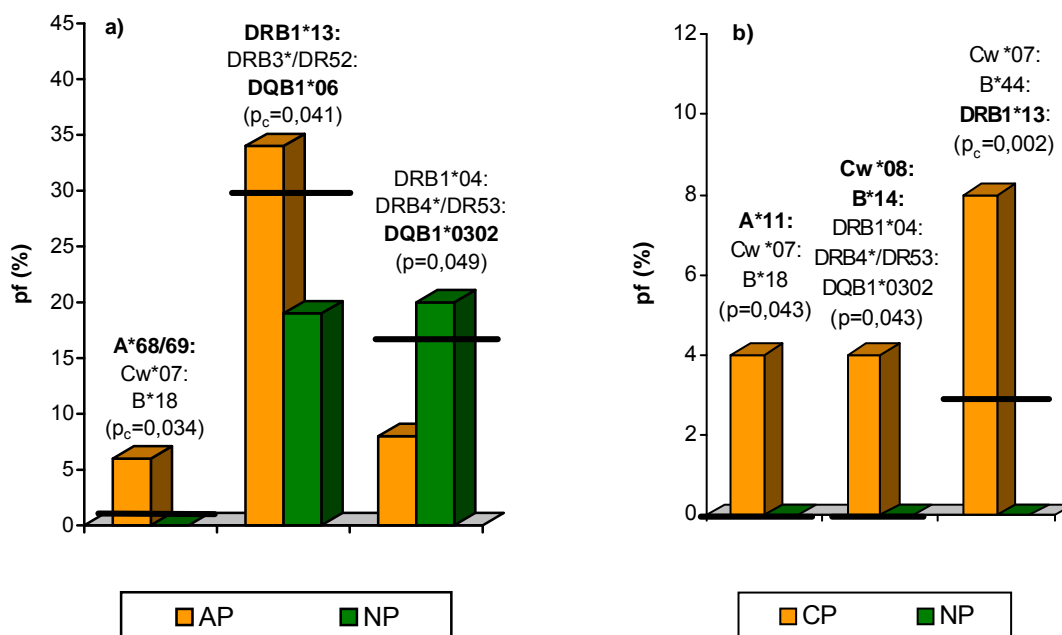
(B)

HLA-	CP (N = 102)			NP (N = 102)			OR	p _c
	n	pf (%)	Δ	n	pf (%)	Δ		
A*11:B*18	5	4,90 ↑	0,018	0	0,00	-0,002	11,56	0,030
Cw*08:B*14	6	5,88	0,029	0	0,00 ↓	0,000	13,81	0,014
Cw*08:DQB1*0302	4	3,92 ↑	0,015	0	0,00	0,000		> 0,05
B*14:DRB1*04	4	3,92 ↑	0,014	0	0,00	0,000		> 0,05
B*14:DQB1*0302	4	3,92 ↑	0,015	0	0,00	0,000		> 0,05
B*44:DRB1*13	9	8,82 ↑	0,023	2	1,96	-0,018	4,08	0,029

p_c, p korrigiert (Yates oder Fisher); OR, Odds ratio; Δ Kopplungsungleichgewicht zwischen zwei HLA-Loci.

Durch das Kopplungsungleichgewicht der zwei-Locuskombinationen innerhalb der jeweiligen Patientengruppe (Δ > 0) konnten bei AP zwei HLA-Kombinationen mit signifikant erhöhter und eine Kombination mit signifikant verminderter Phänotypfrequenz definiert werden. In der CP-Kohorte waren drei Kombinationen positiv mit der Erkrankung assoziiert (Abb. 3a und 3b).

Abb. 3. Verteilung von HLA-Kombinationen unter Patienten mit aggressiver (a) und chronischer (b) Parodontitis im Vergleich zu Kontrollprobanden ohne Parodontitis. Die Häufigkeit der Kombinationen unter der Blutspendergruppe (Normalverteilung) ist mit einem Querstrich gekennzeichnet. Signifikante HLA-Einzelmerkmale wurden durch Fettdruck hervorgehoben. p_c = p korrigiert nach (Yates oder Fisher); p = unkorrigiert nach Chi²-Test.



4.7. Assoziationen von HLA zu parodontalen Leitkeimen

In diese Untersuchung gingen 35 Patienten mit generalisierter chronischer Parodontitis (CP) und 33 Patienten mit generalisierter aggressiver Parodontitis (AP) ein. Die Auswertung der demografischen und klinischen Daten erfolgte für beide Parodontitisgruppen getrennt und anschließend nach Zusammenlegung in einer Gesamtparodontitisgruppe (AP + CP). Patienten mit AP waren im Vergleich zu Patienten der CP-Gruppe signifikant jünger und hatten einen signifikant höheren Anteil von Rauchern. Der API war in der AP-Gruppe im Vergleich zur CP-Gruppe von der Tendenz niedriger. Die Mittelwerte für BOP, CAL und CAL_{Bakt} waren dagegen bei AP-Patienten von der Tendenz höher. In der AP-Gruppe wurde im Vergleich zur CP-Gruppe *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.) signifikant häufiger und *Treponema denticola* (T.d.) signifikant seltener nachgewiesen. (Tab. 18).

Tab. 18 Vergleich der demografischen und klinischen Daten der Patienten mit chronischer und aggressiver Parodontitis zur Untersuchung der Assoziation von HLA zu parodontalen Leitkeimen

Variable	Chronische Parodontitis (CP) N = 35	Aggressive Parodontitis (AP) N = 33	AP vs. CP p	Gesamt-Parodontitisgruppe N = 68
Alter (Jahre)	47,0 ± 10,5	37,0 ± 7,9	0,0001	42,0 ± 10,7
Frauen %	62,9	57,6	n.s.	60,0
Raucher %	14,3	48,5	0,002	30,9
API % (SD)	62,1 (10,5)	53,5 (34,8)	n.s.	58,0 (29,9)
BOP % (SD)	64,4 (28,7)	71,6 (28,7)	n.s.	67,8 (28,7)
PD mm (SD)	5,4 (1,2)	5,8 (1,6)	n.s.	5,6 (1,4)
CAL mm (SD)	6,1 (1,5)	6,5 (1,9)	n.s.	6,3 (1,7)
CAL _{Bakt} (SD)	7,4 (1,8)	7,6 (2,0)	n.s.	7,5 (1,9)
A.actinomycetemcomitans (%)	9 (25,7)	16 (48,5)	0,052	25 (36,8)
P. gingivalis (%)	33 (94,3)	26 (78,8)	n.s.	59 (86,8)
P. intermedia (%)	22 (62,9)	21 (63,6)	n.s.	43 (63,2)
T. forsythensis (%)	34 (97,1)	29 (87,9)	n.s.	63 (92,6)
T. denticola (%)	35 (100)	29 (87,9)	0,050	64 (92,1)

Der Nachweis von A.a. korrelierte in der Gesamtparodontitisgruppe schwach negativ mit dem Alter des Patienten und CAL. Das Vorkommen von P.g. war mittelstark positiv mit dem Patientenalter sowie dem Nachweis von P.i. und T.f. assoziiert. Auch T.f. korrelierte schwach

positiv mit dem Alter des Patienten. Der Nachweis der fünf parodontalen Leitkeime differierte nicht in Abhängigkeit vom Nikotinkonsum und Geschlecht (Tab. 19).

Tab. 19 Demografische (Alter, Geschlecht, Nikotinkonsum) und klinische (PD, CAL, CAL_{Bakt}) Einflussfaktoren auf den Nachweis von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.), *Porphyromonas gingivalis* (P.g.), *Prevotella intermedia* (P.i.), *Treponema denticola* (T.d.) und *Tannerella forsythensis* (T.f.)

Korrelationen

		A.a.	P.g.	P.i.	T.f.	T.d.	Alter	SEX	Rau- chen	PD	CAL	CAL- Bakt.
A.a.	r	1,000	-,152	,012	-,136	,061	-,244*	-,067	,084	-,217	-,260*	-,048
	p	,	,215	,922	,270	,621	,045	,588	,493	,078	,033	,697
P.g.	r	-,152	1,000	,242*	,389**	,087	,393**	,038	-,115	,102	,025	,067
	p	,215	,	,047	,001	,482	,001	,759	,352	,412	,844	,589
P.i.	r	,012	,242*	1,000	,136	,328**	-,088	-,182	-,018	,138	,090	,209
	p	,922	,047	,	,270	,006	,478	,137	,881	,265	,468	,088
T.f.	r	-,136	,389**	,136	1,000	,408**	,243*	-,229	-,056	,041	,017	,059
	p	,270	,001	,270	,	,001	,046	,061	,652	,744	,890	,631
T.d.	r	,061	,087	,328**	,408**	1,000	,013	-,075	-,103	,036	-,071	,096
	p	,621	,482	,006	,001	,	,917	,543	,401	,773	,567	,436
Alter	r	-,244*	,393**	-,088	,243*	,013	1,000	-,075	-,182	,196	,301*	,152
	p	,045	,001	,478	,046	,917	,	,545	,138	,112	,013	,215
SEX	r	-,067	,038	-,182	-,229	-,075	-,075	1,000	,087	-,082	-,156	-,330**
	p	,588	,759	,137	,061	,543	,545	,	,480	,511	,209	,006
Rau- chen	r	,084	-,115	-,018	-,056	-,103	-,182	,087	1,000	,251*	,195	-,001
	p	,493	,352	,881	,652	,401	,138	,480	,	,041	,113	,994
PD	r	-,217	,102	,138	,041	,036	,196	-,082	,251*	1,000	,914**	,631**
	p	,078	,412	,265	,744	,773	,112	,511	,041	,	,000	,000
CAL	r	-,260*	,025	,090	,017	-,071	,301*	-,156	,195	,914**	1,000	,645**
	p	,033	,844	,468	,890	,567	,013	,209	,113	,000	,	,000
CAL- Bakt.	r	-,048	,067	,209	,059	,096	,152	-,330**	-,001	,631**	,645**	1,000
	p	,697	,589	,088	,631	,436	,215	,006	,994	,000	,000	,

*. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

**.. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

r = Korrelationskoeffizient nach *Pearson* (zweiseitig); PD, Sondiertiefe; CAL, klinischer Attachmentverlust; CAL_{Bakt}, Attachmentverlust an den Probeentnahmestellen für den mikrobiologischen Test.

4.7.1. Assoziationen zu *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.)

Bei HLA-Bw6, HLA-B*08:Cw*07:DRB1*03:DRB3*:DQB1*02 und HLA-DRB1*13:DRB3*:DQB1*06 positiven Parodontitispatienten wurde A.a. signifikant häufiger bei schwach positivem Zusammenhang nachgewiesen (Tab. 20, 21, 22).

Tab. 20 Nachweis von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.) in der Gesamtparodontitisgruppe (N = 68) in Abhängigkeit von HLA-Bw6. r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

Leitkeim	Bw6 positiv	(N = 55)	Bw6 negativ	(N = 13)	Chi ²	P _{Pearson}	p _{Fisher}	r
	n	pf (%)	n	pf (%)				
A.a. +	24	43,6	1	7,7	5,843	0,013	0,013	0,293
A.a. -	31	56,4	12	92,3				

Tab. 21 Nachweis von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.) in Abhängigkeit von HLA-B*08:Cw*07:DRB1*03:DRB3*:DQB1*02 in der Gesamtparodontitisgruppe. r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

Leitkeim	B*08: Cw*07; DRB1*03: DRB3*: DQB1*02 positiv	(N = 8)	B*08: Cw*07; DRB1*03: DRB3*: DQB1*02 negativ	(N = 60)	Chi ²	P _{Pearson}	p _{Fisher}	r
	n	pf (%)	n	pf (%)				
A.a. +	6	75,0	19	31,7	5,701	0,017	0,025	0,290
A.a. -	2	25,0	41	68,3				

Tab. 22 Nachweis von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.) in Abhängigkeit von HLA-DRB1*13:DRB3*52:DQB1*06 in der Gesamtparodontitisgruppe. r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

Leitkeim	DRB1*13: DRB3*: DQB1*06 positiv	(N = 13)	DRB1*13: DRB3*: DQB1*06 negativ	(N = 55)	Chi ²	P _{Pearson}	P _{Fisher}	r
	n	pf (%)	n	pf (%)				
A.a. +	8	61,5	17	30,9	5,701	0,039	0,043	0,250
A.a. -	5	38,5	38	69,1				

Bei homozygotem Nachweis von HLA-Bw4 (Tab. 23) und bei HLA-DRB1*04:DRB4*:DQB1*03 positiven Patienten wurde A.a. dagegen signifikant seltener nachgewiesen (Tab. 24). Dabei war die Kombination HLA-DRB1*04:DRB4* jeweils bei fünf Patienten mit HLA-DQB1*0301 (DQ7) bzw. HLA-DQB1*0302 (DQ8) kombiniert. Bei einem Patienten wurde sowohl HLA-DQB1*0301 und HLA-DQB1*0302 nachgewiesen.

Tab. 23 Nachweis von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.) in der Gesamtparodontitisgruppe in Abhängigkeit von HLA-Bw4,4. r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

Leitkeim	Bw4,4 positiv	(N = 13)	Bw4,4 negativ	(N = 55)	Chi ²	P _{Pearson}	P _{Fisher}	r
	n	pf (%)	n	pf (%)				
A.a. +	1	7,7	24	43,6	5,843	0,013	0,013	-0,293
A.a. -	12	92,3	31	56,4				

Tab. 24 Nachweis von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.) in Abhängigkeit von HLA-DRB1*04:DRB4*:DQB1*03 in der Gesamtparodontitisgruppe. r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

Leitkeim	DRB1*04: DRB4*: DQB1*03 positiv	(N = 11)	DRB1*04: DRB4*: DQB1*03 negativ	(N = 57)	Chi ²	P _{Pearson}	P _{Fisher}	r
	n	pf (%)	n	pf (%)				
A.a. +	1	9,1	24	42,1	4,323	0,038	0,035	-0,252
A.a. -	10	90,9	33	57,9				

4.7.2. Assoziationen zu *Porphyromonas gingivalis* (P.g.)

Der Nachweis von P.g. war signifikant positiv mit dem HLA-Merkmal A*02 assoziiert bei mittelstark positivem Zusammenhang (Tab. 25).

Tab. 25 Nachweis von *Porphyromonas gingivalis* (P.g.) in der Gesamtparodontitisgruppe in Abhängigkeit von HLA-A*02. r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

Leitkeim	A*02 positiv	(N = 30)	A*02 negativ	(N = 38)	Chi ²	p _{Pearson}	p _{Fisher}	r
	n	pf (%)	n	pf (%)				
P.g. +	30	100	29	76,3	8,189	0,004	0,003	0,347
P.g. -	0	0,00	9	23,7				

4.7.3. Assoziationen zu *Prevotella intermedia* (P.i.)

Nur in der AP-Gruppe (N = 33) war P.i. mittelstark negativ zu HLA-DRB1*13, -DRB1*13:DQB1*06 und -DRB1*13:DRB3*:DQB1*06 assoziiert (Tab. 26).

Tab. 26 Nachweis von *Prevotella intermedia* (P.i.) bei AP-Patienten (N = 33) in Abhängigkeit von HLA-DRB1*13, -DRB1*13:DQB1*06 und -DRB1*13:DRB3*:DQB1*06. r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

Leitkeim	DRB1*13: DRB3*: DQB1*06 positiv	(N = 6)	DRB1*13: DRB3*: DQB1*06 negativ	(N = 27)	Chi ²	p _{Pearson}	p _{Fisher}	r
	n	pf (%)	n	pf (%)				
P.i. +	1	16,7	20	74,1	6,991	0,008	0,016	-0,460
P.i. -	5	83,3	7	25,9				

In der Gesamtparodontitisgruppe waren Patienten mit HLA-B*44:DRB1*13 in keinem Fall P.i. positiv (Tab. 27). HLA-B*5 (Übermerkmal von B*51 und B*52) war negativ zum Nachweis von P.i. assoziiert (Tab. 28), wobei siebenmal das Allel B*51 und einmal das Allel B*52 vorkam. Eine P.i.-Infektion war auch bei homozygotem Vorkommen von HLA-DRB3* (DR52) signifikant seltener (Tab. 29). Alle für P.i. beschriebenen Assoziationen waren von geringer Stärke.

Tab. 27 Nachweis von *Prevotella intermedia* (P.i.) in Abhängigkeit von HLA-B*44:DRB1*13 in der Gesamtparodontitisgruppe. r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

Leitkeim	B*44: DRB1*13 positiv	(N = 4)	B*44: DRB1*13 negativ	(N = 64)	Chi ²	p _{Pearson}	p _{Fisher}	r
	n	pf (%)	n	pf (%)				
P.i. +	0	0,0	43	67,2	7,310	0,007	0,016	-0,328
P.i. -	4	100,0	21	32,8				

Tab. 28 Nachweis von *Prevotella intermedia* (P.i.) bei HLA-B*05 positiven bzw. negativen Patienten in der Gesamtparodontitisgruppe. r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

Leitkeim	B*5 positiv	(N = 8)	B*5 negativ	(N = 60)	Chi ²	p _{Pearson}	p _{Fisher}	r
	n	pf (%)	n	pf (%)				
P.i. +	2	25,0	41	68,3	5,701	0,017	0,025	-0,290
P.i. -	6	75,0	19	31,7				

Tab. 29 Nachweis von *Prevotella intermedia* (P.i.) in Abhängigkeit von HLA-DRB3*:DRB3* in der Gesamtparodontitisgruppe. r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

Leitkeim	DRB3*: DRB3* positiv	(N = 8)	DRB3*: DRB3* negativ	(N = 60)	Chi ²	p _{Pearson}	p _{Fisher}	r
	n	pf (%)	n	pf (%)				
P.i. +	2	25,0	41	68,3	5,701	0,017	0,025	-0,290
P.i. -	6	75,0	19	31,7				

4.7.4. Assoziationen zu *Tannerella forsythensis* (T.f.)

T.f. wurde signifikant seltener bei HLA-A*33 positiven Patienten nachgewiesen (Tab. 30).

Tab. 30 Nachweis von *Tannerella forsythensis* (T.f.) in der Gesamtparodontitisgruppe bei HLA-A*33 positiven und negativen Patienten. r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

Leitkeim	A*33 positiv	(N = 6)	A*33 negativ	(N = 62)	Chi ²	p _{Pearson}	p _{Fisher}	r
	n	pf (%)	n	pf (%)				
T.f. +	4	66,7	59	95,2	6,520	0,011	0,058	-0,310
T.f. -	2	33,3	3	4,8				

4.7.5. Assoziationen zum „Roten Komplex“

Da das Vorkommen von P.g., T.f. und T.d. untereinander positiv assoziiert war, konnten diese Bakterien nach *Socransky et al.* (1998) zum „Roten Komplex“ zusammengefasst werden. Eine signifikant positive Assoziation dieses Bakterienklusters wurde zu HLA-A*02 (Tab. 30) und HLA-A*09 nachgewiesen (Tab. 31). Dabei waren alle 14 HLA-A*09 positiven Patienten (11mal Splitmerkmal A*24, 3mal Splitmerkmal A*23) P.g., T.f. und T.d. positiv.

Tab. 30 Nachweis von Bakterien des „Roten Komplexes“ in der Gesamtparodontitisgruppe bei HLA-A*02 positiven und negativen Patienten. r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

Leitkeime	A*02 positiv	(N = 30)	A*02 negativ	(N = 38)	Chi ²	p _{Pearson}	p _{Fisher}	r
	n	pf (%)	n	pf (%)				
Pg, T.f., T.d. +	28	93,3	27	71,7	5,328	0,020	0,019	0,218
P.g., T.f., T.d. -	2	6,7	11	28,9				

Tab. 31 Nachweis von Bakterien des „Roten Komplexes“ in der Gesamtparodontitisgruppe bei HLA-A*09 positiven und negativen Patienten. r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

Leitkeime	A*09 positiv	(N = 14)	A*09 negativ	(N = 54)	Chi ²	p _{Pearson}	p _{Fisher}	r
	n	pf (%)	n	pf (%)				
Pg, T.f., T.d. +	14	100,0	41	75,9	4,167	0,041	0,035	0,035
Pg, T.f., T.d. -	0	0,0	13	24,1				

4.8. Zusammenfassung der Assoziationen von HLA zu parodontalen Leitkeimen

In der Gesamtparodontitisgruppe konnten signifikante Assoziationen von HLA-Einzelmerkmalen und -Kombinationen zu parodontalen Leitkeimen nachgewiesen werden. Dabei wurden auch HLA-Merkmale auffällig, bei denen bisher keine Assoziation zur Parodontitis aus den Voruntersuchungen bekannt war. Mit logistischer Regression unter Einbeziehung der Kofaktoren Alter, Geschlecht, Rauchen, Mittelwert des Attachmentverlustes an den vier Entnahmestellen für den mikrobiologischen Test (CAL_{Bakt}) und der evaluierten auffälligen HLA-Merkmale wurde die adjustierte OR für eine subgingivale Besiedelung mit parodontalen Leitkeimen bestimmt. Die HLA-Kombinationen B*08:Cw*07:DRB1*03:DQB1*02 und DRB1*13:DRB3*:DQB1*06 erhöhten signifikant die individuelle OR für eine Infektion mit A.a. um das 6,2 bzw. 4,5fache. Obwohl HLA-A*02 bei AP von der Tendenz vermindert war, wurde bei HLA-A*02 positiven Patienten immer P.g. und signifikant häufiger Bakterien des „Roten Komplexes“ nachgewiesen. HLA-B*5 (B*51=87,5%, B*52=12,5%), eine Homozygotie von HLA-DRB3*(DR52) und HLA-DRB1*13:DRB3*:DQB1*06 (nur in der AP-Gruppe) verminderten die OR für eine P.i.-Infektion. HLA-A*33 war mit einer verminderten OR für eine Infektion mit T.f. verbunden. HLA-A*09 (Split A*23=21,4%, Split A*24=78,6%) positive Patienten waren immer mit Bakterien des „Roten Komplexes“ infiziert (Tab 31).

Tab. 31 Signifikante Assoziationen von HLA-Merkmalen bzw. -Kombinationen zur Parodontitis und *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.), *Porphyromonas gingivalis* (P.g.), *Prevotella intermedia* (P.i.), *Tannerella forsythensis* (T.f.) und *Treponema denticola* (T.d.). Wenn bei einem bestimmten HLA-Merkmal ein Bakterium zu 100 % nachgewiesen wurde, wurde die Odds ratio (OR) nicht berechnet. OR adjustiert für Alter, Geschlecht, Rauchen und CAL_{Bakt}

HLA-	Assoziation zur Parodontitis	Assoziation zu Leitkeim	OR (CI) für Bakterienkolonisation	p
Bw6	nein	A.a. ↑	8,2 (0,9-68)	0,052
B*08:Cw*07:DRB1*03:DRB3*:DQB1*02	nein	A.a. ↑	6,2 (1,1-34,6)	0,039
DRB1*13:DRB3*:DQB1*06	AP ↑	A.a. ↑	4,5 (1,2-17,1)	0,029
Bw4 homozygot	nein	A.a. ↓	0,1 (0,01-1,0)	0,052
DRB1*04:DRB4*:DQB1*03	AP ↓	A.a. ↓	0,2 (0,02-1,2)	0,077
A*02:(A*03)	AP ↓	P.g. ↑ P.g.,T.f.,T.d. ↑	100% P.g. + 5,5 (1,1-28,9)	n.m. 0,04
B*5 (B*51, B*52)	AP, CP ↓	P.i. ↓	0,2 (0,03-0,8)	0,030
DRB3* (DR52) homozygot	nein	P.i. ↓	0,1 (0,02-0,6)	0,013
DRB1*13:(DRB3*:DQB1*06) ¹	AP ↑	P.i. ↓	0,07 (0,007-0,7)	0,024¹

Fortsetzung Tab. 31

A*33	AP ↑ AP + CP ↑	T.f. ↓	0,03 (0,002-0,6)	0,025
A*09	AP+CP♂↓	P.g.,T.f.,T.d. ↑	100% +	n.m.

CI, Confidence Intervall; CAL_{Bakt}, Attachmentverlust an den Probeentnahmestellen, ¹OR nur in der AP-Gruppe signifikant; n.m., Berechnung nicht möglich, da Keim zu 100% mit HLA-Merkmal assoziiert vorkam.

5. Diskussion

5.1. Parodontitispatienten und Kontrollgruppen

Im Vergleich zu bisherigen Studien über HLA-Assoziationen zu Parodontitis wurden folgende Punkte berücksichtigt:

1. Die HLA-Phänotypfrequenzen der Patienten mit AP und CP wurden mit denen aus einer parodontitisfreien Kontrollgruppe erhobenen verglichen. Durch die Selektion von Probanden ohne Parodontitis als eigentliche Referenzgruppe konnte im Vergleich zu Studien, die nur Blutspender als Kontrollprobanden auswählten (u.a. *Reinholdt et al. 1977, Marggraf et al. 1983, Katz et al. 1987, Shapira et al. 1994, Firatli et al. 1996*), ein besserer Kontrast zwischen „erkrankt“ und „nicht erkrankt“ erzielt werden. Die Kontrastierung wurde dahingehend verschärft, dass die Altersgrenze der Kontrollprobanden im Vergleich zu bisherigen Studien deutlich angehoben wurde (≥ 38 Jahre). Im Mittelwert waren Kontrollprobanden signifikant älter als Patienten mit AP oder CP. Weiterhin wurden speziell Kontrollprobanden mit einer schlechten Mundhygiene (API > 30 %) ausgewählt. Hinsichtlich der Geschlechterverteilung und der Anzahl der Raucher unterschieden sich die Gruppen nicht signifikant voneinander. Das ist insofern von Bedeutung, da Rauchen ein starker Risikofaktor für Parodontitis ist und die Verteilung von HLA-Merkmalen in Gruppen, wie gezeigt, auch von der Geschlechterverteilung abhängig ist. Die Kohorte der 157 parodontal nicht untersuchten Blutspender repräsentierte hinsichtlich der HLA-Merkmale die Normalverteilung und diente lediglich der Abschätzung, ob ein Merkmal eine Abweichung innerhalb der Patientengruppe, der parodontitisfreien Kontrollgruppe oder innerhalb beider Gruppen aufwies. Auf einen direkten Vergleich zwischen Parodontitispatienten und der Normalpopulation wurde verzichtet, da in der Blutspendergruppe mit hoher Wahrscheinlichkeit auch Probanden mit Parodontitis vorkamen (*Reich et al. 1996*). Da HLA-Assoziationen ethnischen Unterschieden

- unterliegen wurden in die Studie nur deutsche Probanden kaukasischen Ursprungs einbezogen.
2. Die Anzahl der Patienten und Kontrollprobanden war höher (≥ 50) als in den meisten bisherigen Studien, so dass auch Deviationen selten vorkommender HLA-Allele bzw. Homozygotien (z.B. HLA-A*30+*31, HLA-DQB1*06,06) aufgedeckt werden konnten.
 3. Bei der Auswertung wurden erstmalig geschlechtsabhängige HLA-Assoziationen berücksichtigt, da geschlechtsabhängige Prävalenzunterschiede für die lokalisierte (Cogen et al. 1992, Loe und Brown 1991, Melvin et al. 1991) und generalisierte (Suzuki 1988) aggressive Parodontitis beschrieben wurden.
 4. HLA-Klasse I-Merkmale wurden sowohl mit serologischer und molekularbiologischer Typisierungstechnik bestimmt. Dadurch konnten serologische Ergebnisse abgesichert, verfeinert oder erweitert werden. Bis auf die Studien von Ohyama et al. (1996), Takashiba et al. (1999), Bonfil et al. (1999) und Takahashi et al. (2001) wurden in bisherigen Untersuchungen nur serologische Typisierungstechniken angewandt mit unsicherem Nachweis von HLA-Klasse II-Allelen. Klasse II-Merkmale wurden deshalb in der vorliegenden Studie in der Regel nur molekularbiologisch typisiert.
 5. Es wurden in dieser Studie sowohl HLA-Klasse I- und II-Merkmale nachgewiesen. In vielen bisherigen Studien wurden nur HLA-Klasse I- (u.a. Terasaki et al. 1975, Reinholdt et al. 1977, Marggraf et al. 1983) oder nur HLA-Klasse II-Merkmale (u.a. Katz et al. 1987, Bonfil et al. 1999, Takahashi et al. 2001) bestimmt. Da neben HLA-Klasse II abhängiger Präsentation bakterieller Peptide auch andere Mechanismen die Assoziation von HLA-Merkmalen zu Parodontitis erklären könnten (z.B. Mimikry von HLA-Molekülen zu parodontalen Bakterien, Assoziation von HLA-Merkmalen zu bisher unbekanntem Suszeptibilitäts- bzw. Resistenzfaktoren, haplotypische Kopplung von HLA-Klasse I- und II-Merkmalen) war eine Überprüfung beider HLA-Klassen sinnvoll.
 6. Erstmals wurde die Assoziation von HLA-Merkmalen bzw. HLA-Kombinationen zum Nachweis subgingivaler Bakterien untersucht.

5.2. Vergleich der Ergebnisse zu kaukasischen Studienkohorten

Die in dieser Studie auffälligen HLA-Einzelmerkmale oder HLA-Merkmale in Verbindung mit rechnerisch ermittelten HLA-Kombinationen zeigten Gemeinsamkeiten zu bereits publizierten Ergebnissen aus kaukasischen Populationen (Tab. 32).

Tab. 32 In der vorliegenden Studie ermittelte HLA-Assoziationen zur aggressiven (AP) und chronischen (CP) Parodontitis im Vergleich zu bisher veröffentlichten Studienergebnissen bei kaukasischen Populationen

HLA-Assoziationen zur AP und CP in der vorliegenden Studie		In früheren Studien (Kaukasier) beschriebene HLA-Assoziationen zur Parodontitis		
HLA-	Parodontitis	HLA-	Parodontitis	Autor
↓ A*02,A*03	AP	↓ A2	JP + AdP	<i>Terasaki et al. 1975</i>
↑ A* 68/*69 (A28) ↑ A*68/*69:Cw*07:B*18	AP ♀ AP	↑ A28	JP	<i>Reinholdt et al. 1977</i>
↑ A*33	CP AP+CP	↑ A33	JP	<i>Cogen et al. 1986</i>
↑ Cw*08:B*14:DRB1*04: DRB4*:DQB1*0302	CP	↑ DR4	AdP	<i>Alley et al. 1993</i> <i>Dyer et al. 1997</i>
↓ A*24 (A9)	AP+CP	↑ A9 ↑ A23,24	JP, AdP, RPP	<i>Reinholdt et al. 1977</i> <i>Marggraf et al. 1983</i> <i>Klouda et al. 1986</i> <i>Amer et al. 1988</i>

JP, juvenile Parodontitis; AdP, Erwachsenenparodontitis; RPP, rapid progressive Parodontitis

HLA-A*02 war unter einer kaukasischen (Amerikaner) JP und AdP Kohorte vermindert (*Terasaki et al. 1975*). In der vorliegenden Studie war dieses Merkmal in Kombination mit HLA-A*03 bei AP seltener, während bei CP HLA-A*01:A*03 weniger häufig auftrat. Diese Befunde könnten darauf hindeuten, dass HLA-A*03 in Abhängigkeit von den HLA-Merkmalen A*01 für CP und A*02 für AP den eigentlichen Resistenzindikator darstellt. *Bucin et al. (1985)* wiesen für HLA-A*03 einen möglichen Resistenzmechanismus dadurch nach, dass Lymphozyten von HLA-A*03 positiven Personen schneller durch Lektine (PHA) stimuliert wurden, als bei A*03 negativen Probanden, also über eine bessere Immunantwort verfügten. Eine Beziehung zwischen dem intrazellulären Eisenpool und der Expression von Rezeptoren durch PHA stimulierte T-Zellen, wie z.B. des IL-2 Rezeptors und des Transferrinrezeptors könnten damit im Zusammenhang stehen (*Pelosi et al. 1986, Pelosi-Testa et al. 1988*), denn HLA-A3 wurde bei 60-80 % der Patienten mit hereditärer Hämochromatose gefunden (RR = 5-12). Dabei wird eine Kopplung von HLA-A3 mit dem für diese Erkrankung primär verantwortlichen HFE-Gen vermutet (*Wassmuth 1995*).

Wie in einer Dänisch-Kaukasischen Population mit JP (*Reinholdt et al. 1977*) war in dieser

Arbeit HLA-A*28 unter AP-Patientinnen und in Kombination mit HLA-Cw*07:B*18 in der Gesamt-AP-Gruppe erhöht und stellt damit einen möglichen Risikoindikator für aggressive Parodontitisformen dar. Interessanterweise war dieses Merkmal oder das Splitantigen A*68 unter negroiden Patienten mit AdP oder JP vermindert (*Goteiner* und *Goldman* 1984, *Moses* et al. 1994). Somit scheint das Vorkommen von HLA-A*28 nicht nur geschlechtsspezifischen sondern auch ethnischen Einflüssen zu unterliegen. Für HLA-A28 wird eine positive Assoziation zur „Polyglandular autoimmune disease (PGAD)“ beschrieben, einer Erkrankung, die mit dem fünften Lebensjahr beginnt und u.a. Symptome wie Candidiasis, Hypoparathyroidismus, M. Addison und verschiedene immunologische Störungen wie T-Zelldefekte und IgA-Defizienz aufweist (*Betterle* und *Volpato* 1998). Weiterhin kann HLA-A*28 tumorassoziierte Peptide präsentieren (*Chaux* et al. 1999, *Baurain* et al. 2000).

Die signifikante Erhöhung von HLA-A*33 bei CP und in der AP + CP Gruppe wird durch Ergebnisse aus einer kaukasisch-amerikanischen JP-Kohorte (*Cogen* et al. 1986) bestätigt. HLA-A*33 trat unter der parodontitisfreien Kontrollgruppe nicht auf und könnte deshalb ein übergeordneter Risikoindikator für Parodontitis sein. Die in 2 amerikanischen Studien mit kaukasischen AdP-Patienten beschriebene Erhöhung von HLA-DR4, -DR53 und -DQ3 (*Alley* et al. 1993, *Dyer* et al. 1997) wurde in der vorliegenden Arbeit insofern bestätigt, dass die Kombination HLA-DRB1*04:DRB4*(DR53):DQB1*0302 bei CP signifikant häufiger war, wenn gleichzeitig der ancestrale Haplotyp HLA-Cw*08:B*14 nachgewiesen wurde. Bei AP wurde HLA-DRB1*04, wie in einer japanischen EOP-Gruppe (*Ohyama* et al. 1996), dagegen signifikant seltener in Kombination mit HLA-DQB1*0302 nachgewiesen. Somit liegt die Vermutung nahe, dass nicht HLA-DRB1*04 sondern eher HLA-Cw*08:B*14 für die Entstehung einer CP von Bedeutung ist. Da HLA-Cw*08:B*14 unter parodontal Gesunden nicht nachgewiesen wurde, ist dieser Haplotyp möglicherweise mit einer verringerten Resistenz für CP assoziiert. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass HLA-Haplotypen mit B*14 wie HLA-A1:B14, HLA-A28:B14 (*Cobain* et al. 1983) bzw. HLA-A33:B*14:DR1 und HLA-A28:B*14:DR1 (*Cuccia-Belvedere* et al. 1989) auch bei selektiver IgA-Defizienz (IgA-D) nachgewiesen wurden. In einer retrospektiven Analyse einer deutschen Gruppe IgA-defizienter Probanden (N = 80) (*Machulla* et al. 2000, *Schönermarck* 1999) war der ancestrale Haplotyp HLA-Cw*08:B*14 zu 66,7 % mit HLA-DRB1*01 und zu 20 % mit HLA-DRB1*04 kombiniert. Somit scheinen bei CP und IgA-Mangel Gemeinsamkeiten im HLA-Muster zu existieren, wobei HLA-Cw*08:B*14 bei IgA-Mangel mehr mit HLA-DRB1 und bei CP mehr mit (67 vs. 33%) HLA-DRB1*04 assoziiert vorkam. Auf bei IgA-D und Parodontitis gemeinsam vorkommende HLA-Merkmale deutet auch der Befund hin, dass die Kombination HLA-B*08:(Cw*07):DRB1*0301:(DRB3*):DQB1*0201 sowohl bei IgA-D (pf = 16,9 %) als auch bei A.a. positiven Parodontitispatienten (pf = 24 %) vermehrt nachgewiesen wurde (Normalverteilung pf = 8 %). Der Einfluss des HLA-Haplotyps B8:DR3 und des weiblichen Geschlechts auf die IgA-Serumkonzentration könnte in Beziehung zur hohen Inzidenz von

Autoimmunerkrankungen bei Frauen mit diesem Haplotyp stehen (*Modica et al. 1989*). Ein erhöhtes Parodontitisrisiko für Patienten mit IgA-Mangel wurde bisher nicht nachgewiesen (*Robertson et al. 1980, Storch et al. 1989, Dahlen et al. 1993*). Hohe initiale Ausgangswerte spezifischer serologischer IgG- und IgA-Antikörper gegen P.g. führten bei Patienten mit Erwachsenenparodontitis jedoch zu einem besseren Behandlungsergebnis (*Mooney et al. 1995*). Bei Patienten mit generalisierter aggressiver Parodontitis wurde eine verminderte IgA-Speichelsekretionsrate (insbesondere IgA 1) nachgewiesen bei Erhöhung des Anteils spezifischer Antikörper gegen A.a. Y4, T.d. ATCC 35404 und *Candida albicans* DSM 3454 (*Hägewald et al. 2002*).

Die Verminderung von HLA-DRB1*04:DQB1*03 in der AP Gruppe wurde auch in einer deutschen Gruppen mit Juveniler Idiopathischer Arthritis (JIA) nachgewiesen (*Minden et al. 2001*). Dieses Resultat war in sofern überraschend, da bei erwachsenen Populationen mit Rheumatoidarthritis HLA-DR4 erhöht war (*Heard 1994, Tiwari und Terasaki 1985*), wobei Patienten, die homozygot für HLA-DR4 waren, schwerere aggressive Verläufe zeigten (*Helmke 1996*). Patienten mit JIA wiesen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden mehr Parodontien mit einem parodontalen Attachmentverlust > 3,5 mm auf (*Reichert et al. 2006*). Eine Verbindung zwischen Parodontitis und chronischen Arthritiden könnte darin bestehen, dass eine gemeinsame HLA abhängige genetische Disposition für die Bindung bestimmter parodontopathogener bzw. arthritogener Peptide besteht. So waren 9,4 % von 171 Parodontitispatienten IgM-Rheumafaktor (RF) positiv mit erhöhtem IgM- und IgG-Antikörpertiter gegen *Capnocytophaga species* (C.sp.) und *Fusobacterium nucleatum* (F.n.) (*The 1991*). Der IgM-RF reagierte unter In-vitro Bedingungen mit verstärkter Intensität gegen IgG, welches spezifisch für *Capnocytophaga gingivalis* (C.g.), F.n. oder A.a. war. Weiterhin konnte der IgM-RF an Oberflächenkomponenten von C.g. und F.n. binden (*The und Ebersole 1996*). Bei Patienten mit RA war der IgG-Titer gegen das Hitzeschockprotein DnaJ von A.a. im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden signifikant erhöht (*Yoshida et al. 2001*).

Im Kontrast zu den Resultaten von *Reinholdt et al. (1977)*, *Marggraf et al. (1983)*, *Klouda et al. (1986)* und *Amer et al. (1988)* wurde in keiner Patientengruppe eine Erhöhung von HLA-A*9 bzw. der Splitmerkmale HLA-A23 und -A24 beobachtet, sondern eine signifikante Verringerung von HLA-A*24 unter Männern in der Gesamtparodontitisgruppe (AP + CP). Weiterhin konnte in der vorliegenden Studie eine Verringerung von HLA-A10 (*Amer et al. 1988*) bzw. der Splitmerkmale HLA-A*25 und A*26 nicht bestätigt werden.

5.3. Vergleich der Ergebnisse zu nicht kaukasischen Studiengruppen

In der vorliegenden Studie zeigten Patienten mit AP und CP von der Tendenz ($p > 0,05$) eine höhere Homozygotiefrequenz der HLA-Merkmale DRB1*15, DRB5* (DR51) und DQB1*06, erklärbar durch das positive Kopplungsungleichgewicht zwischen diesen Markern (*Gjertson et*

al. 1998). Eine Homozygotie für HLA-DRB1*15, -DRB5* und -DQB1*06 könnte somit prädisponierend für Parodontitis sein. Die Bedeutung der HLA-Marker DRB1*15 und DQB1*06 als Suszeptibilitätsindikatoren für aggressive Parodontitis wird durch die Ergebnisse verschiedener Japanischer Studien erhärtet. Der HLA-Haplotyp DRB1*1501-DQB1*0602 kam bei japanischen G-EOP Patienten vermehrt vor (Ohyama et al. 1996). Im DQB-β Gen wurde bei EOP-Patienten vermehrt eine atypische BamHI Restriktionsstelle gefunden. Weiterhin wurden in der hypervariablen Region des HLA-DQB Moleküls von EOP-Patienten an den Positionen 57 bzw. 70 häufiger die Kombination von Asparaginsäure (D) und Glycin (G) nachgewiesen. Dadurch könnte die Antigenerkennung und -Präsentation parodontopathogener Peptide und somit die Suszeptibilität für EOP beeinflusst sein. Der Peptidabschnitt NKVPIIVKRAAIRASMTITQQ des äußeren Membranproteins von *P. gingivalis* (Ag 53) induzierte unter In-vitro Bedingungen die Proliferatuion von polyklonalen T-Zelllinien, die von Patienten mit aktiver G-EOP stammten. Diese Proliferation konnte durch monoklonale Antikörper gegen HLA-DRB1 inhibiert werden. Es wurde geschlussfolgert, dass HLA-DRB1 Moleküle für die Bindung des Ag 53 verantwortlich sind (Ohyama et al. 1998). Das Ag 53 besitzt Ankeraminosäuren, die an komplementäre Bindungstaschen der hypervariablen Region von HLA-DRB1*15 binden könnten. Dadurch wurde die (theoretische) Definition zweier T-Zellepitope möglich (Abb. 4) (Takashiba et al. 1999).

Abb. 4 Möglichkeiten der Bindung des Ag 53 *P. gingivalis* durch HLA-DRB1*1501 an den Positionen P1, P4 und P7 mit P1 in absoluter Position 3 (Epitop 1) bzw. 6 (Epitop 2). T-Zell-Epitop 1 bindet an den Positionen P1 und P4 und T-Zell-Epitop 2 an den Positionen P1 und P7.

■ Peptidbindungsstelle, □ keine Peptidbindungsstelle

	Position:								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankeraminosäuren	L			F			I		
	V			Y			L		
	I			I			V		
							M		
							F		

Ag53 p141-161 *P. gingivalis*

	N	K	V	P	I	I	V	K	R	A	A	I	R	A	S	M	T	I	T	Q	Q	
T-Zell-Epitop 1			■		■							□										
T-Zell-Epitop 2													■			□						■

Epitopevorhersagen sind auch durch online verfügbare Datenbanken möglich. So wird z. B.

mit dem Programm SYFPEITHY (<http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com/>) (Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Universität Tübingen) zur Epitopvorhersage das zu untersuchende Peptid in der gesamten Frequenz abschnittsweise abgetastet und die Ankeraminosäuren in den Positionen P1 bis P9 auf Ähnlichkeiten zu schon bekannten Liganden des jeweiligen HLA-Moleküls untersucht (Rammensee et al. 1999). Im Ergebnisprotokoll werden dann die postulierten MHC-Bindungspeptide entsprechend ihrer Ähnlichkeit zu bekannten MHC-Liganden mit Score-Werten versehen (SYFPEITHY) und nach Wertigkeit geordnet. Dabei wird das zentrale Neunerpeptid in der Bindungsgrube des HLA-Allels und zusätzlich an jeder Seite noch drei Aminosäuren als flankierende Sequenzen berechnet. Die postulierten MHC-Liganden erscheinen somit als 15mere mit P1 in absoluter Position 4. Zur Epitopvoraussage werden nicht nur bekannte Ankeraminosäurepositionen, sondern auch Erkenntnisse aus bisher unveröffentlichten Studien genutzt. Im Programm SYFPEITHY wurden beispielsweise für das Allel HLA-DRB1*1501 nicht nur die bekannten Ankerbindungsstellen an den Positionen P1, P4 und P7, sondern weitere bevorzugte Bindungsstellen an P6 und P9 (Stevanovic, persönliche Mitteilung) berücksichtigt. Wird das komplette Peptid Ag53 *P. gingivalis* (TrEmbl, Accessions Nr. Q9RM67) mit dem Programm SYFPEITHY auf T-Zellepitope, die an HLA-DRB1*1501 binden könnten, überprüft, so erhält das von Takashiba et al. 1999 definierte T-Zellepitop 2 mit 24 Score-Punkten die 11.-beste Bewertung (Tab. 33). Dieses Beispiel zeigt, wie schwierig die Epitopvorhersage für Peptide ist, die an HLA-Klasse II-Moleküle binden könnten. Deshalb müssen postulierte T-Zellepitope experimentell durch Bindungstests bestätigt werden (Vogt et al. 1994).

Tab. 33 Epitopvorhersage für die Bindung von Ag53 *P. gingivalis* an HLA-DRB1*1501 und mit dem Programm SYFPEITHY. Es wurde das zentrale 9er-Peptid in der Bindungsgrube mit je drei flankierenden Aminosäuren an jeder Seite berechnet. P1 befindet sich deshalb in absoluter Position 4 des T-Zellepitopes. Mögliche Bindungsstellen sind unterstrichen. Das von Takashiba et al. 1999 definierte T-Zellepitop ist grün markiert

HLA-Allel	Ankeraminosäuren	Position	T-Zellepitope	Scorewert
DRB1*1501	P1: LVI	56	YNP <u>I</u> GE <u>Y</u> GGV <u>D</u> KIND	34
	P4: FYI	424	NVN <u>I</u> SK <u>F</u> ERN <u>I</u> GLSGN	34
	P7: ILVMF	393	AAAV <u>Y</u> YY <u>A</u> WL <u>N</u> PNTL	30
		385	NPR <u>V</u> VT <u>Y</u> KAAAV <u>Y</u> YY	28
	3	LNKMFLV <u>G</u> ALL <u>S</u> LG <u>F</u>	24	
	36	DTHMSVSM <u>S</u> L <u>P</u> QHNR	24	
	68	IND <u>L</u> TV <u>Y</u> VVG <u>D</u> GKID	24	
	113	EKT <u>Y</u> YA <u>I</u> VN <u>I</u> TPKVE	24	
	165	DQM <u>I</u> MSGKP <u>V</u> VQ <u>T</u> IL	24	
	186	NAS <u>V</u> QNKVP <u>I</u> IVKRA	24	
	193	V <u>P</u> I <u>V</u> KRA <u>A</u> I <u>R</u> ASMT	24	

Der Haplotyp HLA-DR15:DQ6 ist auch bei anderen Erkrankungen auffällig. Beim juvenilen Diabetes unterschieden sich positiv assoziierte DQB1-Moleküle von negativ assoziierten Molekülen durch die Aminosäure in Position 57 der ersten Domäne der β -Kette. Positiv assoziierte HLA-Merkmale (DQB1*0201, DQB1*0302) wiesen eine neutrale Aminosäure (Alanin, Valin oder Serin) an dieser Position auf, während negativ assoziierte Merkmale (DQB1*0602) Asparaginsäure an dieser Stelle trugen (*Wassmuth* 1995). Das bedeutet, dass die Aminosäureposition 57 sowohl für die Bindung diabetogener wie parodontpathogener Peptide von Bedeutung sein könnte. Diese molekularen Hypothesen bedürfen aber vor allem durch ethnische Einschränkungen der Modifikation. Unter Japanern sind die Allele HLA-DQB1*0401 und -DQB1*0303 mit erhöhter Disposition für juvenilen Diabetes verbunden, obwohl Asparaginsäure in Position 57 der DQB β -Kette der HLA-Moleküle lokalisiert ist. Dazu vergleichbar konnte in einer kaukasischen EOP-Gruppe im Vergleich zu japanischen EOP-Patienten keine Assoziation zu HLA-DQB1 Allelen bzw. der atypischen BamHI-Restriktionsstelle nachgewiesen werden (*Hodge et al.* 1999).

Der Haplotyp DRB1*1501:DQA1*0102:DQB1*0602 wurde bei 98,5 % aller europäischen Patienten mit Narkolepsie nachgewiesen (Normalverteilung HLA-DR15-DQ1 unter deutscher Bevölkerung = 8,8 %) und ist damit die stärkste bekannte HLA-Krankheitsassoziation. Bei narkolepsiekranken Pinschern und Dobermann-Hunden zeigte sich, dass Mutationen im Gen des Hypocretin-2-Rezeptors (*Hcrtr2*) die Ursache der Krankheit sind. Das *Hcrtr2*-Gen ist beim Hund auf Chromosom 12 lokalisiert. Diese Region ist homolog zum kurzen Arm des menschlichen Chromosoms 6, so dass eine Kopplung zum HLA-Locus wahrscheinlich ist (*Mayer und Kotterba* 2001).

5.4. Bisher nicht beschriebene HLA-Assoziationen zur Parodontitis

Sowohl die positive Assoziation der HLA-Merkmale A*29, DRB1*13 zur AP bzw. A*11 zur CP sowie die negative Assoziation von HLA-A*31 und HLA-A*30+*31 zur AP wurden bisher noch nicht beschrieben.

Auf eine Beteiligung von HLA-A29 an Autoimmunprozessen durch molekulare Mimikry deutet die Affinität des Merkmals zur „Birdshot Chorioretinopathie“ hin. In einer belgischen Studie wurde bei 95,9 % der Patienten mit dieser seltenen Form der Uveitis posterior HLA-A29 nachgewiesen (RR = 224). Für HLA-Klasse I-Moleküle ist es damit die stärkste bekannte Assoziation zu einer Erkrankung (*Priem et al.* 1988, *Baarsma et al.* 1990).

HLA-A*11 war bei CP als Einzelmerkmal und in Kombination mit HLA-Cw*07:B*18 signifikant erhöht. Für HLA-A*11 sind u.a. Liganden bzw. T-Zellepitope für EBV (*Steven et al.* 1996) und HCMV (*Hebart et al.* 2002) beschrieben worden. EBV und HCMV wurden in gingivalen Biopsien von Parodontitispatienten nachgewiesen. Durch eine virale Infektion des Parodonts könnte die lokale Immunantwort beeinträchtigt sein und eine subgingivale Kolonisation mit parodontpathogenen Keimen begünstigt werden (*Contreras et al.* 2000).

HLA-A*31 und HLA-A*30+*31 wurde bei aggressiver Parodontitis nicht nachgewiesen. Bei CP entsprach die Phänotypfrequenz beider Merkmale der Normalverteilung. In der gesunden Kontrollgruppe waren HLA-A*31 und –A*30+*31 dagegen nicht nur gegenüber den Patientengruppen sondern auch im Vergleich zur Blutspendergruppe signifikant vermehrt. Das bedeutet, dass HLA-A*31 bzw. –A*30+*31 Indikatoren für parodontale „Resistenz“ sein könnten und die Abwesenheit beider Marker das Risiko insbesondere für eine aggressive Parodontitis erhöht. Möglicherweise ist HLA-A*31 auch ein prognostisch günstiger Marker für Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML), denn bei CML-Patienten und Nachweis von HLA-A31 war eine Therapie mit Interferon-alpha erfolgreicher im Vergleich zu der bei Patienten, die dieses Merkmal nicht aufwiesen (*Cortes et al. 1998*). Der gleichsinnige protektive Effekt von HLA-A*03 und –A*30 könnte dadurch erklärt werden, dass beide Merkmale einer kreuzreagierenden Gruppe angehören.

HLA-DRB1*13 wurde bei AP als Einzelmerkmal und in Kombination mit HLA-DQB1*06 vermehrt nachgewiesen. Unter CP-Patienten als Einzelmerkmal unauffällig war die rechnerisch ermittelte Kombination HLA-Cw*07:B*44:DRB1*13 signifikant erhöht. Offenbar ist unter Kaukasiern für die AP die Kombination von HLA-DQB1*06 zu HLA-DRB1*13 mehr von Bedeutung, als die bei japanischen EOP-Patienten auffällige Kombination zu HLA-DRB1*15. Das HLA-Molekül DRB1*1301 hat in der hypervariablen Bindungsgrube spezifische Ankeraschen an den Positionen 1, 4, 6 und 9. Eine Epitopvorhersage für das immundominante Peptid Ag53 von P.g. unter Berücksichtigung von HLA-DRB1*1301 war mit der Datenbank RANKPEP (<http://mif.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html>, Harvard Medical School, Boston, USA, *Reche et al. 2002*) möglich. Diese Datenbank tastet, wie bei SYFPEITHY beschrieben, dass gesamte Peptid Ag53 ab und definiert T-Zellepitope in Abhängigkeit ihrer Ähnlichkeit zu bereits bekannten HLA-Liganden. Zusätzlich wird eine Bindungsschwelle festgelegt. Das schon für HLA-DRB1*1501 bekannte Bindungsmotif VPIIVKRAAIRA erschien im Ergebnisprotokoll an vierter Position, wobei eine Bindung an drei von vier möglichen Ankerpositionen erfolgen könnte (Tab. 34). Bindungstests wären deshalb sinnvoll, obwohl die vom Programm definierte Bindungsstärke mit 23,64 unterhalb des Optimums von 29,91 lag.

Tab. 34 Epitopvorhersage für die Bindung des immundominanten Peptids Ag53 *P. gingivalis* an HLA-DRB1*1301 und mit dem Programm RANKPEP. Mit dem Programm wurde das zentrale 9er-Peptid in der Bindungsgrube mit je drei flankierenden Aminosäuren an jeder Seite berechnet. P1 befindet sich deshalb in absoluter Position 4 des T-Zellepitopes. Mögliche Bindungsstellen sind unterstrichen. Das von *Takashiba et al.* 1999 definierte T-Zellepitop ist grün markiert

HLA-Allel	Ankeraminosäuren	Position	T-Zellepitope	Scorewert
DRB1*1301	P1: ILV	318	PNVAYKY <u>V</u> SE <u>T</u> IHAD	27,45
	P4: LVMAWY	20	FASCSKEGNGP <u>A</u> PDS	23,88
	P6: RK	397	GAGNPR <u>V</u> VTYK <u>A</u> AAV	23,81
	P9: YFAST	199	QNK <u>V</u> PII <u>V</u> K <u>R</u> AA <u>I</u> RA	23,64

5.5. Relation von HLA zu parodontalen Markerkeimen

In dieser Untersuchung sollte festgestellt werden, ob neben einer Assoziation von HLA-Markern zur Parodontitis auch eine Assoziation zu parodontalen Leitkeimen besteht. Für die mikrobiologische Untersuchung wurde ein kommerzieller PCR-rSSO Test für fünf Markerkeime angewandt, die sehr stark (A.a., P.g., T.f., T.d.) oder stark (P.i.) parodontopathogen wirken (*Socransky und Haffajee* 1994). Im Vergleich zu Anzuchtverfahren erwies sich der micro-Ident® Test sensitiver für den Nachweis von *P. gingivalis* und *T. forsythensis*. Weiterhin ist nur durch PCR-Techniken eine Abgrenzung von *P. intermedia* vom nur moderat pathogenen *P. nigrescens* möglich (*Eick und Pfister* 2002). Durch die Probenentnahme vor dem subgingivalen Scaling wurde eine Zerstörung des subgingivalen Biofilms und damit eine Reduktion der Markerkeime vor der mikrobiologischen Testung vermieden. Die mikrobiologischen Proben wurden aus den tiefsten Taschen pro Quadrant entnommen und gepoolt ausgewertet, da nicht die Anzahl der infizierten Parodontien sondern die Keimdetektion pro Patient Grundlage für die statistische Berechnung war. Semiquantitative Unterschiede im Nachweis der einzelnen Markerkeime blieben bei der Auswertung unberücksichtigt, da die Detektion eines Keimes oberhalb der therapierelevanten cutt-off Marke ausschlaggebend war. Der minimale Attachmentverlust an den Probenentnahmestellen CAL_{Bakt} wurde auf ≥ 5 mm (Mittelwert $7,5 \pm 1,9$ mm) festgelegt, denn der Nachweis von Anaerobiern ist eng mit dem Attachmentverlust assoziiert (*Petsios et al.* 1995, *Socransky et al.* 1998, *Jervoe-Storm et al.* 2000, *Eick und Pfister* 2002). Die Werte für PD, CAL und CAL_{Bakt} unterschieden sich bei AP und CP-Patienten nicht signifikant voneinander. Die Mittelwerte für den CAL lagen sowohl für CP als auch für AP über 6 mm und weisen darauf hin, dass in beiden Patientengruppen ein generalisierter schwerer Attachmentverlust vorlag.

Der Anteil der Raucher war bei aggressiver Parodontitis signifikant höher im Vergleich zur Gruppe mit chronischer Parodontitis. In der Gesamtparodontitisgruppe gab es hinsichtlich der Bakterienzusammensetzung zwischen Rauchern und Nichtrauchern keine signifikanten

Unterschiede. Dieser Befund wird auch durch Ergebnisse von *Preber et al.* (1992), *Stoltenberg et al.* (1993), *Renvert et al.* (1998) und *Boström et al.* (2001) gestützt, die ebenfalls keine Unterschiede im Nachweis bestimmter subgingivaler Bakterien in Abhängigkeit vom Nikotinkonsum feststellten. Dagegen fanden *Haffajee* und *Socransky* (2001) bei Rauchern eine erhöhte Prävalenz von Keimen des orangen und roten Komplexes. Dieser Unterschied zu Nichtrauchern wurde auf die stärkere Kolonisation dieser Bakterien in Taschen mit PD < 4 mm zurückgeführt.

Wie in Tab. 19 ersichtlich, war eine Infektion mit A.a. negativ mit dem Mittelwert für CAL assoziiert war, während P.g., P.i., T.f. und T.d. keine Assoziation zu PD, CAL oder zum Attachmentverlust an der Probenentnahmestelle zeigten. *Socransky et al.* (1998) fanden eine positive Assoziation von Bakterien des roten und orangen Komplexes sowohl zur Sondiertiefe als auch zur Sondierblutung. Diese Assoziation wurde für A.a. (grüner Komplex) nicht nachgewiesen.

Die in dieser Studie ermittelte signifikant positive Assoziation von P.g. zu T.f. und T.f. zu T.d. wird durch Ergebnisse von *Gmur et al.* (1989) bestätigt, die eine strenge Relation zwischen T.f. und P.g. in Taschen unterschiedlicher Tiefe fanden sowie *Socransky et al.* (1998), die P.g., T.f. und T.d. nach Clusteranalyse zum „roten Komplex“ zusammenfassten. Es wird vermutet, dass eine Infektion von T.f. einer Besiedlung mit P.g. vorausgeht (*Gmur et al.* 1998). Weiterhin wird die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Assoziation von P.g. zu P.i. insofern bestätigt, dass Bakterien des orangen Komplexes, zu denen auch P.i. zählt, nicht nur untereinander, sondern auch in Beziehung zu denen des roten Komplexes standen (*Socransky et al.* 1998).

A.a. wurde der vorliegenden Studie signifikant häufiger bei aggressiver Parodontitis nachgewiesen und war deshalb auch negativ mit dem Patientenalter assoziiert. Die Bedeutung von A.a. in der Ätiologie der aggressiven Parodontitis wurde im Abschnitt 1.1.3. beschrieben. Die Detektionsfrequenz von T.d. war dagegen bei CP höher und P.g. und T.f. waren positiv mit dem Alter korreliert. P.g. wird als Hauptbakterium der schweren Erwachsenenparodontitis angesehen (*Slots* 1986). T.f. wurde am häufigsten bei refraktärer Parodontitis (*Listgarten et al.* 1993) nachgewiesen und als Risikofaktor für die Progression des Attachmentverlustes beim Erwachsenen identifiziert (*Hamlet et al.* 2004). Unterschiede in der Infektion mit T.d. zwischen chronischer und aggressiver Parodontitis wurden bisher nicht beschrieben.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse in Tabelle 19 konnte geschlussfolgert werden, dass bei der Interpretation von HLA-Assoziationen zu parodontalen Markerkeimen das Patientenalter, der Attachmentverlust und Korrelationen zwischen den Bakterien zu berücksichtigen waren, während das Geschlecht und der Nikotinkonsum die Keimbesiedlung nur unwesentlich beeinflussten.

In den Ergebnissen wurde auffällig, dass bestimmte in den Voruntersuchungen ermittelte

HLA-Assoziationen zur Parodontitis gleichermaßen auch zu parodontalen Leitkeimen existierten. HLA-DRB1*13:DRB3*.DQB1*06 wurde im Vergleich zur parodontitisfreien Kontrollgruppe signifikant häufiger bei AP nachgewiesen (pf 35 % vs. pf 20 %, siehe Abb. 3a) und war innerhalb der Parodontitisgruppe mit Keimnachweis positiv mit A.a., aber negativ mit P.i. assoziiert. Somit scheint diese HLA-Kombination die Empfindlichkeit für eine Infektion mit A.a. und P.i. unterschiedlich zu beeinflussen. Die negative Assoziation von HLA-DRB1*04:DRB4*(DR53):DQB1*06 zu A.a. wird durch Ergebnisse von *Hart et al.* (1995) bestätigt, die bei HLA-DR53 positiven Probanden, unabhängig von der parodontalen Diagnose, eine erhöhten IgG₂-Titer gegen A.a. fanden, der möglicherweise eine Infektion mit A.a. eingrenzen kann. Ein Einfluss des HLA-Typs auf die Immunkonzentration von IgA, IgM und IgE (*Modica et al.* 1989) und die Stärke der Immunreaktivität gegen bestimmte bakterielle Antigene wurde bereits nachgewiesen (*Buckley et al.* 1973, *Greenberg et al.* 1975, *Gervais et al.* 1984). Dabei könnten Kreuzreaktivitäten zwischen mikrobiellen Erregern und HLA im Sinne einer Mimikry eine Rolle spielen, wie sie beispielsweise für HLA-B*27 und Klebsiellen beschrieben wurden (*Ebringer* 1983, *Ebringer et al.* 1985, *Ebringer and Ghuloom* 1986, *Avakian et al.* 1980, *Benjamin and Parham* 1990). Dabei wären Mechanismen der Kreuztoleranz oder Autoreaktivität denkbar.

Einige HLA-Marker (HLA-B*44:DRB1*13, HLA-A*33) waren positiv zur Parodontitis aber negativ zu einem der parodontalen Leitkeime assoziiert. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Infektion mit bestimmten Bakterien zwar begrenzt wird, aber eine hyperreaktive Immunantwort mit Zerstörung parodontalen Gewebes resultiert. Eine hyperreaktive Immunantwort wird auch als Ursache für die höhere Prävalenz schwerer chronischer Parodontitiden unter Patienten mit positivem IL-1 Polymorphismus angenommen (*Kornman et al.* 1997). Weiterhin waren bestimmte HLA-Merkmale negativ zur Parodontitis assoziiert (A*02, A*09), aber positiv zum Nachweis parodontaler Leitkeime. HLA-A*02 positive Patienten waren zu 100 % auch P.g. positiv, obwohl dieses HLA-Merkmal, wie schon erläutert, in Kombination mit HLA-A*03 einen möglichen Resistenzindikator für AP darstellt. HLA-A*02 kann somit eine subgingivale Kolonisation mit P.g. nicht verhindern, aber durch Vermittlung einer suffizienten Abwehr die Entstehung einer AP. HLA-A*09 positive Patienten waren zu 100 % mit P.g., T.f. und T.d. infiziert. Dabei hatte das Splitmerkmal HLA-A*24 eine dominante Bedeutung. Für HLA-A*24 sind u.a. T-Zellepitope für EBV bekannt. (*Burrows et al.* 1994, *Pepperl et al.* 1998). Auf die Bedeutung von EBV-Infektionen in der Ätiologie der Parodontitis wurde schon hingewiesen. Bei den HLA-B Merkmalen existieren etwa zu je 50 % zwei Supermerkmale Bw4 und Bw6. Diese beeinflussten die adjustierte OR für eine A.a.-Infektion unterschiedlich, denn bei HLA-Bw6 positiven Patienten war die OR für eine A.a.-Infektion um das achtfache erhöht, während HLA-Bw4 (homozygot) die OR signifikant verringerte. Interessanterweise unterdrückte eine Homozygotie für HLA-Bw4 bei HIV-1 infizierten Individuen die Entwicklung des „Acquired Immunodeficiency Syndrome“ (AIDS) durch Suppression einer HIV-1 Virämie

mit fehlender Reduktion von CD4 positiven T-Zellen. HLA-Bw4, aber nicht HLA-Bw6 Bindungsmotive, könnten als Ligand für den NK-Zell-Inhibitor-Rezeptor (KIR) fungieren und dadurch die Apoptose von CD4-Zellen verhindern (*Flores-Villanueva et al.* 2001). HLA-B*08:Cw*07:DRB1*03:DRB3*:DQB1*02 erhöhte das Risiko für eine A.a.-Infektion um das sechsfache. Die Assoziation von HLA-B*08:Cw*07:DRB1*03:DRB3*:DQB1*02 zum selektiven IgA-Mangel wurde bereits diskutiert (s.o.).

6. Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wiesen die positive bzw. negative Assoziation bestimmter HLA-Merkmale zur AP und CP nach. Die Höhe des Risikos (gemessen als OR), an einer AP bzw. CP zu erkranken, lag für positiv assoziierte Merkmale zwischen 2 (HLA-DRB1*13 zur AP) und 13 (HLA-Cw*08:B*14 zur CP). Damit war es vergleichbar mit dem Relativen Risiko (RR), das bei HLA-Assoziationen zu anderen Erkrankungen ermittelt wurde, z.B. HLA-A3 – Idiopathische Hämochromatose RR = 5-12, Morbus Behcet - HLA-B5 RR = 6, chronische Polyarthritits - HLA-DR4, DR1 RR = 2-4 (Übersichten bei *Waßmuth* 1995, *Baenkler* 1996) oder hereditärer IgA-Defizienz HLA-Cw*08:B*14:DRB1*0102:DQB1*0501, RR = 12 (*Machulla et al.* 2000). Schon ein RR > 1 deutet eine Assoziation zwischen Erkrankung und einem HLA-Allel an (*Baenkler* 1996). Somit könnte das Merkmal HLA-DRB1*13 oder Kombinationen mit HLA-DRB1*13 das Risiko für eine AP erhöhen, während die Merkmale HLA-A*30, -A*31 sowie -DRBblank* für Protektion stehen. Dagegen scheint insbesondere der ancestrale Haplotyp HLA-Cw*08:B*14 das Risiko für CP zu erhöhen, während HLA-A*03 mit verminderter Suszeptibilität einhergeht. Darüber hinaus existierten HLA-Marker (z.B. HLA-A*33), die generell für Parodontitis von Bedeutung waren. Unabhängig vom statistisch errechneten Risiko für Parodontitis unterschieden sich die HLA-Marker hinsichtlich ihrer diagnostischen Relevanz. So war HLA-DRB1*13 zwar gegenüber der gesunden Kontrollgruppe bei AP-Patienten signifikant häufiger (36 % vs. 21 %), aber 21 von 102 gesunden Kontrollprobanden waren ebenfalls HLA-DRB1*13 positiv, während bei 32 von 50 AP-Patienten HLA-DRB1*13 nicht nachgewiesen wurde. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass eine sichere Aussage darüber, ob ein Merkmalsträger erkrankt bzw. bei fehlendem Nachweis dieses Merkmals dauerhaft vor Krankheit geschützt bleibt, i. d. R. nicht möglich ist. Dagegen waren HLA-A*30 und HLA-A*31 bei AP nicht nachweisbar, bei CP entsprach die Phänotypfrequenz beider Marker der Normalverteilung (5,88 %) und in der Kontrollgruppe ohne Parodontitis war der Nachweis beider Marker deutlich erhöht (11,76 %). Somit ist die Wahrscheinlichkeit für Träger dieser HLA-Merkmale sehr gering (OR = 0,07), an einer aggressiven Parodontitis zu erkranken, wobei die Entwicklung einer chronischen Parodontitis nicht ausgeschlossen ist. Die CP hat in Deutschland unter Erwachsenen eine Prävalenz von ca. 70% - 80 %, wobei davon ca. 20 % - 40 % schwerere Formen darstellen (vgl. Abb. 1 A und

B). Die Phänotypfrequenz der zur CP positiv assoziierten HLA-Marker in der Normalbevölkerung (HLA-A*11 pf = 8,28 %, HLA-A*33 pf = 1,27 % und HLA-B*14:Cw*08 pf = 5,1 %) bleibt jedoch deutlich darunter, so dass diese HLA-Marker keinen determinierenden Einfluss auf die Erkrankung haben dürften.

In Anbetracht der fehlenden strengen Assoziation bestimmter HLA-Marker zur Parodontitis (keine Signifikanz nach Bonferroni-Korrektur für neu ermittelte HLA-Assoziationen) und der bekannten multifaktoriellen Genese der AP und CP ist davon auszugehen, dass die Gene im HLA-Komplex keinen Major-Effekt in der Pathogenese beider Erkrankungen ausüben. Es existieren jedoch deutliche Hinweise darauf, dass sie die subgingivale Kolonisation von parodontalen Markerbakterien bzw. die Immunantwort beeinflussen. Darauf deuten die in dieser Studie ermittelten Assoziationen bestimmter Leitkeime zu HLA-Merkmalen hin und die Identifizierung von T-Zellmotiven, die an HLA-DRB1*1501 und –DRB1*1301 binden könnten. Für den Nachweis einer HLA-abhängigen antibakteriellen Immunität wäre die Identifizierung weiterer immundominanter Peptide und Bindungstests zur hypervariablen Region von HLA-Molekülen notwendig. Aufgrund der Vielzahl möglicher Pathogene (Bakterien, Viren?) und ihr vorwiegend kommensales Vorkommen ist eine Vorselektion möglicher immundominanter Peptidmotive durch Nutzung von Datenbanken zur Epitopvoraussage (SYFPEITHY, RANKPEP) vor aufwendigen Bindungstests sinnvoll.

7. Zusammenfassung

Bisher gibt es keine sicheren diagnostischen Methoden, um das individuelle Parodontitisrisiko zu bestimmen oder den Verlauf einer Erkrankung abschätzen zu können. Dieses wäre notwendig, um bereits vor klinisch sichtbarem Attachmentverlust prophylaktische Maßnahmen ergreifen zu können oder für eine mehr individualisierte Therapie mit Vermeidung von Über- oder Unterbehandlung. Monogenetische Syndrome, die mit aggressiver Parodontitis bereits im Milchgebiss einhergehen, ein im Vergleich zur Bevölkerung überproportionales Vorkommen aggressiver Parodontitisformen in einer Familie sowie Zwillingsuntersuchungen an erwachsenen Patienten mit CP deuten auf die Existenz von polymorphen genetischen Suszeptibilitäts- bzw. Resistenzfaktoren für chronische und aggressive Parodontitisformen hin. Durch molekularbiologische Methoden eröffnen sich Möglichkeiten, potentielle genetisch-immunologische Faktoren zu identifizieren, die die individuelle Wirtsantwort auf parodontopathogene Mikroorganismen beeinflussen könnten. In diesem Zusammenhang ist das HLA-System von Bedeutung. HLA-Antigene beschränken die T-lymphozytäre Antigenerkennung, denn die Antigenpräsentation gelingt nur, wenn das Antigenfragment in Form eines Oligopeptids an ein HLA-Molekül einer antigenpräsentierenden Zelle gebunden ist (Sanderink und Bengel 1995). Bisherige Studien über HLA-Assoziationen zur Parodontitis zeigten teilweise inkonsistente Ergebnisse, bedingt durch Unterschiede in der Definition der Patientengruppen und vor allem Kontrollprobanden. Weiterhin wurden meistens serologische

Typisierungstechniken mit Beschränkung auf HLA Klasse I-Merkmale angewandt.

Das Ziel der vorliegenden Studie war deshalb, die Verteilung von HLA-A, -B, -Cw, -DRB1, -DRB3,4,5 und -DQB1 Merkmalen bei Patienten mit chronischer (N = 102) und generalisierter aggressiver Parodontitis (N = 50) mit serologischer (MLCT) und molekularbiologischer Technik (PCR-SSP) zu untersuchen und mit einer Gruppe von Probanden ohne Parodontitis (N = 102) unter Berücksichtigung der Normalverteilung der HLA-Merkmale (Blutspendergruppe N = 157) innerhalb der Population zu vergleichen. Durch den Vergleich der Patientengruppen mit den Kontrollprobanden sollte ein HLA-abhängiges Risiko für Entstehung oder Verhinderung einer Parodontitis berechnet und diskutiert werden. In einer weiteren Parodontitisgruppe (AP + CP, N = 68) wurde überprüft, ob bestimmte HLA-Merkmale mit dem molekularbiologischem Nachweis von fünf parodontalen Markerkeimen assoziiert waren.

Im Vergleich zu Probanden ohne Parodontitis waren bei AP die Merkmale HLA-A*29 (OR = 6,55) und HLA-DRB1*13 (OR = 2,17) signifikant vermehrt, während HLA-DRBblank* signifikant seltener vorkam (OR = 0,42) und HLA-A*31 (OR = 0,10) bzw. HLA-A*30 + *31 (OR = 0,07) nicht nachgewiesen wurden. Nur bei Patientinnen war HLA-A*28 positiv (OR = 5,39) und HLA-DQB1*05 negativ (OR = 0,28) mit AP assoziiert. Bei CP waren HLA-A*11 (OR = 2,76), HLA-A*33 (OR = 11) und HLA-Cw*08:B*14 (OR = 13,81) signifikant häufiger, während HLA-A*03 (OR = 0,51) signifikant seltener vorkam. Nur unter CP-Patientinnen war HLA-B*27 verringert (OR = 0,34) und HLA-DQB1*0303 (DQ9) nicht nachweisbar. Einige der angeführten Unterschiede in der Phänotypfrequenz von HLA-Merkmalen könnte auf die Assoziation von HLA-Kombinationen zur Parodontitis zurückzuführen sein. HLA-A*28 war in Kombination mit Cw*07:B*18 und HLA-DRB1*13 in Kombination mit HLA-DRB3*:DQB1*06 bei AP häufiger, während HLA-DQB1*0302 in Kombination mit HLA-DRB1*04:DRB4* seltener nachweisbar war. Weiterhin waren die Merkmale HLA-A*11, -Cw*08:B*14 und -DRB1*13 Bestandteil von drei zur CP positiv assoziierten HLA-Kombinationen. Die im Kopplungsungleichgewicht stehenden Merkmale HLA-DRB1*15, -DRB5* und -DQB1*06 kamen bei AP und CP als Homozygotien von der Tendenz häufiger vor, während eine Homozygotie von HLA-DRBblank* bei CP signifikant und bei AP von der Tendenz seltener war. Bei HLA-Bw6, HLA-B*08:Cw*07:DRB1*03:DRB3:DQB1*06 und HLA-DRB1*13:DRB3*:DQB1*06 positiven Patienten war die für Alter, Geschlecht, Rauchen und CAL_{Bakt} adjustierte OR für eine A.a.-Infektion signifikant erhöht, während eine Homozygotie des Supermerkmals HLA-Bw4 und die Kombination HLA-DRB1*04:DRB4*:DQB1*03 diese verringerten. HLA-B*5, HLA-DRB3*:DRB3* und HLA-Kombinationen mit HLA-DRB1*13 waren mit einem selteneren Nachweis von P.i. assoziiert. Bei HLA-A*02 und -A*09 positiven Probanden wurde immer P.g. nachgewiesen bzw. die Bakterien des roten Komplexes P.g., T.f., und T.d..

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine Beteiligung bestimmter einzelner

HLA-Merkmale, HLA-Homozygotien oder HLA-Kombinationen in der Pathogenese der AP und CP hin. Die Ergebnisse waren konsistent zu einigen kaukasischen und japanischen Studien. Darüber hinaus wurden bisher unbekannte Assoziationen von HLA-Merkmalen zur Parodontitis beschrieben, die jedoch nach Bonferroni-Korrektur nicht signifikant waren. Der Pathomechanismus der HLA-Parodontitisassoziation ist unbekannt. Die Relation von HLA-Merkmalen zur Detektionsfrequenz bestimmter parodontaler Leitkeime und die mögliche Bindung eines Peptidfragmentes von Ag53 P.g. an HLA-DRB1*1501 und –DRB1*1301 deuten auf eine HLA-abhängige antibakterielle Immunität hin. Dabei könnte das homozygote Vorkommen bestimmter auffälliger HLA-Marker mit einer verringerten Anzahl von HLA-Allelen und damit reduzierter Variabilität in der Peptidbindung einhergehen. Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass bestimmte HLA-Marker als Teil des genetischen Backgrounds die individuelle Disposition für eine AP oder CP beeinflussen dürften. Aufgrund der ungenügenden Strenge der Assoziation von HLA-Merkmalen zur Parodontitis ist eine HLA-Typisierung zur Bestimmung des individuellen Parodontitisrisikos nach heutigem Kenntnisstand noch nicht geeignet. Longitudinalstudien, Interventionsstudien sowie Studien zur Bindung von immundominanten Peptiden an HLA-Molekülen wären zur weiteren Aufklärung der Pathogenese parodontaler Erkrankungen und möglicherweise Entwicklung neuer Therapiestrategien erforderlich.

8. Literaturverzeichnis

1. Albandar JM, Brown LJ, Loe H. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *J Periodontol* 1997;68:973-981.
2. Albandar JM, Brunelle JA, Kingman A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol* 1999;70:13-29.
3. Alfonso C, Liljedahl M, Winqvist O, Surh CD, Peterson PA, Fung-Leung WP, Karlsson L. The role of H2-O and HLA-DO in major histocompatibility complex class II-restricted antigen processing and presentation. *Immunol Rev* 1999;172:255-266.
4. Allan DS, Lepin EJ, Braud VM, O'Callaghan CA, McMichael AJ. Tetrameric complexes of HLA-E, HLA-F, and HLA-G. *Immunol Methods* 2002;268:43-50.
5. Alley CS, Reinhardt RA, Maze CA, DuBois LM, Wahl TO, Duckworth WC, Dyer JK, Petro TM. HLA-D and T lymphocyte reactivity to specific periodontal pathogens in type 1 diabetic periodontitis. *J Periodontol* 1993;64:974-979.
6. Amer A, Singh G, Darke C, Dolby AE. Association between HLA antigens and periodontal disease. *Tissue Antigens* 1988;31:53-58.
7. Armitage GC. Development of a Classification system for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1-6.
8. Armitage GC, Wu Y, Wang HY, Sorell J, di Giovine FS, Duff GW. Low prevalence of a periodontitis-associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage. *J Periodontol* 2000;71:164-171.
9. Asikainen S, Chen C, Slots J. Actinobacillus actinomycetemcomitans genotypes in relation to serotypes and periodontal status. *Oral Microbiol Immunol* 1995;10:65-68.
10. Asikainen S, Lai CH, Alaluusua S, Slots J. Distribution of Actinobacillus actinomycetemcomitans serotypes in periodontal health and disease. *Oral Microbiol Immunol* 1991;6:115-118.
11. Avakian H, Welsh J, Ebringer A, Entwistle CC. Ankylosing spondylitis, HLA-B27 and Klebsiella. II. Cross-reactivity studies with human tissue typing sera. *Br J Exp Pathol* 1980;61:92-96.
12. Baarsma GS, Priem HA, Kijlstra A. Association of birdshot retinochoroidopathy and HLA-A29 antigen. *Curr Eye Res* 1990;9:63-68.
13. Baenkler, H-W (ed). *Medizinische Immunologie. Grundlagen - Diagnostik - Klinik - Therapie - Prophylaxe – Sonderbereiche.* ecomed-Verlag 4. Erg. Lfg. Landsberg/Lech 1996.
14. Balandin-Texier A, Gueguin M, Fauchet R, Yardin M, Cathelineau G. Antigène HLA. A9 et parodontites chroniques [The HLA-A9 antigen and chronic periodontitis]. *J de Parodontol* 1986;5:221-227.
15. Baurain JF, Colau D, van Baren N, Landry C, Martelange V, Vikkula M, Boon T, Coulie PG. High frequency of autologous anti-melanoma CTL directed against an antigen generated by a point mutation in a new helicase gene. *J Immunol* 2000;164:6057-6066.
16. Beaty TH, Boughman JA, Yang P, Astemborski JA, Suzuki JB. Genetic analysis of juvenile

- periodontitis in families ascertained through an affected proband. *Am J Hum Genet* 1987;40:443-452.
17. Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol* 1996;67:1123-1137.
 18. Beck S, Trowsdale J. Sequence organisation of the class II region of the human MHC. *Immunol Rev.* 1999;167:201-210.
 19. Beck S, Trowsdale J. The human major histocompatibility complex: lessons from the DNA sequence. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000;1:117-37.
 20. Benjamin R, Parham P. Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol Today.* 1990;11:137-142.
 21. Berglundh T, Liljenberg B, Tarkowski A, Lindhe J. The presence of local and circulating autoreactive B cells in patients with advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002;29:281-286.
 22. Betterle C und Volpato M: Adrenal and ovarian autoimmunity *European J of Endocrinology* 1998;138:16-25.
 23. Birnstein E, Treasure E, Williams S, Dever J. Alveolar bone loss in 5-year-old New Zealand children: its prevalence and relationship to caries prevalence, socio-economic status and ethnic origin. *J Clin Periodontol* 1994;21:447-450.
 24. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987;329:506-512 (a).
 25. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987;329:512-518 (b).
 26. Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Charron D, Dupont B, Erlich HA, Fauchet R, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI. Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. *Tissue Antigens* 1997;49:297-321.
 27. Bodmer WF, Bodmer JG. Evolution and function of the HLA system. *Brit Med Bul* 1978;34:309-316.
 28. Bodmer WF. Population genetics of the HL-A system: Retrospect. and prospect. *Histocompatibility Testing* 1972. Munsgaard, Kopenhagen 1973:611-617.
 29. Bonfil JJ, Dillier FL, Mercier P, Reviron D, Foti B, Sambuc R, Brodeur JM, Sedarat C. A "case control" study on the role of HLA DR4 in severe periodontitis and rapidly progressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 1999;26:77-84.
 30. Bostrom L, Bergstrom J, Dahlen G, Linder LE. Smoking and subgingival microflora in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2001;28:212-219.
 31. Boughman JA, Astemborski JA, Suzuki JB. Phenotypic assessment of early onset periodontitis in sibships. *J Clin Periodontol* 1992;19:233-239.
 32. Boughman JA, Halloran SL, Roulston D, Schwartz S, Suzuki JB, Weitkamp LR, Wenk RE, Wooten R, Cohen MM. An autosomal-dominant form of juvenile periodontitis: its localization to chromosome 4 and linkage to dentinogenesis imperfecta and Gc. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1986;6:341-350.
 33. Bouvier M, Wiley DC. Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class

- I molecules. *Science* 1994;265:398-402.
34. Böyum A. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21:77-89.
 35. Brachet V, Raposo G, Amigorena S, Mellman I. β 2-microglobulin chain controls the transport of major histocompatibility complex class II molecules to and from lysosomes. *J Cell Biol* 1997;137:51-65.
 36. Brewerton DA, Caffrey M, Hart FD, James DCO, Nicholls A, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HLA-A 27. *Lancet* 1973;1:904-907.
 37. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993;364:33-39.
 38. Bucin D, Low B. Human alloantiserum against PHA-activated cells. Cytotoxicity associated with the HLA-A3 antigen. *Tissue Antigens* 1985;25:50-54.
 39. Buckley CE, Dorsey FC, Corley RB, Ralph WB, Woodbury MA, Amos DB. HL-A linked immune-response genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973;70:2157-2161.
 40. Bundesministerium für Gesundheit. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). *Bundesgesundheitsblatt* 2000;43:555-589.
 41. Burrows SR, Gardner J, Khanna R, Steward T, Moss DJ, Rodda S, Suhrbier A. Five new cytotoxic T cell epitopes identified within Epstein-Barr virus nuclear antigen 3. *J Gen Virol* 1994;75:2489-2493.
 42. Campbell RD, Trowsdale J. Map of the human MHC. *Immunol Today* 1993;14:349-352.
 43. Carcassi C, Trucco G, Trucco M, Contu L. A new HLA-DR2 extended haplotype is involved in insulin-dependent diabetes mellitus susceptibility. *Hum Immunol* 1991;31:159-164.
 44. Caton J. Periodontal diagnosis and diagnostic aids. In: Nevins M, Becker W, Kornman K (ed.): *Proceedings of the world workshop in clinical periodontics*, American academy of Periodontology 1989.
 45. Chapman HA. Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Curr Opin Immunol* 1998;10:93-102.
 46. Chaux P, Luiten R, Demotte N, Vantomme V, Stroobant V, Traversari C, Russo V, Schultz E, Cornelis GR, Boon T, van der Bruggen P. Identification of five MAGE-A1 epitopes recognized by cytolytic T lymphocytes obtained by in vitro stimulation with dendritic cells transduced with MAGE-A1. *J Immunol* 1999;163:2928-2936.
 47. Cobain TJ, French MA, Christiansen FT, Dawkins RL. Association of IgA deficiency with HLA A28 and B14. *Tissue Antigens* 1983;22:151-154.
 48. Cogen RB, Roseman JM, Al-Joburi W, Louv WC, Acton RT, Barger BO, Go RC, Rasmussen RA. Host factors in juvenile periodontitis. *J Dent Res* 1986;65:394-399.
 49. Cogen RB, Wright JT, Tate AL. Destructive periodontal disease in healthy children. *J Periodontol* 1992; 63:761-765.
 50. Contreras A, Nowzari H, Slots J. Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15:15-18.

51. Cortes J, Fayad L, Kantarjian H, O'Brien S, Lee MS, Talpaz M. Association of HLA phenotype and response to interferon-alpha in patients with chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 1998;12:455-462.
52. Craandijk J, van Krugten MV, Verweij CL, van der Velden U, Loos BG. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002;29:28-34.
53. Cuccia-Belvedere M, Monafò V, Martinetti M, Plebani A, De Paoli F, Burgio GR. Recurrent extended HLA haplotypes in children with selective IgA deficiency. *Tissue Antigens* 1989;34:127-132.
54. Cullinan MP, Sachs J, Wolf E, Seymour GJ. The distribution of HLA-A and -B antigens in patients and their families with periodontitis. *J Periodont Res* 1980;15:177-184.
55. Cullinan MP, Westerman B, Hamlet SM, Palmer JE, Faddy MJ, Lang NP, Seymour GJ. A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population. *J Clin Periodontol* 2001;28:1137-1144.
56. Dahlen G, Bjorkander J, Gahnberg L, Slots J, Hanson LA. Periodontal disease and dental caries in relation to primary IgG subclass and other humoral immunodeficiencies. *J Clin Periodontol* 1993;20:7-13.
57. Dausset J. Leuco-agglutinins IV. Leuco-agglutinins and blood transfusion. *Vox Sang* 1954;4:190-198.
58. Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Arden B, Chien Y. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998;16:523-544.
59. Delaney JE, Kornman KS. Microbiology of subgingival plaque from children with localized prepubertal periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1987;2:71-76.
60. Deschner J. Interleukin-1-Polymorphismen – ihre Bedeutung und Testung in der Parodontologie. *Quintessenz* 2001;52:53-59.
61. Deutsche Gesellschaft für Parodontologie (ed). *Klassifikation der Parodontalerkrankungen*. Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin 2002;21-27.
62. Dyer JK, Peck MA, Reinhardt RA, Duckworth WC, Booth SJ, Seymour GJ, Patil KD. HLA-D types and serum IgG responses to *Capnocytophaga* in diabetes and periodontitis. *J Dent Res* 1997;76:1825-1832.
63. Dyer P, Warrens A. Design and interpretation of studies of the major histocompatibility complex in disease. In: Lechler R. (ed): *HLA and disease*. Academic Press 1994;100-120.
64. Ebersole JL, Taubman MA, Smith DJ. Gingival crevicular fluid antibody to oral microorganisms. II. Distribution and specificity of local antibody responses. *J Periodontal Res* 1985;20:349-356.
65. Ebringer A. Ankylosing spondylarthritis, HLA B27 and the theory of crossed tolerance. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1983;50:763-769.
66. Ebringer A, Ghuloom M. Ankylosing spondylarthritis, HLA-B27 and klebsiella: cross reactivity and antibody studies. *Ann Rheum Dis* 1986;45:703-704.
67. Ebringer A, Baines M, Ptaszynska T. Spondylarthritis, uveitis, HLA-B27 and Klebsiella. *Immunol Rev* 1985;86:101-116.
68. Eick S, Pfister W. Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for

- detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2002;29:638-644.
69. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1991;62:123-131.
 70. Engebretson SP, Lamster IB, Herrera-Abreu M, Celenti RS, Timms JM, Chaudhary AG, di Giovine FS, Kornman KS. The influence of interleukin gene polymorphism on expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in periodontal tissue and gingival crevicular fluid. *J Periodontol* 1999 ;70:567-573.
 71. Firatli E. The relationship between clinical periodontal status and insulin-dependent diabetes mellitus. Results after 5 years. *J Periodontol* 1997;68:136-140.
 72. Firatli E, Kantarci A, Cebeci I, Tanyeri H, Sonmez G, Carin M, Tuncer O. Association between HLA antigens and early onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 1996;23:563-566.
 73. Flemmig TF, Milian E, Karch H, Klaiber B. Differential clinical treatment outcome after systemic metronidazole and amoxicillin in patients harboring *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and/or *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol* 1998;25:380-387.
 74. Flores-Villanueva PO, Yunis EJ, Delgado JC, Vittinghoff E, Buchbinder S, Leung JY, Ugliero AM, Clavijo OP, Rosenberg ES, Kalams SA, Braun JD, Boswell SL, Walker BD, Goldfeld AE. Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:5140-5145.
 75. Fremont DH, Matsumura M, Stura EA, Peterson PA, Wilson IA. Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb. *Science* 1992;257:919-927.
 76. Fremont, DH, Hendrickson, WA, Marrack, P, Kappler, J. Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science* 1996;272:1001-1004.
 77. Galbraith GM, Hendley TM, Sanders JJ, Palesch Y, Pandey JP. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1999;26:705-709.
 78. Gautsch A. Untersuchung der HLA-Merkmale A, B, Cw, DR und DQ bei einer Gruppe deutscher Patienten mit Erwachsenenparodontitis. Dissertation Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 2002.
 79. Genco RJ, Löe H. Role of systemic conditions and disorders in periodontal disease. *Periodontol* 2000 1993;2:98-116.
 80. Germain RN. Immunology. The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature* 1986;322:687-689.
 81. Gervais F, Stevenson M, Skamene E. Genetic control of resistance to *Listeria monocytogenes*: regulation of leukocyte inflammatory responses by the Hc locus. *J Immunol* 1984;132:2078-2083.
 82. Gjertson DW, Geer L, Lee SH, Tsai, E, Locke, A, Lei, CP, Yeh, C. Population studies. In: Gjertson DW, Terasaki PI (ed). *HLA 1998*. Chapter 6: Population studies Lenexa/USA: ASHI, 1998;103-326.
 83. Gmur R, Guggenheim B. Interdental supragingival plaque--a natural habitat of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, and *Prevotella nigrescens*. *J*

- Dent Res 1994;73:1421-1428.
84. Goldberg AL, Rock KL. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 1992;357:375-379.
 85. Gonzales JR, Michel J, Diete A, Herrmann JM, Bodeker RH, Meyle J. Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 loci in aggressive and chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002;29:816-822.
 86. Gorer PA. The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. *Brit J Exp Path* 1936;17:42-50.
 87. Goteiner D, Goldman MJ. Human lymphocyte antigen haplotype and resistance to periodontitis. *J Periodontol* 1984;55:155-158.
 88. Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R, Zambon JJ, Hausmann E. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol* 1995;66:23-29.
 89. Greenberg LJ, Gray ED, Yunis EJ. Association of HL-A 5 and immune responsiveness in vitro to streptococcal antigens. *J Exp Med* 1975;141:935-943.
 90. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol* 2001;28:377-388.
 91. Hägewald S, Bernimoulin JP, Kottgen E, Kage A. Salivary IgA subclasses and bacteria-reactive IgA in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2002;37:333-339.
 92. Haldane JBS. The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies. *Ann Hum Genet* 1956;20:309-311.
 93. Hamlet S, Ellwood R, Cullinan M, Worthington H, Palmer J, Bird P, Narayanan D, Davies R, Seymour G. Persistent colonization with *Tannerella forsythensis* and loss of attachment in adolescents. *J Dent Res* 2004;83:232-235.
 94. Hart TC. Genetic risk factors for early onset periodontitis. *J Periodontol* 1996;67:355-366.
 95. Hart TC, Marazita ML, McCanna KM, Schenkein HA, Diehl SR. Reevaluation of the chromosome 4q candidate region for early onset periodontitis. *Hum Genet* 1993;91:416-422.
 96. Hart TC, Marazita ML, Schenkein HA, Diehl SR. Re-interpretation of the evidence for X-linked dominant inheritance of juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1992;63:169-173.
 97. Hart TC, Tolme C, Schenkein HA, Diehl S. Associations between HLA class II antigens, antibody response and periodontal status. *J Dent Res* 1995;74(Spec. Issue):157 (Abstr. 167).
 98. Hart TC. Genetic considerations of risk in human periodontal disease. *Curr Opin Periodontol* 1994;3:11.
 99. Heard R. HLA and autoimmune disease (chapter 7). In: Lechler R (ed) *HLA and disease*: Academic Press Limited London 1994;123-151.
 100. Hebart H, Dajinik S, Stevanovic S, Grigoleit U, Dobler A, Baur M, Rauser G, Sinzger C, Jahn G, Loeffler J, Kanz L, Rammensee HG, Einsele H. Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gamma-enzyme-linked immunospot

- assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002;99:3830-3837.
101. Helmke K. Rheumatoide Arthritis und verwandte Krankheitsbilder: In Baenkler HW (ed): Medizinische Immunologie, Bd. 3 Immunkrankheiten, ecomed-Verlag 4. Erg. Lfg. Landsberg/Lech 1996.
 102. Hirata AA, Terasaki PI. Cross-reactions between streptococcal M proteins and human transplantation antigens. *Science* 1970;168:1095-1096.
 103. Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Failure to detect an association with IL1 genotypes in European Caucasians with generalised early onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001;28:430-436.
 104. Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. No association with HLA-DQB1 in European Caucasians with early-onset periodontitis. *Tissue Antigens* 1999;54:205-207.
 105. Hodge PJ, Teague PW, Wright AF, Kinane DF. Clinical and genetic analysis of a large North European Caucasian family affected by early-onset periodontitis. *J Dent Res* 2000;79:857-863.
 106. Hoffmann T. Parodontalerkrankungen In: Micheelis W und Schiffner U: Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV) Deutscher Zahnärzterverlag DÄV Köln 2006.
 107. Holmstrup P, Westergaard J. HIV infection and periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1998;18:37-46.
 108. Hughes AL, Hughes MK. Natural selection on the peptide-binding regions of major histocompatibility complex molecules. *Immunogenetics* 1995;42:233-243.
 109. Ismail AI, Burt BA, Eklund SA. Epidemiologic patterns of smoking and periodontal disease in the United States. *J Am Dent Assoc* 1983;106:617-621.
 110. Izumi Y, Nitta H, Ishikawa I, Baehni P. Association between HLA system and periodontal diseases. *J Parodontol* 1990;9:145 –152.
 111. Jensen PE, Weber DA, Thayer WP, Chen X, Dao CT. HLA-DM and the MHC class II antigen presentation pathway. *Immunol Res* 1999;20:195-205.
 112. Jervoe-Storm P-M, Kruppenbacher JP, Nolden R. Anwendung eines neuen mikrobiologischen Tests in der Parodontitis-Therapie. *Dtsch Zahnärztl Z* 2000;55:407-410.
 113. Kaslick RS, West TL, Chasens AI. Association between ABO blood groups, HL-A antigens and periodontal diseases in young adults: a follow-up study. *J Periodontol* 1980;51:339-342.
 114. Katz J, Goultschin J, Benoliel R & Brautbar C. Human leukocyte antigen (HLA) DR4. Positive association with rapidly progressing periodontitis. *J Periodontol* 1987;58:607-610.
 115. Kimura S, Yonemura T, Hiraga T. & Okada T. Flow Cytometric Evaluation of Phagocytosis by Peripheral Blood Polymorphnuclear Leucocytes in Human Periodontal Diseases. *Arch Oral Biol* 1992;37:495-501.
 116. Kinane DF, Hodge P, Eskdale J, Ellis R, Gallagher G. Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 and tumour necrosis factor loci in early-onset periodontitis. *J Periodontal Res* 1999;34:379-386.
 117. Kinane DF, Johnston FA, Evans CW. Depressed helper-to-suppressor T-cell ratios in early-onset forms of periodontal disease. *J Periodontal Res* 1989;24:161-164.

118. Kleber BM. Nomenklatur und Klassifikation. In: Haunfeder D, Hupfauf L, Ketterl W, Schmuth G. (ed). Praxis der Zahnheilkunde, Band 4, Parodontologie. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore 1996;13-14.
119. Kleijmeer MJ, Morkowski S, Griffith JM, Rudensky AY, Geuze HJ. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J Cell Biol* 1997;139:639-649.
120. Klouda PT, Porter SR, Scully C, Corbin SA, Bradley BA, Smith R, Davies RM. Association between HLA-A9 and rapidly progressive periodontitis. *Tissue Antigens* 1986;28:146-149.
121. Kobayashi T, Westerdaal NA, Miyazaki A, van der Pol WL, Suzuki T, Yoshie H, van de Winkel JG, Hara K. Relevance of immunoglobulin G Fc receptor polymorphism to recurrence of adult periodontitis in Japanese patients. *Infect Immun* 1997;65:3556-3560.
122. Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TG Jr, Higginbottom FL, Duff GW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997;24:72-77.
123. Kropshofer H, Arndt SO, Moldenhauer G, Hammerling GJ, Vogt AB. HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH. *Immunity* 1997;6:293-302.
124. Lange DE, Plagmann HC, Eenboom A, Promesberger A. Klinische Bewertungverfahren zur Objektivierung der Mundhygiene. *Dtsch Zahnärztl Z* 1977;32:44-47.
125. Lankat-Buttgereit B, Tampe R. The transporter associated with antigen processing TAP: structure and function. *FEBS Lett* 1999;464:108-112.
126. Lechler R. The roles of class I and II molecules of the major histocompatibility complex in T-cell immunity. In: Lechler R (ed). *HLA and disease*. Academic Press 1994;49-60.
127. Lindhe J. Epidemiologie und klinische Pathologie der Parodontalerkrankungen. Deutsche Gesellschaft für Parodontologie, Wissenschaftliche Jahrestagung, Stuttgart 1994.
128. Listgarten MA, Lai CH, Young V. Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. *J Periodontol* 1993;64:155-161.
129. Loe H, Brown LJ. Early onset periodontitis in the United States of America. *J Periodontol* 1991;62:608-616.
130. Loesche WJ, Syed SA, Schmidt E, Morrison EC. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. *J Periodontol* 1985;56:447-456.
131. Long JC, Nance WE, Waring P, Burmeister JA, Ranney RR. Early onset periodontitis: a comparison and evaluation of two proposed modes of inheritance. *Genet Epidemiol* 1987;4:13-24.
132. Lu H, Califano JV, Schenkein HA, Tew JG. Immunoglobulin class and subclass distribution of antibodies reactive with the immunodominant antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b. *Infect Immun* 1993;61:2400-2407.
133. Machulla HK, Schonermarck U, Schaaf A, Muller LP, Kloss C, Kruger J, Kunze G, Schonermarck G, Langner J. HLA-A, B, Cw and DRB1, DRB3/4/5, DQB1, DPB1 frequencies in German

- immunoglobulin A-deficient individuals. *Scand J Immunol* 2000;52:207-211.
134. Machulla HKG, Stein J, Gautsch A, Langner J, Schaller HG, Reichert S. HLA-A, B, Cw, DRB1, DRB3/4/5, DQB1 in German patients suffering from rapidly progressive periodontitis (RPP) and adult periodontitis (AP). *J Clin Periodontol* 2002;29:573-579.
135. Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* 1992;70:1035-1048.
136. Marazita ML, Burmeister JA, Gunsolley JC, Koertge TE, Lake K, Schenkein HA. Evidence for autosomal dominant inheritance and race-specific heterogeneity in early-onset periodontitis. *J Periodontol* 1994;65:623-630.
137. Marazita ML, Lu H, Cooper ME, Quinn SM, Zhang J, Burmeister JA, Califano JV, Pandey JP, Schenkein HA, Tew JG. Genetic segregation analyses of serum IgG2 levels. *Am J Hum Genet* 1996;58:1042-1049.
138. Marggraf E, Von Keyserlingk-Eberius HJ, Komischke B, Wöllert N. Die Assoziation von Histokompatibilitätsantigenen (HLA-Antigene) mit profunden Parodontopathien. *Dtsch Zahnärztl Z* 1983;38:585-589.
139. Margiotta V, Pizzo I, Pizzo G, Barbaro A. Cyclosporin- and nifedipine-induced gingival overgrowth in renal transplant patients: correlations with periodontal and pharmacological parameters, and HLA-antigens. *J Oral Pathol Med* 1996;25:128-134.
140. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Geraghty DE, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI. Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. *Tissue Antigens* 2002;60:407-464.
141. Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 1990;25:156-163.
142. Massa M, Mazzoli F, Pignatti P, De Benedetti F, Passalia M, Viola S, Samodal R, La Cava A, Giannoni F, Ollier W, Martini A, Albani S. Proinflammatory responses to self HLA epitopes are triggered by molecular mimicry to Epstein-Barr virus proteins in oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:2721-2729.
143. Matsumura M, Fremont DH, Peterson PA, Wilson IA. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 1992;257:927-934.
144. Mattiuz PL, Ihde D, Piazza A, Cepellini R, Bodmer WF. New approaches to the population genetic and segregation analysis of the HL-A system. In: Terasaki PI (ed). *Histocompatibility Testing* 1970. Munksgaard, Copenhagen 1970;193-205.
145. Mayer G und Kotterba S. Narkolepsie: Diagnose und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt* 2001;98:249-254.
146. Mayr WR. HLA-Genkomplex – Nachweismethoden und klinische Bedeutung. *Infusionsther Transfusionsmed* 1994;21:184-191.

147. McGuire MK, Nunn ME. Prognosis versus actual outcome. IV. The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival. *J Periodontol* 1999;70:49-56.
148. Meisel P, Siegemund A, Dombrowa S, Sawaf H, Fanghaenel J, Kocher T. Smoking and polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster (IL-1alpha, IL-1beta, and IL-1RN) in patients with periodontal disease. *J Periodontol* 2002;73:27-32.
149. Melvin WL, Sandifer JB, Gray JL. The prevalence and sex ratio of juvenile periodontitis in a young racially mixed population. *J Periodontol* 1991;62:330-334.
150. Mengel R, Bacher M, Flores-De-Jacoby L. Interactions between stress, interleukin-1beta, interleukin-6 and cortisol in periodontally diseased patients. *J Clin Periodontol* 2002;29:1012-1022.
151. Mercado F, Marshall RI, Klestov AC, Bartold PM. Is there a relationship between rheumatoid arthritis and periodontal disease? *J Clin Periodontol* 2000;27:267-272.
152. Mercado FB, Marshall RI, Klestov AC, Bartold PM. Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Periodontol* 2001;72:779-787.
153. 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;71:1699-707.
154. Michel J, Gonzales JR, Wunderlich D, Dietsch A, Herrmann JM, Meyle J. Interleukin-4 polymorphisms in early onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001;28:483-488.
155. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988;16:1215-1218.
156. Minden K, Niewerth M, Listing J, Schoenemann C, Nagy M, Zink A. HLA-allele frequencies in juvenile idiopathic arthritis in relation to outcome. *Arthritis Rheum* 2001;44:339.
157. Mishkin DJ, Grant NC, Bergeron RA, Young WL. Prepubertal periodontitis: a recently defined clinical entity. *Pediatr Dent* 1986;8:235-238.
158. Modica MA, Freddi S, Caruso C. Blood IgA, IgM and IgE levels are influenced by sex and HLA phenotype. *Exp Clin Immunogenet* 1989;6:251-257.
159. Monaco JJ. A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing. *Immunol Today* 1992;13:173-179.
160. Mooney J, Adonogianaki E, Riggio MP, Takahashi K, Haerian A, Kinane DF. Initial serum antibody titer to *Porphyromonas gingivalis* influences development of antibody avidity and success of therapy for chronic periodontitis. *Infect Immun* 1995;63:3411-3416.
161. Moses JH, Tschichti P, Donaldson P, Smith PB, Johnson NW, Bodmer JG. HLA and susceptibility to juvenile periodontitis in Afro-Caribbeans. *Tissue Antigens* 1994;43:316-319.
162. Mühlemann HR, Son S. Gingival sulcus bleeding – a leading symptom in initial gingivitis. *Helv Odontol Acta* 1971;15:107-113.
163. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol* 1997;255:335-350.

164. Nakagawa M, Kurihara H, Nishimura F, Isoshima O, Arai H, Sawada K, Nagai A, Murayama Y. Immunological, genetic, and microbiological study of family members manifesting early-onset periodontitis. *J Periodontol* 1996;67:254-263.
165. Nakagawa TY, Rudensky AY. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol Rev* 1999;172:121-129.
166. Newman MG, Socransky SS. Predominant cultivable microbiota in periodontosis. *J Periodontol Res* 1977;12:120-128.
167. Niedermann G, Geier E, Lucchiari-Hartz M, Hitziger N, Ramsperger A, Eichmann K. The specificity of proteasomes: impact on MHC class I processing and presentation of antigens. *Immunol Rev* 1999;172:29-48.
168. Nitta H, Kato H, Umeda M, Kuwata S, Ishikawa I. Papillon-Lefevre syndrome: analysis of HLA antigens. *Oral Dis* 2000;6:278-281.
169. Nunes IP, Johannessen AC, Matre R, Kristoffersen T. Epithelial expression of HLA class II antigens and Fc gamma receptors in patients with adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1994;21:526-532.
170. Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol* 1993;64:432-444.
171. Ohyama H, Matsushita S, Kato N, Nishimura F, Oyaizu K, Koikeguchi S, Kurihara H, Takashiba S, Nishimura Y, Murayama Y. T cell responses to 53-kDa outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* in humans with early-onset periodontitis. *Hum Immunol* 1998;59:635-643.
172. Ohyama H, Takashiba S, Oyaizu K, Nagai A, Naruse T, Inoko H, Kurihara H, Murayama Y. HLA Class II genotypes associated with early-onset periodontitis: DQB1 molecule primarily confers susceptibility to the disease. *J Periodontol* 1996;67:888-894.
173. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992;39:225-235.
174. Osborne JM, Chacko GW, Brandt JT, Anderson CL. Ethnic variation in frequency of an allelic polymorphism of human Fc gamma RIIA determined with allele specific oligonucleotide probes. *J Immunol Methods* 1994;173:207-217.
175. Page RC, Altman LC, Ebersole JL, Vandesteen GE, Dahlberg WH, Williams BL, Osterberg SK. Rapidly progressive periodontitis. A distinct clinical condition. *J Periodontol* 1983;54:197-209.
176. Parkhill JM, Hennig BJ, Chapple IL, Heasman PA, Taylor JJ. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000;27:682-689.
177. Pelosi E, Testa U, Louache F, Thomopoulos P, Salvo G, Samoggia P, Peschle C. Expression of transferrin receptors in phytohemagglutinin-stimulated human T-lymphocytes. Evidence for a three-step model. *J Biol Chem* 1986;261:3036-3042.
178. Pelosi-Testa E, Samoggia P, Giannella G, Montesoro E, Caravita T, Salvo G, Camagna A, Isacchi G, Testa U, Peschle C. Mechanisms underlying T-lymphocyte activation: mitogen initiates and IL-2 amplifies the expression of transferrin receptors via intracellular iron level. *Immunology* 1988;64:273-

- 279.
179. Pepperl S, Benninger-Doring G, Modrow S, Wolf H, Jilg W. Immediate-early transactivator Rta of Epstein-Barr virus (EBV) shows multiple epitopes recognized by EBV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 1998;72:8644-8649.
180. Petrov RV. Regulation of immune system functions. *Arkh Patol* 1983;45:3-11.
181. Petsios A, Nakou M, Manti F. Microflora in adult periodontitis. *J Periodontol Res* 1995;30:325-331.
182. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 1992;22:396-402.
183. Preber H, Bergstrom J, Linder LE. Occurrence of periopathogens in smoker and non-smoker patients. *J Clin Periodontol* 1992;19:667-671.
184. Priem HA, Kijlstra A, Noens L, Baarsma GS, De Laey JJ, Oosterhuis JA. HLA typing in birdshot chorioretinopathy. *Am J Ophthalmol* 1988;105:182-185.
185. Qian W, Zhang J, Zhang Y. The relationship between tumor necrosis factor A-308 gene polymorphism and susceptibility of severe periodontitis in adults. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2002;37:126-128.
186. Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NPN, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 1999;50:213-219.
187. Rammensee HG. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* 1995;7:85-96.
188. Reche PA, Glutting JP, Reinherz EL. Prediction of MHC class I binding peptides using profile motifs. *Hum Immunol* 2002;63:701-709.
189. Reichert S, Fuchs C, John V, Schaller H-G. Parodontologische und immunologische Befunde bei Patienten mit juveniler idiopathischer Arthritis (JiA). *Dtsch Zahnärztl Z* 2002;57:428-432.
190. Reichert S, Machulla HKG, Fuchs C, John J, Schaller HG, Stein J. Is there a relationship between juvenile idiopathic arthritis and periodontitis? *J Clin Periodontol* 2006;33:317-323.
191. Reichert S, Machulla HKG, Klapproth J, Zimmermann U, Reichert Y, Gläser CH, Schaller HG, Stein J, Schulz S. The interleukin-10 promoter haplotype ATA is a putative risk factor for aggressive periodontitis. *J Period Res* 2008;43:40-47.
192. Reichert S, Stein J, Langner J, Schaller H-G, Machulla HKG. Gender differences in HLA phenotype frequencies found in German patients with generalized aggressive periodontitis and chronic periodontitis. *J Oral Microbiol Immunol* 2003;17:360-368.
193. Reichert S, Stein J, Schaller H-G, Machulla HKG. HLA associations to periodontopathic bacteria. *Int Poster J Dent Oral Med* 2005;7:No 4, Poster 293.
194. Reinholdt J, Bay I, Svejgaard A. Association between HLA-antigens and periodontal disease. *J Dent Res* 1977;56:1261-1263.
195. Renvert S, Dahlen G, Wikstrom M. The clinical and microbiological effects of non-surgical periodontal therapy in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol* 1998;25:153-157.

196. Robertson M. Antigen processing. Proteasomes in the pathway [news; comment]. *Nature* 1991;353:300-301.
197. Robertson PB, Mackler BF, Wright TE, Levy BM. Periodontal status of patients with abnormalities of the immune system. II. Observations over a 2-year period. *J Periodontol* 1980;51:70-73.
198. Robinson J, Marsh SG. The IMGT/HLA sequence database. *Rev Immunogenet.* 2000;2:518-531.
199. Robinson PG. The significance and management of periodontal lesions in HIV infection. *Oral Dis* 2002;8:91-97.
200. Rudensky A, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway CA Jr. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 1991;17:353:622-627.
201. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel SJ, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491.
202. Salonen LW, Frithiof L, Wouters FR, Hellden LB. Marginal alveolar bone height in an adult Swedish population. A radiographic cross-sectional epidemiologic study. *J Clin Periodontol* 1991;18:223-232.
203. Sandeink R, Bengel W. Mikrobiell bedingte Destruktionen im marginalen Parodont - eine Übersicht. *Parodontol* 1995;2:97-120.
204. Saxen L, Nevanlinna HR. Autosomal recessive inheritance of juvenile periodontitis: test of a hypothesis. *Clin Genet* 1984;25:332-335.
205. Saxen L, Koskimies S. Juvenile periodontitis – no linkage with HLA-antigens. *J Periodont Res* 1984;19:441-444.
206. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Camargo LE, Line SR. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004;31:443-448.
207. Schenkein HA. Genetics of early-onset periodontal diseases. In: Genco R, Hamada S, Lehner T, McGhee J, Mergenhagen S (ed). *Molecular Pathogenesis of Periodontal Disease*. Washington DC: American Society for Microbiology Press 1994;373-383.
208. Schönermarck U. IgA-Mangel und HLA-Assoziationen. Dissertation Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 1999.
209. Schulz S, Machulla HKG, Altermann W, Klapproth J, Zimmermann U, Gläser CH, Stein J, Schaller HG, Reichert S. Genetic markers of TNF α in relation to aggressive and chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2008;35:493-500.
210. Shapira L, Stabholz A, Rieckmann P, Kruse N. Genetic polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF)-alpha promoter region in families with localized early-onset periodontitis. *J Periodontal Res* 2001;36:183-186.
211. Shapira L, van Dyke TE, Hart TC. A localized absence of interleukin-4 triggers periodontal disease activity: a novel hypothesis. *Med Hypotheses* 1992;39:319-322.
212. Shapira L, Eizenberg S, Sela MN, Soskolne A, Brautbar H. HLA A9 and B15 are associated with the generalized form, but not the localized form, of early-onset periodontal diseases. *J Periodontol*

- 1994;65:219-223.
213. Sigusch B. Die früh beginnende und rasch fortschreitende Parodontitis. *Parodontologie* 1998;1:21-31.
214. Sigusch B, Klinger G, Glockmann E, Simon HU. Early-onset and adult periodontitis associated with abnormal cytokine production by activated T lymphocytes. *J Periodontol* 1998;69:1098-1104.
215. Sjodin B, Matsson L. Marginal bone level in the normal primary dentition. *J Clin Periodontol* 1992;19:672-678.
216. Sjodin B, Matsson L. Marginal bone loss in the primary dentition. A survey of 7-9-year-old children in Sweden. *J Clin Periodontol* 1994;21:313-319.
217. Slots J, Reynolds HS, Genco RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infect Immun* 1980;29:1013-1020.
218. Slots J, Rosling BG. Suppression of the periodontopathic microflora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. *J Clin Periodontol* 1983;10:465-486.
219. Slots J. Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. *J Clin Periodontol* 1986;13:912-917.
220. Slots J. Subgingival microflora and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1979;6:351-382.
221. Slots J. Update on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease. *J Int Acad Periodontol* 1999;1:121-126.
222. So A. Genetics, polymorphism and regulation of expression of HLA region genes. In: Lechler R. (ed). *HLA and disease* Academic Press 1994;1-29.
223. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25:134-144.
224. Socransky SS, Haffajee AD. Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. *Compend Suppl* 1994;18:684-685, 688-693; quiz 714-717.
225. Sofaer JA. Genetic approaches in the study of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1990;17:401-408.
226. Stein J, Reichert S, Gautsch A, Machulla HKG. Are there HLA combinations typical supporting for or making resistant against aggressive and/or chronic periodontitis? *J Periodont Res* 2003;38:508-517.
227. Stern LJ, Wiley DC. Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Behring Inst Mitt* 1994;94:1-10.
228. Steven NM, Leese AM, Annels NE, Lee SP, Rickinson AB. Epitope focusing in the primary cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus and its relationship to T cell memory. *J Exp Med* 1996;184:1801-1813.
229. Stoltenberg JL, Osborn JB, Pihlstrom BL, Herzberg MC, Aeppli DM, Wolff LF, Fischer GE. Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status. *J Periodontol* 1993;64:1225-1230.
230. Storch H, Lowicke G, Fassauer H. Selective IgA defect. Clinical importance for stomatology. *Stomatol DDR* 1989;39:771-778.

231. Suzuki JB. Diagnosis and classification of the periodontal diseases. *Dent Clin North Am* 1988;32:195-216.
232. Svejgaard A, Ryder LP. HLA markers and disease. *Prog Clin Biol Res* 1979;32:523-543.
233. Sweeney EA, Alcoforado GA, Nyman S, Slots J. Prevalence and microbiology of localized prepubertal periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1987;2:65-70.
234. Takahashi K, Ohyama H, Kitanaka M, Sawa T, Mineshiba J, Nishimura F, Arai H, Takashiba S, Murayama Y. Heterogeneity of host immunological risk factors in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2001;72:425-437.
235. Takashiba S, Ohyama H, Oyaizu K, Kogoe-Kato N, Murayama Y. HLA genetics for diagnosis of susceptibility to early-onset periodontitis. *J Periodontal Res* 1999;34:374-378.
236. Takashiba S, Noji S, Nishimura F, Ohyama H, Kurihara H, Nomura Y, Taniguchi S, Murayama Y. Unique intronic variations of HLA-DQ beta gene in early-onset periodontitis. *J Periodontol* 1994;65:379-386.
237. Takeuchi Y, Yoshie H, Hara K. Expression of interleukin-2 receptor and HLA-DR on lymphocyte subsets of gingival crevicular fluid in patients with periodontitis. *J Periodontal Res* 1991;26:502-510.
238. Terasaki PI, Kaslick RS, West TL, Chasens AI. Low HL-A2 frequency and periodontitis. *Tissue Antigens* 1975;5:286-288.
239. Terasaki PI, McClelland JD. Microdot assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964;204:998-1000.
240. Tew JG, Zhang JB, Quinn S, Tangada S, Nakashima K, Gunsolley JC, Schenkein HA, Califano JV. Antibody of the IgG2 subclass, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and early onset periodontitis. *J Periodontol* 1996;67:317-322.
241. Tezal M, Wactawski-Wende J, Grossi SG, Ho AW, Dunford R, Genco RJ. The relationship between bone mineral density and periodontitis in postmenopausal women. *J Periodontol* 2000;71:1492-1498.
242. The J, Ebersole JL. Rheumatoid factor (RF) distribution in periodontal disease. *J Clin Immunol* 1991;11:132-142.
243. The J, Ebersole JL. Rheumatoid factor from periodontitis patients cross-reacts with epitopes on oral bacteria. *Oral Dis* 1996;2:253-262.
244. Tiwari JL, Terasaki PI. *HLA and Disease Associations*: Springer, New York 1985.
245. Tonetti MS, Mombelli A. Early Onset Periodontitis. In: Lindhe J, Karring T, Lang, NP (ed). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Copenhagen: Munksgaard 1998;226-257.
246. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997;24:1-8.
247. Van Dyke TE, Levine MJ, Tabak LA, Genco RJ. Juvenile periodontitis as a model for neutrophil function: reduced binding of the complement chemotactic fragment, C5a. *J Dent Res* 1983;62:870-872.
248. Van Dyke TE, Levine MJ, Tabak LA, Genco RJ. Reduced chemotactic peptide binding in juvenile periodontitis: a model for neutrophil function. *Biochem Biophys Res Commun* 1981;100:1278-1284.

249. Van Dyke TE, Wilson-Burrows C, Offenbacher S, Henson P. Association of an abnormality of neutrophil chemotaxis in human periodontal disease with a cell surface protein. *Infect Immun* 1987;55:2262-2267.
250. Van Rood JJ, Van Leeuwen A, Persijn G, Landsbergen Q, Goulmy E, Termijtelen A, Bradley BA. HLA compatibility in clinical transplantation. *Transplant Proc* 1977;9:459-467.
251. Vogt AB, Kropshofer H, Kalbacher H, Kalbus M, Rammensee HG, Coligan JE, Martin R. Ligand motifs of HLA-DRB5*0101 and DRB1*1501 molecules delineated from self-peptides. *J Immunol* 1994;153:1665-1673.
252. Walker SJ, van Dyke TE, Rich S, Kornman KS, di Giovine FS, Hart TC. Genetic polymorphisms of the IL-1 alpha and IL-1beta genes in African-American LJP patients and an African-American control population. *J Periodontol* 2000;71:723-728.
253. Wassenaar A, Reinhardus C, Abraham-Inpijn L, Snijders A, Kievits F. Characteristics of Prevotella intermedia-specific CD4+ T cell clones from peripheral blood of a chronic adult periodontitis patient. *Clin Exp Immunol* 1998;113:105-110.
254. Wassmuth R. Einführung in das HLA-System. Ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg 1995.
255. Wegener S. HLA und Krankheitsassoziation. *Infusionsther Transfusionsmed* 1994; 83:213-219.
256. Wilson ME, Kalmar JR. FcγRIIIa (CD32): a potential marker defining susceptibility to localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1996;67:323-313.
257. Yamazaki K, Tabeta K, Nakajima T, Ohsawa Y, Ueki K, Itoh H, Yoshie H. Interleukin-10 gene promoter polymorphism in Japanese patients with adult and early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001;28:828-832.
258. Yoshida A, Nakano Y, Yamashita Y., Oho T, Ito H, Kondo M, Ohishi M, Koga T. Immunodominant region of Actinobacillus actinomycetemcomitans 40-kilodalton heat shock protein in patients with rheumatoid arthritis. *J Dent Res* 2001;80:346-350.
259. Yun PL, DeCarlo AA, Hunter N. Modulation of major histocompatibility complex protein expression by human gamma interferon mediated by cysteine proteinase-adhesin polyproteins of Porphyromonas gingivalis. *Infect Immun* 1999;67:2986-2995.
260. Zambon JJ, Haraszty VI, Hariharan G, Lally ET, Demuth DR. The microbiology of early-onset periodontitis: association of highly toxic Actinobacillus actinomycetemcomitans strains with localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1996;67:282-290.

9. Anlagen

Chemikalien

Ethidiumbromid / Acridinorange - Färbelösung:

Stammlösung: 50 mg Ethidiumbromid (No. 11615, Fa. Merck, Darmstadt), 15 mg Acridinorange (No. 15931, Fa. Merck, Darmstadt), 49 ml, 10% EDTA-Lösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in isotonischem Puffer (PBS, Fa. Bica, Frankfurt/O.)

Gebrauchslösung: 1 ml Stammlösung + 9 ml PBS (kühl und dunkel gelagert)

Red Cell Lysis Buffer:

Stammlösung: 12,1 g TRIS (Sigma Chemical Co., St. Louis), 10,2 g MgCl₂ (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), 5,8 g NaCl (Fa. Merck, Darmstadt), 5 ml konzentrierte Salzsäure auf 1 l Aqua dest. bei pH = 7,6

Gebrauchslösung: (1 x RCLB): Stammlösung 1 : 10 mit Aqua dest. verdünnen

Elektrophoreselösung:

Stammlösung: 108 g (0,9 M) TRIS (Fluka AG, Buchs SG, Schweiz), 55 g (0,9 M) Borsäure (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), 40 ml (0,5 M) EDTA mit pH = 8,0 (20 mM EDTA, Carl Roth GmbH, Karlsruhe); TRIS-Basis und Borsäure in 700 ml Aqua dest. auflösen, EDTA zugeben und mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

Gebrauchslösung: (1 x TBE): 50 ml Stammlösung + 975 ml Aqua dest.

Blue-Ethidium-Marker:

Ethidiumbromid-Lösung: 1 g Ethidiumbromid (No. 11615, Fa. Merck, Darmstadt) in 100 ml PBS (Fa. Bica, Frankfurt/O.)

Blue Marker: 2 mg Bromphenolblau (Fa. Merck, Darmstadt) in 10 ml Ficoll (Dichte = 1,076) (Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Blue Marker und Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) im Verhältnis 10 : 1

PCR-Lösung:

500 µl 10 x PCR-Puffer (Applied Biosystem, Weiterstadt): 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), 100 mM Tris-HCl (pH = 8,3), 0,01% w/v Gelatine)

250 µl Glycerol (99%, Endkonzentration 5%, Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis)

350 µl autoklaviertes Aqua dest. (Pharmacia & Upjohn GmbH, Heidelberg)

je 100 µl dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 10 mM, Endkonzentration 200 µM, Applied Biosystems, Weiterstadt)

Informationsblatt zur Untersuchung „HLA und Parodontitis“

Sehr geehrte/r Frau/Herr

Im Rahmen einer wissenschaftlichen Studie untersuchen wir, ob ein Zusammenhang zwischen den Merkmalen des HLA-Systems des Menschen und der Neigung zu aggressiven Entzündungen des Zahnfleisches besteht. Dazu benötigen wir eine Blutprobe von Menschen, die unter solchen Entzündungen leiden bzw. immer gesundes Zahnfleisch haben, sowie deren Geschlecht und Alter. Der Name wird anonymisiert. Hierzu einige bewußt allgemein verständlich gehaltene Erläuterungen der Begriffe:

Das HLA-System umfaßt mehrere Gruppen an Merkmalen, die blutgruppenartig über die Einzigartigkeit eines jeden Menschen wachen, indem sie die Resistenz und Anfälligkeit gegenüber Krankheiten und Krebs sowie die Abwehrstärken und -schwächen gegenüber Krankheitserregern wesentlich mitbeeinflussen.

Zahnfleiscentzündungen können chronisch oder aggressiv verlaufen und letztlich zu Zahnerkrankungen oder gar zum Zahnausfall führen. Es sind daran neben einer ganzen Reihe anderer Ursachen auch verschiedene Mikroorganismen beteiligt. Das HLA-System könnte einerseits die Anfälligkeit/Abwehrfähigkeit gegenüber pathogenen Mikroorganismen direkt mitbestimmen oder/und andererseits indirekt über das Immunsystem wirkend Krankheiten verhindern.

Diese Studie könnte mit zu einer besseren Kenntnis der Vorgänge beitragen, die Zahnfleiscentzündungen aggressiv werden lassen. Solche Erkenntnisse führen früher oder später zu einer Verbesserung der Gesundheitsvorsorge bzw. Krankheitsbekämpfung.

Durch Ihren Beitrag in Form einer kleinen Blutprobe von 20 ml würden Sie gemeinsam mit uns dazu beitragen, neue Erkenntnisse zu erzielen.

Einverständnisbogen

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, mir zur Bestimmung meiner HLA-Merkmale eine kleine Blutprobe von 20 ml abnehmen zu lassen.

Ich gestatte, meine HLA-Merkmale anonymisiert in einer wissenschaftlichen Studie auswerten zu lassen. Über den Sinn der Studie wurde ich informiert.

Unterschrift

Datum

10. Thesen

1. Parodontopathogene Bakterien, die die Zahnwurzeloberflächen in Form eines Biofilms besiedeln, sind der primäre Faktor in der Ätiologie entzündlicher Erkrankungen des Zahnhalteapparates (Parodontitis). Trotz der Omnipräsenz der mikrobiellen Plaque existieren interindividuelle Unterschiede im Verlauf und in der Ausprägung der Parodontitis, die auf Unterschiede in der Wirtsreaktion auf die mikrobielle Plaque hindeuten.
2. Monogenetische Erkrankungen, die mit schweren Parodontitiden bereits im Kindesalter einhergehen, das überproportional häufige Vorkommen verschiedener Formen von aggressiven Parodontitiden in einer Familie sowie Zwillingsuntersuchungen mit einer Konkordanzrate von ca. 50 % für parodontalen Attachmentverlust deuten auf die Existenz genetischer Risiko- bzw. Resistenzfaktoren für Parodontitis hin.
3. Bei der Evaluierung potentieller genetischer Risikofaktoren gewannen auch Studien zum HLA-System zunehmend an Bedeutung. HLA-Moleküle können aufgrund ihrer hochpolymorphen Peptidbindungsregion die Bindungprozessierter bakterieller Peptide und damit die T-lymphozytäre Antigenerkennung beschränken. Die Ergebnisse bisheriger Studien zu dieser Thematik sind durch Populations- bzw. ethnische Unterschiede in der Verteilung der HLA-Merkmale, die Verwendung unterschiedlicher Kriterien für die Definition der Patienten- und Kontrollgruppen, eine zu geringe Anzahl von Erkrankten bzw. Kontrollprobanden mit schwierigem Nachweis seltener HLA-Merkmale sowie die überwiegend nur serologische Bestimmung der HLA-Genprodukte teilweise inkonsistent. Bis zum Beginn dieser Studie existierte nur eine deutsche Arbeit einer Berliner Arbeitsgruppe mit Beschränkung auf den serologischen Nachweis von HLA-Klasse I-Merkmalen bei Patienten mit schwerer Parodontitis.
4. Das Ziel dieser Arbeit war es deshalb, mittels serologischer und molekularbiologischer Methodik sowohl HLA-Klasse I- und –Klasse II-Merkmale bei Patienten mit aggressiver Parodontitis und chronischer Parodontitis im Vergleich zu einer parodontitisfreien Kontrollgruppe zu untersuchen. Im Vergleich zu Studien, die parodontal nicht untersuchte Blutspender als Kontrollgruppe auswählten, konnte dadurch der Kontrast zwischen „erkrankt“ und „gesund“ wesentlich erhöht werden. Erstmals wurde untersucht, ob der Nachweis subgingivaler parodontopathogener Bakterien mit der Expression bestimmter HLA-Moleküle assoziiert war.
5. Im Vergleich zu Probanden ohne Parodontitis waren die Merkmale HLA-A*29 ($p =$

0.040, OR = 6,55) und HLA-DRB1*13 ($p = 0.046$, OR = 2,17) signifikant positiv mit dem Auftreten der aggressiven Parodontitis assoziiert, während HLA-DRBblank* (non DRB3*/DRB4*/DRB5*) signifikant seltener vorkam ($p = 0.036$, OR = 0,42) und HLA-A*30+*31 nicht nachgewiesen werden konnte ($p = 0,007$, OR = 0,07). HLA-A*11 ($p = 0,041$, OR = 2,76) und HLA-A*33 ($p = 0,030$, OR = 11,0) waren signifikant häufiger bei chronischer Parodontitis exprimiert, während HLA-A*03 signifikant ($p = 0,039$, OR = 0,51) seltener vorkam. Die HLA-Merkmale -A*11, -A*29, -A*30+*31 und -A*33 waren auch in der Gesamtparodontitisgruppe (AP + CP) auffällig und stellen möglicherweise für Parodontitis übergeordnete Risiko- bzw. Resistenzindikatoren da.

6. Nur bei AP-Patientinnen war HLA-A*68/*69(A28) signifikant häufiger während HLA-DQB1*05 signifikant seltener nachgewiesen wurde. Unter CP-Patientinnen wurde eine höhere Phänotypfrequenz für HLA-DQB1*06,06 und -DRB3* bestimmt während HLA-DQB1*0303 nicht nachgewiesen werden konnte. Offensichtlich existieren bei Parodontitis geschlechtsabhängige HLA-Assoziationen, die in weiteren Studien zur Assoziation von HLA zur Parodontitis beachtet werden müssen.
7. Die positiv zur aggressiven Parodontitis assoziierte Kombination HLA-DRB1*13:DRB3*:DQB1*06 war mit einem erhöhten Nachweis von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.) assoziiert. Der bei aggressiver Parodontitis signifikant seltener vorkommende Haplotyp HLA-DRB1*04:DRB4*:DQB1*03 zeigte dagegen eine negative Assoziation zum Nachweis von A.a.. Möglicherweise können Merkmale des HLA-Systems die subgingivale Kolonisation mit bestimmten parodontalen Leitkeimen beeinflussen.
8. Der pathophysiologische Hintergrund der Assoziation von HLA-Markern zur Parodontitis ist unbekannt. Die Relation einzelner HLA-Marker und HLA-Kombinationen zu parodontalen Leitkeimen sowie die gezeigten Bindungsmöglichkeiten des äußeren Membranproteins Ag53 von *Porphyromonas gingivalis* an HLA-DRB1*1501 und -DRB1*1301 deuten auf eine HLA-abhängige antibakterielle Immunität hin.
9. HLA-Merkmale können als Teil des genetischen Backgrounds die Pathogenese der Parodontitis beeinflussen, aber nicht determinieren. Aufgrund der fehlender Strenge der Assoziation von HLA-Merkmalen zur Parodontitis ist eine HLA-Typisierung zur Bestimmung des individuellen Parodontitisrisikos nach heutigem Kenntnisstand noch nicht geeignet.
10. Zur weiteren Aufklärung der Ätiologie parodontaler Erkrankungen und möglicherweise

Entwicklung neuer Therapiestrategien ist die Identifizierung immundominanter und protektiver Peptide und ihre Bindung an HLA-Moleküle in weiteren Studien sinnvoll. Weiterhin ist der diagnostische Wert der ermittelten HLA-Assoziationen in Longitudinalstudien und Interventionsstudien zu überprüfen.

11. Lebenslauf

Dr. med. dent. Stefan Reichert, An der Petruskirche 5, 06120 Halle (Saale)

Persönliche Angaben

Geburtsdatum und –ort	10.06.62 in Stralsund
Familienstand	verheiratet, zwei Kinder

Schulbildung

1969-1979	Allgemeinbildende Oberschule in Stralsund
1979-1982	Berufsausbildung mit Abitur

Wehrdienst

1982-1984

Studium

1984-1985	Vorpraktisches Jahr Bezirkskrankenhaus Stralsund
1985-1991	Studium der Zahnmedizin Humboldt-Universität Berlin
1990	Diplom
1991	Staatsexamen, Approbation
1993	Promotion

Beruflicher Werdegang

1991-1992	Assistent Zahnarztpraxis Dr. Schlosser in Berlin
1992-1996	Wiss. MA Abteilung für Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin
1996- bis dato	Oberarzt an der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie der MLU

Halle, den 20.02.2008

Dr. Stefan Reichert

12. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Weder diese noch eine andere Arbeit ist von mir im Rahmen eines Habilitationsverfahrens einer anderen Fakultät oder Universität vorgelegt worden.

Halle (Saale), den 20.02.2008

Dr. Stefan Reichert

13. Danksagung

Ich möchte mich bei dem Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie, Herrn Prof. Dr. H.-G. Schaller, ganz herzlich für die während der Arbeit gewährte Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt dem ehemaligen Leiter des HLA-Labors Herrn Dr. rer. nat Helmut K. G. Machulla für die Überlassung des Themas, die jederzeit gewährte Hilfe, die vielen anregenden Diskussionen und die Korrektur des Manuskriptes. Zu danken wäre auch den MTLAs Astrid Schaaf, Jana Krüger und Constanze Kloß für die HLA-Typisierungen.

Herrn Dr. med. dent. Jamal Stein, MS danke ich sehr herzlich für die Berechnung der HLA-Kombinationen und die schon über viele Jahre bestehende rege wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Herrn Dr. med. dent. Andreas Gautsch fühle ich mich verbunden für die parodontologische Untersuchung eines Teils der Probanden und die freundschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen ehemaligen bzw. jetzigen Kolleginnen in der Abteilung Parodontologie Frau ZÄ Ines Gutjahr, Frau ZÄ Christine Raak, Frau Dr. Jana Klapproth und Frau Dr. Uta Zimmermann sowie den zahnärztlichen Helferinnen Frau Antje Wagner, Frau Christine Stiefel, Frau Andrea Stenker und Frau Sabine Schinnerling für die Hilfe bei der Rekrutierung der bis heute zahlreichen Studienprobanden bedanken.

Mein besonderer Dank gilt allen Probandinnen und Probanden, ohne deren Bereitschaft zur Studienteilnahme diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.