

2. Problemstellung und Ziel der Arbeit

Für eine Korrelation bestimmter HLA-Merkmale mit parodontalen Erkrankungen sprechen die Ergebnisse verschiedener Studien, die untereinander jedoch aufgrund methodologischer und ethnographischer Unterschiede oder durch Verwendung von parodontologisch mehr oder weniger undifferenzierten Vergleichsgruppen nur bedingt vergleichbar sind und demzufolge keine konsistenten Ergebnisse lieferten. Bisher existieren nur zwei Untersuchungen deutscher Patienten kaukasischer Rasse. Die erste Untersuchung dieser Art in Deutschland wurde noch vor der standardisierten Anwendung moderner DNA-Technik an einer Berliner Gruppe mit profunder Parodontitis durchgeführt (134), während die zweite Untersuchung an 30 RPP-Patienten im Rahmen der Arbeitsgruppe „Orale Immunologie“ des hiesigen Institutes der vorliegenden Arbeit methodisch gleicht (221). Des weiteren existieren Untersuchungen zur Assoziation zwischen HLA und Parodontitis vorwiegend an Patienten mit rasch fortschreitenden Parodontitisformen aus Grossbritannien (5,112), Frankreich (26), Israel (105), der Türkei (72) und aus Japan (160,207,225,226). In den meisten dieser Arbeiten wurden die HLA-Merkmale serologisch bestimmt, nur in einigen wenigen wurden molekulargenetische Techniken eingesetzt (26,160). Das Ziel dieser Arbeit bestand deshalb darin, eine vermutete Assoziation von HLA-Merkmalen und Erwachsenenparodontitis nachzuweisen und zu bestätigen, wobei durch den Einsatz molekulargenetischer Methoden die Resultate der serologischen Untersuchung mittels Antikörpersets gesichert, aber auch verfeinert und erweitert werden. Dazu wurde bei einer Gruppe deutscher Patienten mit Erwachsenenparodontitis die Verteilung der HLA-Merkmale untersucht. Als Vergleichsgruppe dienten Patienten, die gezielt daraufhin ausgewählt wurden, dass trotz einer chronisch schlechter Mundhygiene keine klinischen Zeichen einer marginalen Parodontitis festgestellt werden konnten (sog. Resistenzgruppe). Zur Kontrolle wurde weiterhin eine Gruppe HLA-typisierter, nicht im Rahmen dieser Studie zahnärztlich untersuchter Blutspender herangezogen. Unter Verwendung der Typisierungsdaten von Patienten mit einer RPP (188,221) soll zusätzlich eine aus den Patienten mit einer Erwachsenenparodontitis und RPP-Patienten bestehende Gesamtgruppe hinsichtlich ihrer HLA-Merkmale der Resistenzgruppe gegenübergestellt werden. Ein HLA-abhängiges Risiko für die Entstehung (prädisponierendes Merkmal) oder die Verhinderung (Resistenzmerkmal) einer Erwachsenenparodontitis soll dann durch den Vergleich der Gruppen gefunden und diskutiert werden.

3. Material, Methoden und Probandenauswahl

3.1. Patienten und Kontrollgruppen

Patienten zweier niedergelassener Zahnärzte (Zahnarztpraxen Gautsch in Bremen und Wilcken in Burg auf Fehmarn), die zum Stichtag 01.01. 1998 bereits 38 Jahre und älter waren,

wurden auf das Vorliegen einer Parodontitis selektiert. Dabei kamen die Patienten zur Auswahl, die sich in einer der beiden Zahnarztpraxen einer systematischen Parodontaltherapie unterzogen hatten, mindestens 10 eigene Zähne aufweisen konnten und für die ein Parodontalstatus nach vorgeschriebenem Formblatt (Anamnese und klinischer Befund) erstellt wurde. Diese Parodontalstatus wurden nach den Kriterien Taschentiefe von mindestens 4mm an wenigstens 5 Zähnen (Sondierungstiefe, gemessen mit der WHO-Sonde vom Marginalsaum bis zum Taschenfundus an 6 Meßpunkten je Zahn) und geringer Progression der Parodontitis (rezidivärmer, chronischer Verlauf) sortiert, wobei die dazu vorliegenden Röntgenbilder (in der Regel OPG- Aufnahmen) einen horizontalen und /oder vertikalen Knochenabbau an den betreffenden Zähnen nachweisen mussten. Die nach diesen Kriterien selektierten Patienten wurden angeschrieben (s. Anlage) und erhielten nach Aufklärung und Einverständniserklärung einen Termin zur Entnahme von venösem Blut, das dann auf ihre HLA-Merkmale untersucht wurde.

Als parodontitisfreie Vergleichsgruppe wurden Patienten aus den Zahnarztpraxen Gautsch in Bremen und Wilcken in Burg auf Fehmarn herangezogen, die ebenso zum Stichtag bereits 38 Jahre und älter waren, mindestens 10 eigene Zähne aufweisen konnten und sich wie die AP-Patienten zu einer Blutentnahme zwecks HLA-Typisierung bereit erklärten. Diese Probanden wurden mit Hilfe eines Statistikmoduls (Diagnose: Gingivitis) aus dem gesamten Patientengut der beiden Praxen (N=6800) herausgefiltert, angeschrieben (s. Anlage) und nach Einverständniserklärung zu einer Screeninguntersuchung einbestellt. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden eine Anamnese zum Ausschluss HLA-assoziiierter Allgemeinerkrankungen, 6 Sondierungsmessungen mit WHO-Sonde an allen Zähnen sowie zwei Mundhygieneindizes (API und SBI) erhoben. Gezielt ausgewählt wurden 102 Patienten mit einer unzureichenden Mundhygiene (API > 30%, SBI > 10%), einem durch vorliegende Röntgenbilder verifizierten, fehlenden horizontalen und/oder vertikalen Knochenabbau und einer Sondierungstiefe von weniger als 2,5 mm. Zugelassen wurden Patienten ohne approximalen Attachmentverlust mit vestibulären oder oralen Rezessionen (Referenzpunkt: Schmelz-Zementgrenze) von maximal 4mm aufgrund traumatischer (Putztrauma) oder altersinvolativer Einflüsse (Abb. 4) .

Der Plaquebefall und der Entzündungsgrad wurden mit dem modifizierten approximalen Plaqueindex nach Lange (API) und dem modifizierten Sulkusblutungsindex nach Lange et al. (SBI) ermittelt. Zur Erhebung des API wurde die Plaque mit einem Plaquerevelator angefärbt und danach innerhalb der Approximalräume des I. und III. Quadranten von oral sowie des II. und IV. Quadranten von vestibulär bewertet, ob an der untersuchten Stelle Plaque vorlag oder nicht. Die Ergebnisse wurden jeweils in Prozent pro Patient angegeben (Anzahl positiver Messpunkte / Anzahl vorgenommener Messungen x 100). Der SBI wurde in der selben Systematik erfasst, wobei durch schonendes Ausstreichen des sulcus gingivae im I. und III.

Quadranten von oral sowie im II. und IV. Quadranten von vestibulär das Auftreten einer Blutung nach ca. 30 Sekunden beurteilt und die positiven Resultate in Prozent pro Patient angegeben (Summe der positiven Blutungspunkte/Anzahl vorgenommener Messungen x 100) wurden.

Von den Untersuchung blieben prinzipiell Probanden mit Allgemeinerkrankungen ausgeschlossen, deren Assoziation mit HLA bekannt ist. Sowohl alle typisierten Patienten als auch die typisierten Resistenz- bzw. Kontrollprobanden stammten aus Deutschland und gehörten der kaukasischen Rasse an.

3.2. Serologische Untersuchung der HLA-Klasse I-Antigene

3.2.1. Methodik der Typisierung der HLA-Antigene

Die Bestimmung der HLA-Merkmale wurde innerhalb der Arbeitsgruppe Dr. Machulla „Orale Immunologie“ nach identischen methodischen Prinzipien und standardisierten Abläufen durchgeführt. Deshalb weicht die hierzu vorgelegte Beschreibung der Methodik und Materialien sprachlich und inhaltlich nur unwesentlich von der anderer Mitglieder der Arbeitsgruppe ab (221).

Lymphozyten sind aufgrund der hohen HLA-Antigendichte auf ihrer Zelloberfläche und ihrer unkomplizierten Gewinnung aus dem peripheren Blut die geeignetsten Zellen zur serologischen und mikrobiologischen Bestimmung der HLA-Merkmale. Die Isolierung der mononukleären Zellen des Blutes (mehr als 95% Lymphozyten) erfolgt durch Dichtezentrifugation. Diese werden entweder direkt zur serologischen Bestimmung der Klasse I-Merkmale, oder zur Bestimmung der Klasse II-Merkmale erst nach einer weiteren Separation der B- Lymphozyten dem Mikrolymphozytotoxizitätstestes (MLCT) nach Terasaki und McClelland (228) zugeführt, da die Klasse II-Merkmale sich auf B-Lymphozyten und Monozyten, nicht aber auf den ruhenden T-Lymphozyten des peripheren Blutes befinden. Der MLCT ist standardisiert nach dem National Institute of Health (NIH, Bethesda). Mit diesem Test werden 23 HLA-A-, 51 HLA-B-, 8 HLA-Cw-, 21 HLA-DR- und 9 HLA-DQ-Merkmale durch Antikörper verschiedener HLA-Spezifität bestimmt.

3.2.2. Isolierung der Lymphozyten aus peripherem Blut

Jedem Patienten wurden mit Monovetten (Fa. Saarestedt, 9 NC/10 ml) 20 ml Venenblut entnommen und dabei gleichzeitig mit Natriumzitrat versetzt. Die Lymphozyten wurden durch Dichtegradientenzentrifugation nach dem Prinzip von Böyum (29) präpariert. Hierfür wurden 3 Teile Blut mit 7 Teilen isotonischer Pufferlösung (PBS, Fa. bica, Frankfurt/O.) verdünnt und im

Verhältnis 1 zu 1 auf 4 ml einer Gradientenflüssigkeit (Lymphoprep, Dichte = 1,076g/cm³, pH = 7,4; Fa. bica, Frankfurt/O.) überschichtet und anschließend 20 Minuten bei 3200 U/min [ohne Bremse] (Rotana-Zentrifuge AP, Typ 4302, Fa. Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert. Aufgrund ihrer hohen Dichte sedimentieren Erythrozyten auf dem Boden der Röhrchen, während die Granulozyten unterschiedlich tief in die Gradientenflüssigkeit eindringen. Die peripheren Blutlymphozyten (PBL) befinden sich nach der Zentrifugation als trübe Schicht in der Zwischenphase zwischen dem Überstand und der Gradientenflüssigkeit und werden mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Diese wurden nach Überführung in ein weiteres Röhrchen und Auffüllen mit 10 ml PBS nochmals bei 900 U/min für 10 Minuten zentrifugiert („Waschen“), die im Überstand verbliebenen Thrombozyten dekantiert und das Zellpellet 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 (s. Anlage) und 2 µl Hämopath (s.u.) sowie 3-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter dem invertierten Fluoreszenzmikroskop auf Vitalität und Zellzahl überprüft. Bei einer Vitalität von mindestens 90% wurden anschließend die Zellen auf ca. 2000 Zellen/µl eingestellt (Schätzen der Zellzahl) und damit für die Typisierung der HLA-Klasse I-Merkmale vorbereitet. Für die HLA-Klasse II-Typisierung wurde eine weitere spezielle Zellseparation für B-Lymphozyten angeschlossen.

3.2.3. Typisierung der HLA-Klasse I-Merkmale

Prinzip des Mikrolymphozytotoxizitätstestes

Vitale Lymphozytensuspensionen werden mit Testseren (selektiven zytotoxischen Antikörpern) und Komplement versetzt. Durch Komplementaktivierung bei der Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes an der Zelloberfläche wird die Zellmembran perforiert und dadurch die Zelle lysiert (zytotoxische Reaktion). Der anschließend zugegebene Farbstoff dringt in die zerstörte Zelle ein und färbt die DNA (positive Reaktion). Tragen die Lymphozyten das HLA-Merkmal nicht, gegen das der spezifische Antikörper gerichtet ist, findet keine Antikörper-Antigen-Reaktion statt, so dass der Farbstoff nicht in die Zelle eindringen kann (negative Reaktion) (228).

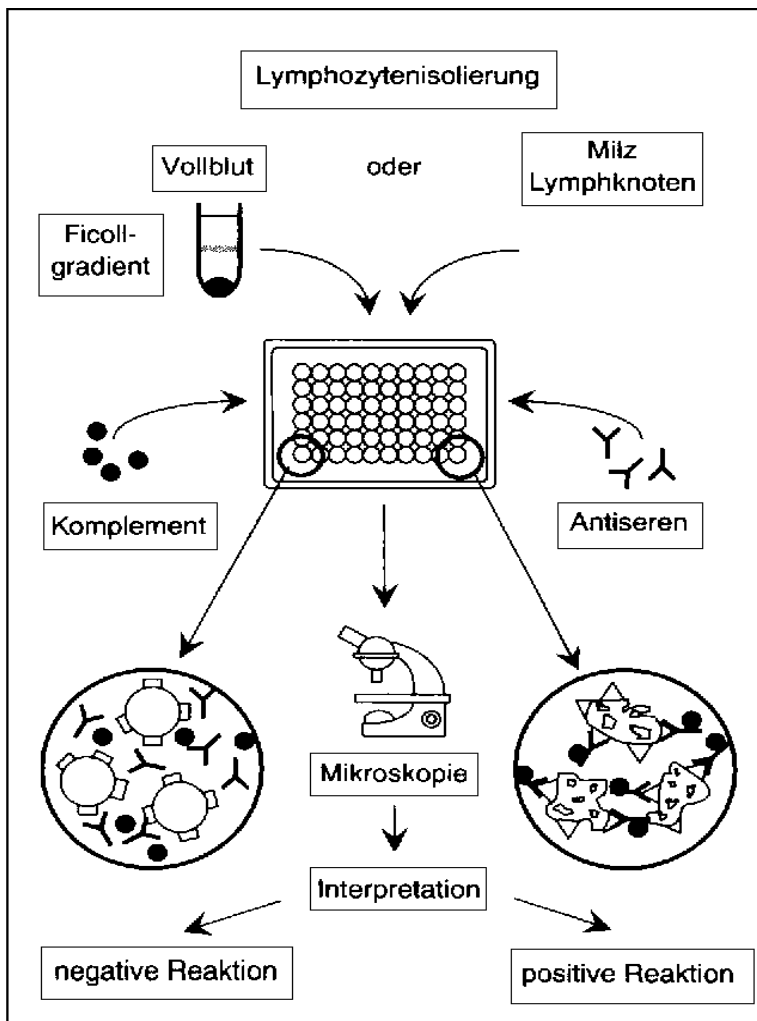


Abb. 2: Prinzip des Mikro-Lymphozyto-Toxizitäts-Test (246)

Testdurchführung der HLA-Klasse I-(ABC)- Typisierung

Die Typisierung der Klasse I-Merkmale wurde mit Typisierungskammern nach Terasaki und McClelland durchgeführt. Diese sind pro Kavität mit 1 µl des Testserums beschickt, die zum Schutz vor Verdunstung mit jeweils 5 µl Paraffinöl überschichtet, tiefgefroren gelagert (Lagerungstemperatur: -20°C) und erst unmittelbar vor dem Testbeginn aufgetaut wurden. . Verwendet 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). Diese Testkammern enthielten ein Set von 142 standardisierten HLA-Klasse I-Antiseren. Jede Anti-HLA-Spezifität war durch mindestens zwei Antiseren vertreten. Zur

Positivkontrolle wurde ein multispezifisches Antilymphozytenserum, zur Negativkontrolle ein nichtzytotoxisches AB-Serum verwendet.

Mit einem Dispenser (PB 600 Dispenser, Fa. Hamilton, Bonaduz AG, Schweiz) wurden jeweils 1 μl der nach 3.2.2 vorbereiteten Lymphozytensuspension in jede Kavität einer Kammer übertragen, die dann 30 Minuten bei Raumtemperatur (23 °C) inkubiert wurde (Inkubator WTC Binder, Tuttlingen). Im Anschluss an die Inkubation wurde mit einem Mehrfachdispenser (Terasaki Dispenser, Fa. Hamilton) pro Kavität 5 μl Kaninchenkomplement (Bestandteil des Typisierungskits) zugesetzt und die Kammer weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Färbung der Testkammern durch Zusatz von jeweils 2 μl Ethidiumbromid / Acridinorange-Lösung in PSB (s. Anlage) pro Kavität mit dem Mehrfachdispenser (201). Zur Kontrastierung des Hintergrundes wurden noch jeweils 2 μl Hämoglobin (Hämopath, Pharma Dessau) zugegeben. Der „Letalfarbstoff“ Ethidiumbromid diffundiert in die lysierten Zellen und färbt die DNA. Nach Bestrahlung mit UV-Licht photoemittiert das an die DNA gekoppelte Ethidiumbromid rotes Licht, so dass die lysierten Zellen im invertierten Fluoreszenzmikroskop rot erscheinen. Der „Vitalfarbstoff“ Acridinorange wird nur von vitalen Zellen aufgenommen (Pinozytose) und intrazellulär angereichert. Unter UV-Bestrahlung photoemittiert dieser Farbstoff grünes Licht, so dass lebende Zellen im invertierten Fluoreszenzmikroskop grün erscheinen.

Bewertung der Reaktion

Aus dem Verhältnis der lysierten Zellen (positive Reaktion) zu den vitalen Zellen (negative Reaktion) ermittelt man die Reaktionsstärke für jede Kavität und ordnet sie verschiedenen Reaktionsstufen (Score-Werte in Tabelle 2) zu. Die Auswertung der einzelnen Reaktionen erfolgte am invertierten Fluoreszenzmikroskop (CK2, Fa. Olympus, Hamburg; Okular CWHK 10x/18L, Objektiv A 10 PL [10x], Betrachtung unter Auflicht mit Fluoreszenzanregung bei $\lambda=509$ nm unter Benutzung eines entsprechenden Anregungs-, Sperr- und Wärmefiltersystems).

Tab. 2: Bewertung der Reaktionsstufen im MLCT (Tab. aus Diss. Stein [221])

% 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	

Das positive Kontrollserum enthält 100% lysierter Lymphozyten (16) und diente zum Vergleich der Testergebnisse, entspricht also), während das negative Kontrollserum den „background“ an defekten Zellen (0-10%) darstellt.

Alle Testergebnisse wurden auf vorgefertigten Worksheets (s. Anlage) protokolliert und ausgewertet. Ein HLA-Merkmal galt dann als nachgewiesen, wenn bei gleichzeitig positiver Reaktion des für das betreffende HLA-Merkmal verwendeten zweiten Antiserums alle anderen ausgeschlossen werden konnten (negative Reaktion).

3.3. Molekularbiologische Untersuchung der HLA-Antigene

3.3.1. Prinzip der molekularbiologischen HLA-Typisierung

Die Bestimmung der HLA-Merkmale wurde innerhalb der Arbeitsgruppe Dr. Machulla „Orale Immunologie“ nach identischen methodischen Prinzipien und standardisierten Abläufen durchgeführt. Deshalb weicht die hierzu vorgelegte Beschreibung der Methodik und Materialien sprachlich und inhaltlich nur unwesentlich von der anderer Mitglieder der Arbeitsgruppe ab (221).

Die spezifische und reproduzierbare Typisierung von HLA-Merkmalen wurde erstmalig auf genetischer Ebene durch die Anwendung molekularbiologischer Methoden ermöglicht und somit konnten die Ergebnisse serologischer Typisierungstechniken abgesichert und, aufgrund der höheren Auflösung dieses Verfahrens, insbesondere für die HLA-Klasse II-Merkmale präzisiert werden.

Die Grundlage für die molekulargenetische Analyse der HLA-Merkmale ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), bei der in vitro DNA-Moleküle, ähnlich dem natürlichen Prinzip der DNA-Replikation, in einer Kettenreaktion amplifizieren. Die ersten Experimente dazu machten Mullis und Faloona (154) sowie Saiki et al. (196). Die dadurch mögliche hochgradige Vervielfältigung bestimmter DNA-Sequenzen (Amplifikation) basiert auf drei sich zyklisch

wiederholenden Prozesse: die Denaturierung der DNA, die Primeranlagerung (Annealing) und die Polymerisation (Extension). Die Denaturierung der DNA erfolgt durch Temperaturerhöhung auf $\geq 95\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Schmelzen), wodurch der DNA-Doppelstrang in seine Einzelstränge aufgetrennt wird. Ein schnelles Abkühlen auf ca. $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ermöglicht ein Anlagern der spezifischen Primer (synthetisierte einsträngige Oligonukleotide, die als Starternukleotide für die DNA-Polymerasen dienen) an die komplementären Sequenzen der Matrizen-DNA (Annealing) und erfordert je nach Länge der Primer und Art der Nukleotidbasen eine spezifische Temperatur. Die DNA-Polymerase synthetisiert dann bei einer Temperatur von $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, in Gegenwart von freien Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP), den komplementären DNA-Strang (Extension). Bereits nach dem 3. Zyklus entstehen DNA-Doppelstränge, die genau dem gesuchten DNA-Abschnitt entsprechen. Im allgemeinen reichen 25 Zyklen aus, um eine millionenfache Kopie zu erreichen. Um die je Zyklus erforderliche Zugabe einer hitzeinstabilen DNA-Polymerase zu vermeiden, wird eine aus dem thermostabilen Bakterium *Thermus aquaticus* isolierte DNA-Polymerase verwendet (Taq-Polymerase) und damit die Automatisierung der PCR ermöglicht.

Das PCR-SSP-Verfahren (SSP = sequenzspezifische Primer) bildete die methodische Grundlage bei der vorliegenden Bestimmung der HLA-Klasse II-Merkmale. Die zu bestimmenden HLA-Allele bzw. -Allelgruppen werden hier über die Bildung sequenzspezifischer PCR-Produkte bereits auf der Ebene der Amplifikation differenziert, da die Amplifikationsreaktion nur bei Komplementarität zwischen dem 3'-Ende des Primers und der Zielsequenz ablaufen kann (161). Die hierfür verwendeten Primer bilden entsprechend ihrer Sequenz nur in Anwesenheit eines bestimmten Allels ein PCR-Produkt, das nach abgelaufener Polymerase-Kettenreaktion gelelektrophoretisch nachgewiesen wird.

3.3.2. Die DNA-Isolierung

Für die Isolierung der DNA aus Citratblut oder aus leukozytenhaltiger Gradientenflüssigkeit bzw. isolierten und resuspendierten Milzzellen werden unterschiedliche Methoden der DNA-Extraktion beschrieben, z.B. die Chloroform-Triethylammoniumbromid (CTAB)-Methode (252) oder die Phenol-Chloroformreinigung (252). In der Arbeitsgruppe „Orale Immunologie“ wurde die DNA aus 10 ml Citratblut bzw. leukozytenhaltiger Gradientenflüssigkeit mit der Aussalzmethode nach Miller (147) präpariert, nachdem nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 4000 U/min die kernhaltigen Zellen aus dem Citratblut abgetrennt, der Plasmaüberstand verworfen und durch Zugabe von 45 ml 1 x RCLB (Red Cell Lysis Buffer; s. Anlage) die noch vorhandenen Erythrozyten lysiert wurden.

Nach Verwerfen des Überstandes wurde den sedimentierten kernhaltigen Zellen nochmals RCLB zugesetzt und diese erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wird bis zur vollständigen

Entfernung der restlichen Erythrozyten 2 bis 3 mal zu wiederholen, bis das Zellpellet keine Verunreinigungen mehr aufweist. Die so gewaschenen kernhaltigen Zellen wurden in ein Eppendorf Cap (Fa. Eppendorf, Hamburg) überführt, in 1 ml 1 x RCLB resuspendiert und 1 Minute in einer Eppendorfszentrifuge bei 14000 U/min zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden 200 µl 0,5 x RCLB und 50 µl Proteinase K-Lösung (Fa. Boehringer, Mannheim) zum „Verdauen“ der kernhaltigen Zellen und zusätzlich 30 µl SDS-Lösung (Sodium Dodecyl Sulfat 10 %, Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg) zugegeben und das Zellpellet 1 Stunde bei 65 °C im Eppendorf-Thermomixer inkubiert. Zur Ausfällung der Proteine wurden der Lösung dann 100 µl NaCl zugesetzt und anschließend noch einmal 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Durch eine weitere Zentrifugation (1 Minute, 14000 U/min) und die Überführung der im Überstand befindlichen DNA in ein Saarestedt Cap mit 750 µl vorgelegtem Isopropanol (Laborchemie Apolda GmbH) wurde die DNA unter vorsichtigem Schwenken ausgefällt, noch einmal zentrifugiert (3 Minuten, 14000 U/min) und nach dem Verwerfen des Überstandes in 200 µl Aqua dest. aufgelöst. Nach einer abschließenden Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C wurde das DNA-Pellet bei einer Temperatur von -70 °C gelagert. Je nach Notwendigkeit war dadurch eine wiederholte DNA-Typisierung möglich.

Nach der DNA-Präparation erfolgte die Bestimmung des DNA-Gehaltes bzw. -Reinheitsrades. Die DNA-Konzentration wurde durch die Messung der optischen Dichte (OD) am Spektrometer (UV/VIS-Spektrometer, Fa. Pharmacia, Uppsala) bestimmt, wobei bei einer Wellenlänge von 260 nm die Extinktion einer DNA-Probe von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entsprach. Die Extinktion eventuell vorhandener Verunreinigungen durch störende Proteine wurde anschließend bei einem Maximum von 280 nm gemessen und mit der optischen Dichte der DNA bei 260 nm ins Verhältnis gesetzt. Die DNA-Konzentration wurde dann auf 50 ng/µl eingestellt, wenn der Reinheitsindex der DNA (OD_{260} / OD_{280}) kleiner als 1,8 war.

3.3.3. PCR-Amplifikation mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP)

Für die Amplifikation mittels PCR-SSP wurden kommerzielle Testkits verschiedener Firmen eingesetzt: für die Typisierung der Klasse I-Merkmale Primer-Kits der Firmen Deutsche Dynal (Hamburg) und CTS (Universität Heidelberg), für die HLA-Klasse II-Typisierung 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).

Ein sogenannter Mastermix und Primermix enthält die für den Reaktionsansatz notwendigen Materialien. Der Mastermix besteht 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 enthält 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. Aus einem Set verschiedener Primermischungen wurden pro PCR-Reaktion jeweils 5 µl des Primermixes einer entsprechenden HLA-Spezifität in einem Eppendorf-cap vorgelegt, weitere 5 µl des PCR-Mastermixes zugegeben und die DANN dann in einem programmierten Thermocycler (Gene Amp 9600, Perkin Elmer, Weiterbach) amplifiziert, wobei die nachfolgenden Temperaturprofile durchlaufen werden mussten. Nach einer 2 minütigen Denaturierung bei 94 °C folgten 10 Zyklen mit jeweils 10 Sekunden bei 94 °C (Denaturierung) und 60 Sekunden bei 65 °C (Annealing und Extension), danach schlossen sich 20 Zyklen mit jeweils 10 Sekunden bei 94 °C (Denaturierung), 50 Sekunden bei 65 °C (Annealing) und 30 Sekunden bei 72 °C (Extension) an. Eine Verringerung der Annealingtemperatur nach den ersten 10 Zyklen führt durch die größere Stabilität des Komplexes aus dem Primer und der Matrizen-DNA zu einem größeren Gewinn an PCR-Produkten.

3.3.4. Nachweis der Amplifikate mittels Gelelektrophorese

Die horizontale Agarosegelelektrophorese weist durch die Auftrennung der DNA-Amplifikate nach ihrer Größe nach, ob eine Amplifikation stattgefunden hat oder ein PCR-Produkt im zu erwartenden Größenbereich liegt. Die Unterscheidung richtiger Ergebnisse von unspezifischen (falsch positiven) PCR-Produkten ist mit dieser Methode innerhalb kurzer Zeit möglich.

Das Grundprinzip ist einfach. Nach dem Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle in einem dafür geeigneten Laufpuffer (pH = 7,2) in Richtung Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit einerseits von der Maschenweite des Gels (Filterwirkung) und andererseits von der Größe der DNA-Fragmente bestimmt wird. Die Größe der einzelnen PCR-Produkte wird aus dem Vergleich mit Längenstandards aus DNA-Fragmenten bekannter Größe bzw. aus dem Vergleich der Laufweite der verschiedenen Amplifikate bestimmt.

Zur Vorbereitung der Agarosegelelektrophorese wurden unter Mikrowellenbestrahlung 3 g Agarose (Agarose N, Pharmacia, Uppsala) in 100 ml 1 x TBE-Laufpuffer (s. Anlage) gelöst, die nach dem Abkühlen auf 60 °C mit 30 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Fa. Merck, Darmstadt) versetzt, anschließend in spezielle Gelträger ausgegossen und in die mit Puffer gefüllte und mit entsprechenden Elektroden versehene submarine Elektrophoresekammer (10 x 20 cm, Pharmacia Biotech, Fa. Biometra, Berlin) eingespannt wurde. Noch vor der Erstarrung des Argarosegels wurden mit sog. Kämmen (24 Vertiefungen pro Kamm) Slots für die Aufnahme

der Amplifikate gebildet, in welche anschließend die DNA-Produkte, nach dem Zusatz von jeweils 2 µl Blue-Ethidiumbromid-Marker (s. Anlage), mit einer Pipette eingefüllt wurden. Das Ethidiumbromid ermöglichte die anschließende Auswertung der Elektrophorese unter UV-Licht.

Bei einer an die Elektroden angelegten Spannung von 100 V erfolgte für ca. 15 Minuten die Elektrophorese. Die Ergebnisse wurden anschließend an einem Transilluminator (Gel Print 1000i+, MWG Biotech, Ebersberg) unter UV-Licht-Bestrahlung ausgewertet.

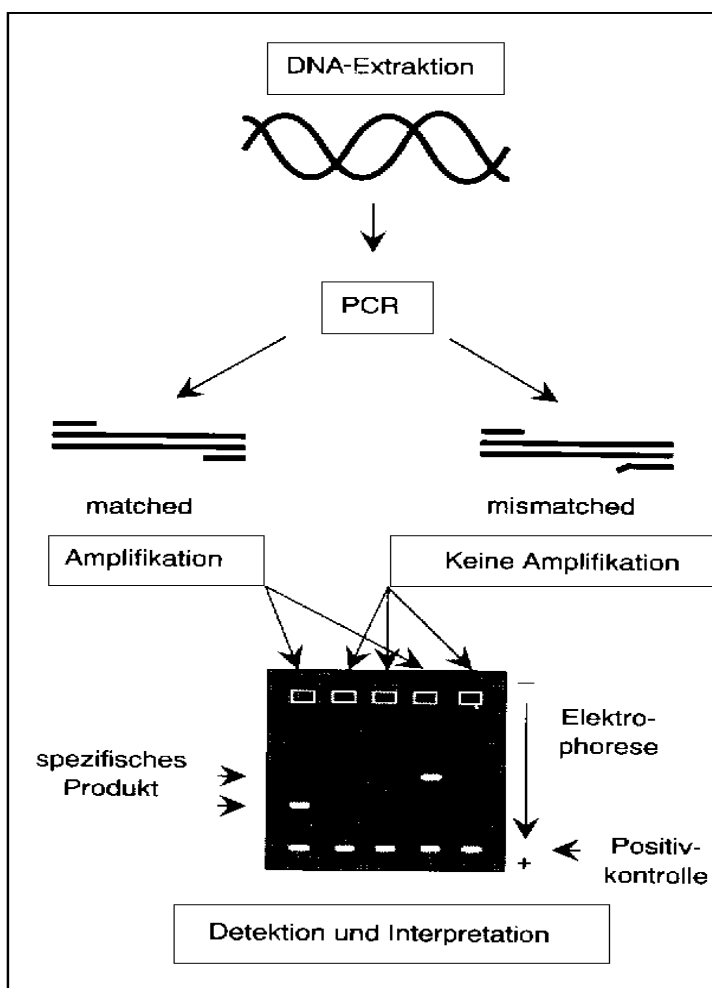


Abb. 3: Prinzip der Polymerasekettenreaktion mit sequenzspezifischen Primern (246)

3.3.5. Differenzierungsgrad der HLA-Typisierung

In Abhängigkeit vom Auflösungsvermögen der eingesetzten Primer-Kits können die HLA-Merkmale mit der molekularbiologischen Typisierungsmethode unterschiedlich stark differenziert werden, wobei die niedrig-auflösende (low-resolution-) von der hoch-auflösenden (high-resolution-) Typisierung unterschieden wird.

Durch serologische Techniken konnten sowohl die Hauptmerkmale als auch deren Splits bestimmt werden, aber den sicheren Nachweis einiger Antigene (HLA-DQ, HLA-Cw) und Splits (z.B. B44+45) schränkten die dafür unzureichenden Antikörperspezifitäten ein, wobei ebenfalls noch die bekannten Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Antisera in der Interpretation der Resultate berücksichtigt werden mussten.

Die vorliegende Arbeit hatte deshalb die Aufgabe, die serologischen Typisierungsergebnisse für die HLA-Merkmale A, B, Cw, DRB1, DRB3/4/5 und DQB1 noch einmal molekularbiologisch durch eine niedrig-auflösende Typisierung abzusichern bzw. zu präzisieren, wobei die Merkmale HLA-A*68 und -A*69 zu HLA-A28 sowie HLA-B*64 und -B*65 zu HLA-B*14 zusammengefasst wurden. Eine Auflösung des Merkmals HLA-Cw*blank in HLA-Cw*12-18 war zum Zeitpunkt der Arbeit noch nicht möglich, so dass durch die zusätzliche low-resolution-Typisierung eine Unterscheidung von 20 HLA-A-, 40 HLA-B-, 9 HLA-Cw-, 14 HLA-DRB1- und 9 HLA-DQB1-Merkmale ermöglicht wurde (Tabelle 3).

3.4. Statistische Methoden

Um HLA-Typisierungsergebnisse der AP-Patienten mit denen der Resistenz- bzw. Kontrollgruppe statistisch vergleichen zu können, wurden jeweils die Häufigkeiten (n) der untersuchten HLA-Merkmale gezählt und prozentual (Phänotypfrequenz, pf) wiedergegeben, wobei zusätzlich die jeweilige Genotypfrequenz (gf) mit der Formel $gf = 1 - \sqrt[3]{1 - pf}$ aus der Dezimalzahl der Phänotypfrequenz errechnet wurde. Deshalb konnte beim Vorliegen von Homozygotien ein auf dem Genotyp basierender Erwartungswert (gf^2) der beobachteten Phänotypfrequenz gegenübergestellt werden. Die statistische Signifikanz von positiv oder negativ assoziierten HLA-Merkmalen wurde mit dem χ^2 -Heterogenitätstest bestimmt, der, ausgehend von einer Vierfeldertafel, mit der Formel $\chi^2 = \sum (O-E)^2/E$ (O = engl. observed, beobachtet; E = engl. expected, erwartet) berechnet wurde. Die so erhaltenen Werte wurden zusätzlich mit Hilfe der Yates-Kontinuitätskorrektur (py) berichtigt, weil die χ^2 -Werte keine kontinuierliche, sondern nur eine diskrete Verteilung darstellen, also letztlich nur eine Annäherung an die wahre Verteilung wiedergeben können (65). Eine Assoziation wurde dann als statistisch signifikant bewertet, wenn der Wert des Wahrscheinlichkeitsgrades p kleiner als 0,05 und der entsprechende χ^2 -Wert größer als 3,84 war, wobei hier das Bestehen einer

Nullhypothese angezweifelt wurde. Für den Fall, dass die erwarteten Häufigkeiten zu klein waren, also in der Gruppe der Patienten und/oder der Referenzgruppe ein untersuchtes Merkmal weniger als 5 mal auftrat, wurde die statistische Signifikanz mit dem Fisher's Exact Test berechnet (p_F) (65). Zusätzlich musste durch die Bonferroni-Korrektur (65) dann eine zufällige Assoziation durch multiple Vergleiche innerhalb eines HLA-Locus ausgeschlossen werden, wenn die Assoziation eines HLA-Merkmals mit AP bzw. RPP nicht schon aus früheren Studien bekannt war. Die erhaltenen P-Werte wurden hierfür mit der Anzahl der pro Locus untersuchten HLA-Merkmale multipliziert.

Das relative Krankheitsrisikos (RR) wurde berechnet, um eine Aussage zur Stärke der Assoziation zwischen der AP und bestimmten HLA-Merkmalen zu treffen. Dabei wird angegeben, um welches Vielfache größer bzw. kleiner das Risiko für den Träger des entsprechenden Merkmals im Vergleich zum Nichtträger des Merkmals ist. Dazu wurde mit einer Vierfeldertafel das Kreuzprodukt (engl. Odds Ratio) der Quotienten antigenpositiver und -negativer Patienten (a, b) und Kontrollprobanden (c, d) gebildet (253). Für die Fälle mit $a < 5$ oder $b < 5$ wurde eine Modifikation nach Haldane (88) verwendet und mit der Formel $RR = \frac{(2a+1)(2d+1)}{(2b+1)(2c+1)}$ gerechnet. Ein relatives Risiko größer 1 weist auf eine positive, ein relatives Risiko kleiner 1 hingegen auf eine negative Assoziation hin, wobei ein relatives Risiko von 1 einer fehlenden Krankheitsassoziation entspricht.

Tab. 3: Darstellung der untersuchten HLA Merkmale (Nomenklatur 1994). Die serologischen Hauptmerkmale sind jeweils in Klammern angegeben.

HLA-	HLA-	HLA-Cw	HLA-	HLA-
A*01	B*51 (B5) B*18 B*73	Cw*01	DRB1*01	DQB1*05 (DQ1)
A*02	B*52 (B5) B*49 (B21) B*78	Cw*02	DRB1*15 (DR2)	DQB1*06 (DQ1)
A*03	B*07 B*50 (B21)	Cw*03	DRB1*16 (DR2)	DQB1*02
A*23 (A9)	B*08 B*54 (B22) Bw4	Cw*04	DRB1*03 (DR17)	DQB1*03 (DQ7)
A*24 (A9)	B*44 (B12) B*55 (B22) Bw6	Cw*05	DRB1*03 (DR18)	DQB1*03 (DQ8)
A*25 (A10)	B*45 (B12) B*56 (B22)	Cw*06	DRB1*04	DQB1*03 (DQ9)
A*26 (A10)	B*13 B*27	Cw*07	DRB1*11 (DR5)	DQB1*04
A*34 (A10)	B*14 (B64) B*35	Cw*08	DRB1*12 (DR5)	
A*66 (A10)	B*14 (B65) B*37	Cw*blank	DRB1*13 (DR6)	
A*11	B*15 (B62) B*40 (B60)		DRB1*14 (DR6)	
A*29 (A19)	B*15 (B63) B*40 (B61)		DRB1*07	
A*30 (A19)	B*15 (B71) B*41		DRB1*08	
A*31 (A19)	B*15 (B72) B*42		DRB1*09	
A*32 (A19)	B*15 (B75) B*46		DRB1*10	
A*33 (A19)	B*15 (B76) B*47			
A*74 (A19)	B*15 (B77) B*48		DRB3* (DR52)	
A*68 (A28)	B*38 (B16) B*53		DRB4* (DR53)	
A*69 (A28)	B*39 (B16) B*59		DRB5* (DR51)	
A*36	B*57 (B17) B*67		DRBblank*	
A*80	B*58 (B17)			

Das Merkmal HLA-DRBblank* bedeutet, dass keines der HLA-Übermerkmale DRB3* (DR52), DRB3* (DR53) und DRB4* (DR51) nachgewiesen wurde.

4. Ergebnisse

4.1. Patienten und Kontrollgruppen

In den niedergelassenen Zahnarztpraxen Gautsch in Bremen und Wilcken in Burg auf Fehmarn wurden im Zeitraum von Mai 1995 bis März 1999 102 Patienten mit einer Erwachsenenparodontitis ausgewählt, untersucht und nach Blutentnahme im Interdisziplinären HLA-Labor auf ihre HLA-Merkmale getestet. Darunter befanden sich 63 Frauen (61,77%) und 39 Männer (38,23 %) (♀:♂ = 1,6:1. Das Durchschnittsalter (Stichtag 01.01. 1998) betrug