

S. Reichert¹, J. Stein², A. Gautsch², C. Kloß², J. Krüger², A. Schaaf², J. Langner², H.-G. Schaller¹, H. K. G. Machulla²

HLA bei deutschen Patienten mit Rasch Fortschreitender Parodontitis (RPP)*

Erstmalig wurde die Verteilung der HLA-Merkmale A, B, Cw, DR und DQ bei 33 deutschen Patienten mit RPP mit 102 Kontrollen (parodontitisfrei, >38 Jahre) und 157 Gelegenheitsblutspendern (HLA-Normalverteilung) verglichen und dabei neben der serologischen HLA-Typisierungstechnik (MLCT) auch molekularbiologische Verfahren (PCR-SSP) angewandt. Die RPP-Patienten zeigten gegenüber den parodontitisfreien Probanden eine erhöhte Frequenz der HLA-Merkmale A*11, A*29, A*28, B*18, DRB1*13, DRB1*07 und DQB1*02 sowie ein verringertes Vorkommen von HLA-A*02, -A*30+*31, -B*51, -DRB1*04, -DRBblank*, -DQB1*08 und -DQB1*04, wobei nur die Abweichungen von HLA-DQB1*02 und HLA-A*30+31 signifikant waren ($p < 0,05$). Bis auf HLA-A*29 bestanden alle diese Differenzen auch im Vergleich zur Normalpopulation. Hinsichtlich geschlechtsspezifischer Unterschiede waren die HLA-Merkmale DRB1*07, DRB4*53, DQB1*02 bei RPP-Patientinnen signifikant erhöht, HLA-A*02, -DRBblank* und -DQB1*05 aber signifikant verringert ($p < 0,05$). Bezüglich der Frequenz an Homozygoten ergab sich bei den RPP-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen eine erhöhte Frequenz von HLA-DQB1*06 sowie ein verringertes Auftreten von HLA-DQB1*03. Die HLA-Haplotypen [A*32: DRB1*03: DRB3*52], [B*44: Cw*07: DRB1*03: DRB3*52: DQB1*02], [A*28: DRB1*13: DRB3*52: DQB1*06], [B*18: DRB1*13: DRB3*52: DQB1*06], [B*18: DRB1*07: DRB4*53], [B*60: DRB1*07: DRB4*53], [DRB1*11: DRB3*52: DQB1*02], [DRB1*13: DRB3*52: DQB1*07] und [DRB1*07: DRB4*53: DQB1*02] waren bei den RPP-Patienten gegenüber den parodontitisfreien Probanden signifikant häufiger, der Haplotyp [Cw*03: DRB1*04: DRB4*53: DQB1*08] jedoch signifikant seltener ($p < 0,05$). Offenbar scheint eine Konstellation bestimmter HLA-Haplotypen als Teil des genetischen „Backgrounds“ für die RPP von größerer Bedeutung als einzelne HLA-Marker zu sein.

Schlüsselwörter: Parodontitis marginalis, Immunologie, HLA, Lymphozyten

HLA in German patients with rapidly progressive periodontitis (RPP). For the first time we investigated the distribution of HLA class I and II alleles (A, B, Cw, DR, DQ) in a group of 33 German patients with rapidly progressive periodontitis (RPP) as compared to 102 controls without sign of periodontitis (age > 38 years) and 157 blood donors representing the normal distribution of HLA antigens. HLA typing was carried out serologically using the microlymphocytotoxic test (MLCT), additionally specified molecularbiologically using polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP). Compared to the controls, RPP patients had a higher frequency of HLA-A*11, -A*29, -A*28, -B*18, -DRB1*13, -DRB1*07 and -DQB1*02 and a lower frequency of HLA-A*02, -A*30+*31, -B*51, -DRB1*04, -DRBblank*, -DQB1*08 and -DQB1*04. Only the deviations of HLA-DQB1*02 and HLA-A*30+31 were significant ($p < 0,05$). Except for HLA-A*29 the differences also existed in comparison to the normal population. With regard to sex-specific differences HLA-DRB1*07, -DRB4*53, DQB1*02 were significantly increased and HLA-A*02, -DRBblank* and -DQB1*05 significantly decreased in female RPP patients. Compared to the controls HLA-DQB1*06 showed a higher, HLA-DQB1*03 a decreased frequency of homozygosity among patients with RPP ($p < 0,05$). The HLA haplotypes [A*32: DRB1*03: DRB3*52], [B*44: Cw*07: DRB1*03: DRB3*52: DQB1*02], [A*28: DRB1*13: DRB3*52: DQB1*06], [B*18: DRB1*13: DRB3*52: DQB1*06], [B*18: DRB1*07: DRB4*53], [B*60: DRB1*07: DRB4*53], [DRB1*11: DRB3*52: DQB1*02], [DRB1*13: DRB3*52: DQB1*07] and [DRB1*07: DRB4*53: DQB1*02] were significantly more frequent, while the haplotype [Cw*03: DRB1*04: DRB4*53: DQB1*08] was significantly rarer in RPP patients ($p < 0,05$). Obviously special HLA haplotypes are more important for RPP as part of the "genetic background" than individual HLA markers.

Keywords: periodontitis, rapidly progressing; immunology; HLA, lymphocytes

1 Einleitung

Es ist heute unbestritten, dass für die meisten entzündlichen parodontalen Erkrankungen Bakterien verantwortlich sind. Nicht genügend erklärt ist die Tatsache, dass trotz der omnipräsenten bakterieller Ablagerungen auf den Zahnwurzeloberflächen nur wenige Patienten schwere Parodontitiden mit hohem Risiko für einen frühzeitigen Zahnverlust entwickeln.

¹ Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, ZMK, Poliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie (Direktor: Univ.-Prof. Dr. H.-G. Schaller).

² Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Institut für Medizinische Immunologie, Interdisziplinäres HLA-Labor (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. habil. J. Langner)

* Vortrag auf der Jahrestagung der DGP 1999

Dazu zählen insbesondere früh beginnende Parodontitisformen (Präpubertäre Parodontitis [PP], Juvenile Parodontitis [JP], Rasch Fortschreitende Parodontitis [RPP]), bei denen der lokalisierte oder generalisierte schwere Verlust an parodontalem Attachment nicht mit der Menge an mineralisierter supra- und subgingivaler Plaque in Übereinstimmung zu stehen scheint. Untersuchungen zur immunologischen Abwehr wiesen bei einem Teil dieser Patienten eine verminderte Funktion der lokalen oder peripheren zellulären und humoralen Abwehr, aber auch eine überschießende Immunreaktion mit verstärkter Freisetzung von Entzündungsmediatoren nach. Eine überproportionale familiäre Häufung, der bevorzugte Befall des weiblichen Geschlechts und eine erhöhte Prävalenz unter der dunkelhäutigen Bevölkerung deuten auf polymorphe genetische Suszeptibilitätsfaktoren für früh beginnende Parodontitisformen hin. Bei Untersuchung dieser Faktoren wurde auch der Einfluss des Haupthistokompatibilitätskomplexes auf verschiedene Parodontitisformen geprüft, da enge Korrelationen zu bestimmten HLA-Merkmalen für einige andere Erkrankungen (z. B. Diabetes mellitus Typ 1, Spondylitis ankylosans, Narkolepsie) bekannt sind. Dabei ist die Tatsache von Bedeutung, dass eine mögliche Relation zu parodontalen Leitkeimen darin besteht, dass HLA-Antigene die T-lymphozytäre Antigenerkennung beschränken, indem die Antigenpräsentation nur dann gelingt, wenn das Antigenfragment in Form eines Oligopeptids an ein HLA-Molekül einer antigenpräsentierenden Zelle gebunden ist. Mögliche Störungen dieses Mechanismus könnten beispielsweise durch bakterielle Mimikry von HLA-Molekülen hervorgerufen werden. Die RPP ist mit einer Prävalenz von 1–2 % die häufigste Form der frühbeginnenden Parodontitiden und deshalb von besonderem klinischen Interesse. Sie scheint nach verschiedenen Studien mit HLA-A24/A9, -B*15 oder -DR4 [1, 2, 4, 6, 8, 9, 15], parodontal resistent hingegen mit HLA-A10, -A28 und -B5 (B51 + 52) [1, 5] assoziiert zu sein. Die bisher vorliegenden Ergebnisse zur Assoziation RPP – HLA sind aufgrund von unterschiedlichen Kriterien für die Definition des Patientengutes und der Kontrollgruppen sowie verschiedenen HLA-Typisierungstechniken verschieden. Dabei existiert in Deutschland nur eine Untersuchung mit serologischer HLA-Typisierung bei Patienten mit profunder Parodontitis [10] sowie eine Studie zur HLA-DR-Expression auf aktivierten Monozyten bei früh beginnender Parodontitis [17].

Ziel dieser Arbeit war deshalb, bei einer Gruppe deutscher Patienten mit RPP die Verteilung der HLA-Klasse-I- und -II-Merkmale im Vergleich zu einer parodontitisfreien Kontrollgruppe zu untersuchen, wobei HLA-typisierte Gelegenheitsblutspender die Normalverteilung repräsentierten. Durch den Einsatz von molekulargenetischen Methoden sollten die Resultate der serologischen Untersuchung abgesichert, verfeinert und erweitert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und Vergleichsgruppen

33 Patienten mit Rasch Fortschreitender Parodontitis wurden mittels serologischer und molekularbiologischer Typisierungstechniken auf ihre HLA-Merkmale A, B, Cw, DRB und DQB untersucht. Als Vergleichsgruppe wurden 102 Probanden ohne Parodontitis herangezogen, die ebenso einer HLA-Typisierung unterzogen wurden. Des Weiteren diente eine Gruppe von 157 HLA-typisierten Gelegenheitsblutspendern zur Repräsentation der Normalverteilung der HLA-Merkmale. Die Diagnose RPP erfolgte in modifizierter Form

nach den Kriterien von *Tonetti* und *Mombelli* [21]: Erkrankungsbeginn vor dem 35sten Lebensjahr, Attachmentverlust (AL) von 4 mm oder mehr an mindestens acht Zähnen, mindestens drei betroffene Zähne waren keine Molaren oder Inzisivi. Die Bestimmung der Sondertiefe (PD) und des Attachmentverlustes (AL, Schmelz-Zementgrenze als Referenzpunkt) erfolgte in Sechspunktmessung.

Die parodontitisfreien Kontrollprobanden waren älter als 38 Jahre und zeigten bei Sondierung keinen durch Parodontitis hervorgerufenen pathologischen Attachmentverlust oder einen röntgenologisch sichtbaren Knochenabbau.

Die Gruppe der Blutspender diente ausschließlich zur Repräsentation der HLA-Merkmale innerhalb der Normalpopulation und wurde auf das Vorliegen von parodontalen Erkrankungen nicht untersucht. Sowohl alle untersuchten Patienten, Kontrollprobanden und Blutspender waren frei von Autoimmunerkrankungen, Infektionserkrankungen des Immunsystems sowie immunsuppressiver Therapie. Sie stammten aus Deutschland und gehörten der kaukasischen Rasse an.

2.2 Serologische HLA-Typisierung

Zur HLA-Typisierung wurden aus der Vena cubiti eines jeden Probanden ca. 20 ml Blut entnommen und mit gerinnungshemmenden Natriumzitrat versetzt. Die serologische Bestimmung der HLA-Antigene erfolgte auf der Basis des Mikrolymphozytotoxizitätstests (MLCT) nach *Terasaki* und *McClelland* [19], standardisiert nach dem National Institute of Health (NIH). Das Prinzip besteht in der Inkubation von peripheren Blutlymphozyten (PBL) mit Testseren in Gegenwart von Komplement. Diese Testseren enthalten Antikörper, die darauf selektiert wurden, bestimmte HLA-Merkmale erkennen und binden zu können. Durch die Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes an der Zelloberfläche wird Komplement aktiviert, was zur Perforation der Zellmembran und damit zur Lyse der Zelle führt (zytotoxische Reaktion). Der anschließend zugegebene Farbstoff dringt in die zer-

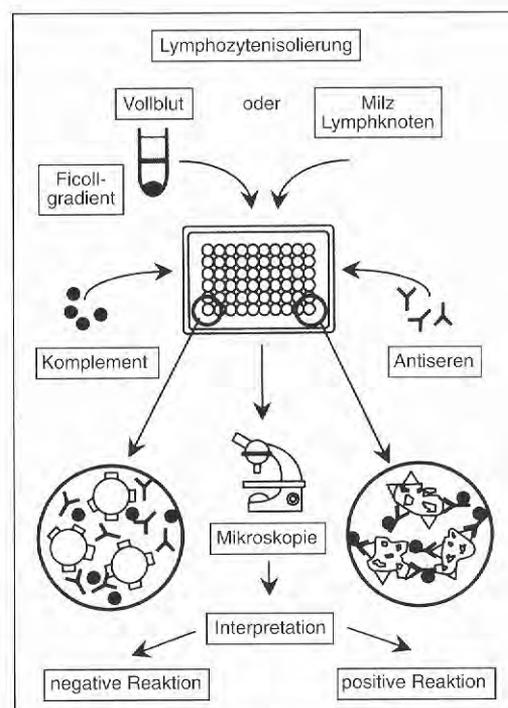


Abb. 1 Mikrolymphozytotoxizitätstest. Umzeichnung aus Waßmuth [22]

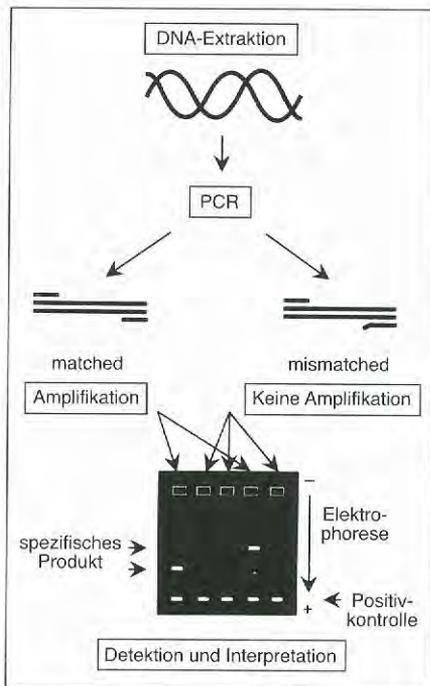


Abb. 2 PCR-SSP. Umzeichnung aus Waßmuth [22]

störte 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, der Farbstoff kann nicht in die Zelle eindringen (negative Reaktion) (Abb. 1). Für die HLA-Klasse-II-Typisierung war mittels einer biomagnetischen Separationstechnik unter Nutzung von immunmagnetischen Beads (Dynabeads, Fa. Deutsche Dynal, Hamburg) eine vorausgehende Anreicherung der HLA-Klasse-II-positiven B-Lymphozyten erforderlich. Die Präparation der PBL erfolgte über eine Dichtegradientenzentrifugation nach dem Prinzip von Böyum [3]. Die Lymphozytensuspension wurde daraufhin in die Kavitäten kommerzieller Typisierungskammern (Fa. Biotest, Dreieich, Fa. BAG, Lich, Fa. One Lambda, Krefeld), die 144 bzw. 60 Testantiseren verschiedener Spezifitäten enthielten, pipettiert und für ca. 30 min inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von Kaninchenkomplement und eine weitere Inkubation von ca. 60 min. Anschließend wurden die Zellen mit Ethidiumbromid-Acridinorange-Lösung gefärbt. Die Ablesung der Testergebnisse erfolgte am Umkehr-Fluoreszenzmikroskop.

2.3 Molekularbiologische HLA-Typisierung

Zur Absicherung und Präzisierung der serologischen Typisierungsergebnisse wurden die HLA-Merkmale auf DNA-Ebene mittels Polymerasekettenreaktion mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP) bestimmt. Dabei werden HLA-Merkmale über die Bildung sequenzspezifischer PCR-Produkte differenziert, wobei eine Amplifikationsreaktion nur bei Komplementarität zwischen dem 3'-Ende des Primers

und der Zielsequenz abläuft [14] (Abb. 2). Ausgehend von ca. 10 ml Zitratblut wurde die DNA entsprechend der Auszalmethode nach Miller [11] präpariert. Die Amplifikation erfolgte unter Einsatz kommerzieller Primer-Testkits (Fa. Dynal, Hamburg, Fa. BAG, Lich, Fa. One Lambda, Krefeld). Pro Reaktionsansatz wurde ein Mastermix, bestehend aus der PCR-Lösung mit Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), der Proben-DNA und einer DNA-Polymerase (Ampli Taq, Fa. AGS, Heidelberg), mit einem Primermix, der spezifische Primerpaare enthielt, in einem programmierten Thermocycler (Fa. Perkin Elmer, Weiterstadt) inkubiert. Nach Durchlauf mehrerer Zyklen aus Denaturierung bei 94°C, Primeranlagerung bei 65°C und Polymerisation bei 72°C wurden die PCR-Produkte mittels horizontaler Agarosegelelektrophorese nachgewiesen.

2.4 Statistische Auswertung

Zum Vergleich der Ergebnisse der HLA-Typisierung der RPP-Patienten mit der Kontrollgruppe bzw. den Blutspendern wurden jeweils die Häufigkeiten (n) der untersuchten HLA-Merkmale gezählt und prozentual (Phänotypfrequenz, pf) wiedergegeben. Der statistische Vergleich der einzelnen Häufigkeiten unter den Patienten und Kontrollprobanden erfolgte über den Chi²-Heterogenitätstest mit Yates-Korrektur. Trat ein Merkmal innerhalb einer Gruppe weniger als 5-mal auf, so wurde die statistische Signifikanz mit Hilfe des Exakt-Testes nach Fisher berechnet. Soweit die Assoziation eines HLA-Merkmals mit RPP nicht aus früheren Studien bekannt war, wurde mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur eine zufällige Assoziation durch multiple Vergleiche innerhalb eines HLA-Locus ausgeschlossen.

3 Ergebnisse

3.1 Gesamte RPP-Gruppe und Kontrollen

Für die RPP-Gruppe und parodontisfreien Kontrollpersonen wurden die Mittelwerte für Alter, Sondiertiefe und Attachmentverlust bestimmt sowie die Geschlechterverteilung ermittelt (Tab. 1). Im Vergleich der Häufigkeiten der HLA-Antigene unter den RPP-Patienten und den parodontisfreien Probanden zeigten die Patienten eine erhöhte Frequenz der HLA-Merkmale A*11, A*29, A*28, B*18, DRB1*13, DRB1*07 und DQB1*02 sowie eine verringerte Frequenz von A*02, A*30+*31, B*51, DRB1*04, DRBblank*, DQB1*08 und DQB1*04. Dabei war die positive Assoziation zu HLA-DQB1*02 und die negative Assoziation zu HLA-A*30+*31 nach Yates-Korrektur bzw. Fishers Exakt-Test statistisch signifikant (Tab. 2). Bis auf HLA-A*29 bestanden für die RPP-Patienten die Frequenzunterschiede nicht nur im Vergleich zu den Kontrollen, sondern auch im Vergleich zur Gruppe der zahnärztlich nicht untersuchten Blutspender. Für HLA-A*29 ergab sich ein Unterschied ausschließlich gegenüber der Gruppe der parodontisfreien Probanden, jedoch nicht im Vergleich zur Normalpopulation.

Tabelle 1 Patienten und Kontrollen mit Geschlechtsverteilung (m:w) und Mittelwerten von Alter, Sondiertiefen (PD) und Attachmentverlust (AL)

Gruppen	n	Alter	Männer	Frauen	m : w	PD (mm)	AL (mm)
RPP	33	34	14	19	1 : 1,4	6,0	7,2
Kontrollen	102	59	62	40	1 : 1,6	1,8	3,4

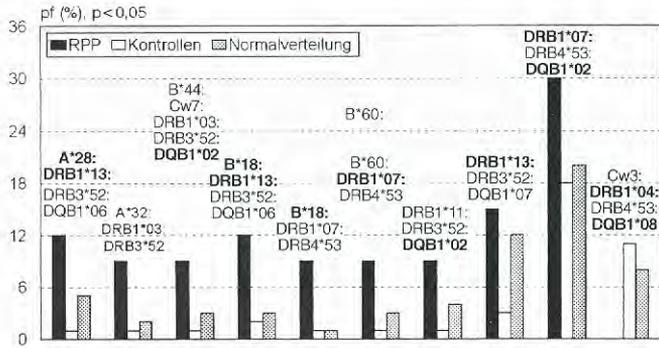


Abb. 3 Häufigkeit der HLA-Haplotypen bei RPP-Patienten im Vergleich zu parodontitisfreien Kontrollen und der Normalverteilung (assoziierte Einzelmerkmale durch Fettdruck hervorgehoben)

3.2 Geschlechtsunterschiede

Unter den genannten Unterschieden in den HLA-Phänotypfrequenzen konnte das erhöhte Vorkommen von HLA-A*28 (nicht signifikant) sowie das verringerte Auftreten von HLA-A*02 ($p_Y = 0,035$ signifikant) und -DRBblank* ($p_F = 0,032$ signifikant) gegenüber den parodontitisfreien Probanden allein dem weiblichen Geschlecht zugeordnet werden (Tab. 3), während die Männer beider Gruppen bei diesen HLA-Merkmalen keine Auffälligkeiten aufwiesen. Die weiteren aufgeführten Frequenzunterschiede zeigten gleiche Tendenzen unter Männern und Frauen, wobei die bei den RPP-Patienten gefundenen relativen Erhöhungen von HLA-DRB1*07 und -DQB1*02 bei alleiniger Betrachtung von RPP-Frauen signifikant waren ($P_Y < 0,05$). Unter den HLA-Merkmalen mit unauffälliger Frequenz bei Zusammenfassung aller RPP-Patienten zeigten zwei geschlechtsspezifische Unterschiede. HLA-DRB4*53 war unter weiblichen Patienten gegenüber

Kontrollprobandinnen signifikant häufiger ($P_Y < 0,05$) und HLA-DQB1*05 signifikant seltener ($P_F < 0,05$) (Tab. 3).

3.3 Homozygotien

Neben der Verteilung der HLA-Phänotypfrequenzen wurde die Häufigkeit homozygot auftretender Merkmale in den einzelnen Gruppen überprüft. Ein HLA-Merkmal wurde dann als homozygot bewertet, wenn innerhalb einer HLA-Region kein zweites Merkmal nachgewiesen werden konnte. Unter den RPP-Patienten zeigte das Merkmal HLA-DQB1*06 eine höhere Homozygotenfrequenz als unter den parodontitisfreien Probanden (4/33, 12 % vs. 5/102, 4,9 %), während eine Homozygotie für HLA-DQB1*03 unter den Patienten seltener als unter den Kontrollen auftrat (1/33, 3 % vs. 13/102, 13 %). Diese Frequenzunterschiede waren jedoch nicht signifikant (Tab. 2).

3.3 Kombinationen von HLA-Merkmalen

HLA-Merkmale werden häufig in Kopplung mit den HLA-Merkmalen der benachbarten Genorte als sogenannte Haplotypen vererbt. Zur Überprüfung des bevorzugten Auftretens bestimmter Kombinationen von HLA-Merkmalen wurden alle untersuchten HLA-Merkmale hinsichtlich ihrer Kopplung mit HLA-Merkmalen anderer Genregionen untersucht. Diese Kombinationen wurden dabei als wahrscheinliche Haplotypen aufgefasst. Im Vergleich der RPP-Patienten mit parodontitisfreien Probanden konnten 9 Haplotypen mit signifikant positiver und ein Haplotyp mit signifikant negativer Assoziation ($P_F < 0,05$) ermittelt werden (Abb. 3). Die genannten Frequenzunterschiede der postulierten Haplotypen bestanden auch im Vergleich zu den Blutspendern. Keiner von den beschriebenen Frequenzunterschieden der einzelnen HLA-Merkmale, der Homozygotien und der

Tabelle 2 Molekulargenetisch bestimmte Frequenzen der häufiger (\uparrow) bzw. seltener (\downarrow) unter Patienten mit RPP auftretenden HLA-Merkmale. Die Pfeile verdeutlichen die Abweichung der Frequenzen innerhalb der jeweiligen Gruppe von der Normalpopulation; pf = Phänotypenfrequenz, $P_c = p$ Yates oder Fisher

HLA-	RPP n	(n = 33) pf (%)	Resistente n	(n = 102) pf (%)	Chi ²	P _c
A*02	11	33,33 \downarrow	52	50,98	3,120	> 0,05
A*11	5	15,15 \uparrow	6	5,88	2,862	> 0,05
A*29	2	6,06	1	0,98 \downarrow	2,962	> 0,05
A*30 + A*31	0	0,00 \downarrow	12	11,76 \uparrow	4,261	0,029
A*28	6	18,18 \uparrow	10	9,80	1,675	> 0,05
B*51	1	3,03 \downarrow	12	11,76	2,186	> 0,05
B*18	6	18,18 \uparrow	7	6,86	3,671	> 0,05
DRB1*04	4	12,12 \downarrow	24	23,53 \uparrow	1,974	> 0,05
DRB1*13	12	36,36 \uparrow	21	20,59 \downarrow	3,360	> 0,05
DRB1*07	13	39,39 \uparrow	24	23,53 \downarrow	3,154	> 0,05
DRBblank*	6	18,18 \downarrow	35	34,31 \uparrow	3,068	> 0,05
DQB1*02	17	51,52 \uparrow	32	31,37 \downarrow	4,375	0,041
DQB1*08	2	6,06 \downarrow	20	19,61 \uparrow	3,355	> 0,05
DQB1*04	1	3,03 \downarrow	9	8,82	1,220	> 0,05
DQB1*06,06	4	12,12 \uparrow	5	4,90 \downarrow	2,088	> 0,05
DQB1*03,03	1	3,03 \downarrow	13	12,75 \uparrow	2,532	> 0,05

Tabelle 3 Molekulargenetisch bestimmte Frequenzunterschiede bei RPP-Patientinnen. Die Pfeile verdeutlichen die Abweichung der Frequenzen innerhalb der jeweiligen Gruppe von der Normalpopulation

HLA-	RPP n	(n = 19) pf (%)	Kontrollen n	(n = 62) pf (%)	P _c
A*02	6	32 ↓	37	60 ↑	0,035
A*28	4	21 ↑	4	6 ↓	>0,05
DRB1*07	11	58 ↑	14	23 ↓	0,005
DRB4*53	14	74 ↑	29	47 ↓	0,004
DRBblank*	3	16 ↓	26	42 ↑	0,032
DQB1*02	10	53 ↑	17	27 ↓	<0,05
DQB1*05	3	16 ↓	27	44 ↑	0,024

„Haplotypen“ war nach Anwendung der Bonferroni-Korrektur im multiplen Vergleich statistisch signifikant.

4 Diskussion

Im Unterschied zu den meisten bisherigen Studien über HLA-Assoziationen zu parodontalen Erkrankungen wurden die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten mit RPP sowohl einer parodontisfreien Kontrollgruppe als auch einer Gruppe von zahnärztlich nicht untersuchten Blutspendern (Normalpopulation) gegenübergestellt. Durch die Selektion von Probanden ohne Parodontitis als eigentliche Referenzgruppe konnte ein besserer Kontrast zwischen Patienten und „Kontrollen“ erzielt werden. Dabei wurde das Mindestalter der Kontrollprobanden mit >38 Jahren so gewählt, dass ausgeschlossen werden konnte, dass diese eine RPP zu einem späteren Zeitpunkt entwickeln können. RPP- und parodontisfreie Kontrollgruppe zeigten eine vergleichbare Geschlechterverteilung mit jeweils höherem Anteil von Frauen. Die Werte für Sondiertiefen und Attachmentverlust deuten in der RPP-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen auf die Schwere des Krankheitsbildes schon bei jungen Erwachsenen hin, wobei der Erkrankungsbeginn nach anamnestischen Angaben Monate bis Jahre vor dem Untersuchungszeitpunkt liegen kann. Die Frequenzen der HLA-Merkmale in der Gruppe der Blutspender entsprachen denen von bereits publizierten Normalverteilungen. Auf einen direkten Vergleich zwischen der Gruppe mit RPP und der Normalpopulation für eine Aussage über das Erkrankungsrisiko wurde verzichtet, da die Normalpopulation eine inhomogene Gruppe darstellte, deren Probanden nicht als parodontal gesund bezeichnet werden konnten. Sie diente vielmehr der Aussage, ob ein Merkmal eine Abweichung innerhalb der Patientengruppe, der Kontrollgruppe oder innerhalb beider Gruppen aufweist. Unter Berücksichtigung der Häufigkeiten der Merkmale in der Normalpopulation wiesen die RPP-Patienten, bis auf HLA-A*29, die gefundenen Frequenzunterschiede sowohl gegenüber der Kontrollgruppe als auch gegenüber der Normalpopulation auf. Offensichtlich ist mit vermehrt vorkommenden HLA-Merkmalen (A*11, A*28, B*18, DRB1*13, DRB1*07, DQB1*02) ein erhöhtes bzw. mit verringertem Vorkommen (A*02, A*30+*31, B*51, DRB1*04, DRBblank*, DQB1*08, DQB1*04) ein vermindertes Risiko für RPP verbunden. Für die Träger des Merkmals HLA-A*29 besteht hingegen kein erhöhtes oder verringertes Risiko für eine RPP. In unserer Untersuchung stimmt das vermehrte Vorkommen von HLA-A28 und -DR7 und die verringerte Frequenz von HLA-A2 und -B51 bei RPP-Patienten mit den Ergebnissen anderer Autoren [4, 5, 7, 12, 15, 20] überein. Dagegen konnten die aus früheren Studien bekannten positiven Assoziatio-

nen von HLA-A9, -B*15 [15, 16] oder -DR4 [2, 4, 8, 16] zur RPP nicht bestätigt werden. Vielmehr lag für HLA-A9 und -DR4 eine Tendenz zum selteneren Auftreten vor. *Ohyama et al.* [13] beschrieben übereinstimmend mit dieser Studie an 24 Patienten mit früh beginnender Parodontitis (EOP) ebenfalls eine verringerte Frequenz von HLA-DR4. Nach *Klouda et al.* [9] existieren für HLA-DR-Antigene keine Assoziationen mit RPP. Als Resistenzmerkmal für RPP wurde mit signifikant verringerter Frequenz HLA-A*30+*31 ermittelt, nicht aber, wie von anderen Autoren angegeben, HLA-A*10 [1] oder -A*28 [5]. Die von uns beobachtete signifikant positive Assoziation von HLA-DQB1*02 zur RPP sowie die erhöhten Antigenfrequenzen von HLA-A*11, -B*18 und -DRB1*13 unter RPP-Patienten wurden bisher nicht beschrieben. Erklärbar durch die relativ geringe Patientenzahl blieben die Abweichungen der HLA-Merkmale nach Bonferronikorrektur nicht signifikant.

Die erwähnten unterschiedlichen HLA-Frequenzen bei Patienten oder Patientinnen könnten auf Geschlechtsunterschiede in der HLA-Assoziation zur RPP hindeuten, die bisher in der Literatur für Parodontitis noch nicht beschrieben worden, jedoch für andere Erkrankungen (z. B. Psoriasis, Rheumatoid-Arthritis) bekannt sind. Bei den bisher für RPP-Patienten nicht durchgeführten Homozygotenuntersuchungen konnte festgestellt werden, dass eine Homozygotie von HLA-DQB1*06 mit einem erhöhten relativen Erkrankungsrisiko verbunden ist, während das homozygote Auftreten von HLA-DQB1*03 das relative Risiko minderte. Geschlechtsspezifische Assoziationen zu Homozygotien bestanden vor allem im Bereich der HLA-DQ-Merkmale, wobei mit Homozygotien im Bereich von HLA-DQ für Männer ein protektiver Effekt, für Frauen dagegen eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber RPP vorzuliegen scheint. *Ohyama et al.* [13] sowie *Takashiba et al.* [18] stellten in der HLA-DQB1-Region von Patienten mit frühbeginnender Parodontitis eine atypische Restriktionsstelle fest und postulierten eine primäre Beteiligung der Gene der HLA-Klasse-II-Region, insbesondere HLA-DQB1, an der Manifestation dieser Parodontitiden.

Kopplungsanalysen, in Verbindung mit HLA-Assoziation bei Parodontitis, wurden bisher nicht veröffentlicht. Für andere Erkrankungen (z. B. Diabetes mellitus, Psoriasis, Rheumatoid-Arthritis) sind jedoch Assoziationen zu HLA-Haplotypen bekannt. Möglicherweise sind die vorliegenden Ergebnisse ein Hinweis dafür, dass eine Assoziation nicht nur auf HLA-Einzelmerkmale beschränkt sein könnte, sondern auf Kombinationen von bestimmten HLA-Merkmalen bzw. deren gemeinsames Auftreten in einem Haplotyp beruht. Die dargelegten Resultate deuten auf einen ätiologischen Einfluss des HLA-Systems bei RPP hin. Der Haupthisto-

kompatibilitätskomplex selbst oder daran eng gekoppelte Gene könnten die Krankheits susceptibility beeinflussen, jedoch nicht vollständig determinieren, d. h., sie bilden einen Teil des genetischen Hintergrunds. In Hinblick auf die fehlende Einheitlichkeit der Ergebnisse der Studien über HLA bei RPP bzw. Parodontitis erscheint eine Früherkennung der RPP bzw. anderer Parodontitisformen mit der Bestimmung von HLA-Antigenen als Suszeptibilitäts- oder Resistenzmarker daher derzeit wenig sinnvoll. Dennoch sind krankheitsspezifische Effekte aufgrund der angeführten HLA-Assoziationen zur differentialdiagnostischen Beurteilung aggressiver Parodontalerkrankungen in Betracht zu ziehen.

Literatur

1. Amer A., Singh G., Darke C., Dolby A. E.: Association between HLA antigens and periodontal disease. *Tissue Antigens* 31, 53 (1988).
2. Bonfil J. J., Dillier F. L., Mercier P., Reviron D., Foti B., Sambuc R., Brodeur J. M., Sedarat C.: A "case control" study on the role of HLA DR4 in severe periodontitis and rapidly progressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 26, 77 (1999).
3. Böyum A.: A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 21, 77 (1968).
4. 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* 23, 563 (1996).
5. Goteiner D., Goldman M. J.: Human lymphocyte antigen haplotype and resistance to periodontitis. *J Periodontol* 55, 155 (1984).
6. Izumi Y., Nitta H., Ishikawa I., Baehni P.: Association between HLA system and periodontal diseases. *J Parodontol* 9, 145 (1990).
7. Kaslick R. S., West T. L., Chasens A. I., Terasaki P. I., Lazzara R., Weinberg S.: Association between HLA-A2 antigen and various periodontal diseases in young adults. *J Dent Res* 54, 424 (1975).
8. Katz J., Goultschin J., Benoiel R., Brautbar C.: Human leukocyte antigen (HLA) DR4. Positive association with rapidly progressing periodontitis. *J Periodontol* 58, 607 (1987).
9. Klouda P. T., Porter S. R., Scully C., Corbin S. A., Bradley B. A., Smith R., Davies R. M.: Association between HLA-A9 and rapidly progressive periodontitis. *Tissue Antigens* 28, 146 (1986).
10. Marggraf E., von Keyserlingk-Eberius H. J., Komischke B., Wöhlert N.: Die Assoziation von Histokompatibilitätsantigenen (HLA-Antigene) mit profunden Parodontopathien. *Dtsch Zahnärztl Z* 38, 585 (1983).
11. Miller S. A., Dykes D. D., Polesky H. F.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16, 1215 (1988).
12. Moses J. H., Tsichti P., Donaldson P., Smith P. B., Johnson N. W., Bodmer J. G.: HLA and susceptibility to juvenile periodontitis in Afro-Caribbeans. *Tissue Antigens* 43, 316 (1994).
13. 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* 67, 888 (1996).
14. 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* 39, 225 (1992).
15. Reinholdt J., Bay I., Sveigaard A.: Association between HLA-antigens and periodontal disease. *J Dent Res* 56, 1261 (1977).
16. Shapira L., Eizenberg S., Sela M. N., 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* 65, 219 (1994).
17. Siegusch B., Klinger G., Glockmann E., Simon, H. U.: Early-onset and adult Periodontitis associated with abnormal cytokine production by activated T lymphocytes. *J Periodontol* 69, 1098 (1998).
18. 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* 65, 379 (1994).
19. Terasaki P. I., McClelland J. D.: Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 204, 998 (1964).
20. Terasaki P. I., Kaslick R. S., West T. L., Chasens A. I.: Low HL-A2 frequency and periodontitis. *Tissue Antigens* 5, 286 (1975).
21. Tonetti, M. S., Mombelli, A.: Early onset periodontitis. In: Lindhe, J. (Editor): *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 3. Aufl. Munksgaard, Kopenhagen 1998, S. 226.
22. Waßmuth R.: Einführung in das HLA-System. Ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg 1995.

Manuskripteingang: 1. 11. 1999
 Manuskript angenommen: 24. 12. 1999

Korrespondenzadresse:
 OA Dr. S. Reichert
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 ZMK, Poliklinik für Zahnerhaltung/Parodontologie
 Große Steinstr. 19, D-06097 Halle
 E-Mail: stefan.reichert@medizin.uni-halle.de

(P 12)