

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

**Untersuchung von Assoziationen der
Mikrosatellitenpolymorphismen MICA-TM, MICB-
C1_2_A und C1_4_1 mit der chronischen Parodontitis**

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

vorgelegt von
Martin Henninger

aus
München

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Matthias Folwaczny
Mitberichtersteller:	Priv. Doz. Dr. Wolfgang Fischer Prof. Dr. Hans-Gustav Klobeck
Mitbetreuung durch den Promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Jürgen Glas
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	01.12.2011

Teile dieser Dissertation wurden publiziert:

Glas J, Maier K, Wetzke M, Henninger M, Weiss EH, Folwaczny M (2008) MICA*055: a new allele with eight GCT repeats in the exon 5 microsatellite. *Tissue Antigens* 72:410-411

Folwaczny M, Henninger M, Glas J (2011) Impact of MICA-TM, MICB-C1_2_A and C1_4_1 microsatellite polymorphisms on the susceptibility to chronic periodontitis in Germany. *Tissue Antigens* 77(4):298-304

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	9
1.1 Entzündliche Parodontopathien.....	9
1.1.1 Klassifikation der Parodontitiden.....	9
1.1.2 Krankheiten mit parodontalem Befall.....	10
1.1.3 Epidemiologische Daten.....	10
1.1.4 Krankheitsbild der chronischen marginalen Parodontitis und Therapie.....	11
1.1.5 Risikofaktoren der Parodontitis.....	14
1.1.6 Das „critical pathway“ Modell.....	15
1.1.7 Bakterieller Biofilm als pathogenetischer Faktor.....	18
1.1.8 Virulenzfaktoren der parodontopathogenen Bakterien.....	19
1.1.9 Mögliche genetische Faktoren für die chronische marginale Parodontitis.....	20
1.2 Histokompatibilitäts-Komplex (MHC).....	21
1.2.1 Funktion des MHC.....	21
1.2.2 Genetische Struktur der MHC-Region.....	21
1.2.3 MHC I-Komplex.....	22
1.2.3.1 Funktion des MHC I.....	22
1.2.3.2 Struktur und Bildung des Histokompatibilitäts-Komplexes.....	23
1.2.3.3 Peptidbindung und T-Zell Wirkung.....	24
1.2.3.4 Genetik und Klassifikation der MHC Klasse I-Region.....	26
1.2.3.5 Haplotypen im MHC-Komplex.....	26
1.2.4 MHC I chain-related Gene (MIC).....	27
1.2.4.1 Einteilung und Funktion der MIC-Gene.....	27
1.2.4.2 Strukturen der MIC-Moleküle.....	28
1.2.4.3 Rolle des NKG2D-Rezeptors als Ligand für NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen.....	29
1.2.4.4 Genetische Struktur und Besonderheiten von MICA und MICB.....	30
1.2.4.5 Kopplungsungleichgewichte mit den MIC-Genen.....	31
1.2.4.6 Assoziationen zwischen MICA und MICB mit unterschiedlichen Erkrankungen.....	32
1.3 Untersuchte Mikrosatelliten.....	33
1.3.1 MICA-TM.....	33
1.3.2 MICB-C1_2_A.....	34
1.3.3 C1_4_1.....	34

2. Ziele der Studie	35
3. Material	36
3.1 Studienpopulation.....	36
3.1.1 Patientenkollektiv.....	36
3.1.2 Kontrollkollektiv.....	37
3.2 Kits und Chemikalien.....	38
3.2.1 Materialien für DNA-Isolierung.....	38
3.2.2 Materialien für die Polymerasekettenreaktion und für die Reinigung der PCR-Produkte.....	39
3.2.3 Materialien für die Agarosegelelektrophorese.....	39
3.3 Zelllinien und Goldstandards für die Fragmentanalyse.....	39
3.4 PCR-Primer.....	40
3.4.1 Primer für die Fragmentanalyse.....	40
3.4.1.1 MICA-TM-Primer.....	40
3.4.1.2 MICB-C1_2_A-Primer.....	40
3.4.1.3 C1_4_1-Primer.....	41
3.4.2 Primer für die Sequenzierung.....	41
3.4.2.1 MICA-TM-Primer.....	41
3.4.2.2 MICB-C1_2_A-Primer.....	41
3.4.2.3 C1_4_1-Primer.....	41
3.5 Geräte.....	42
4. Methoden	43
4.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	43
4.1.1 Isolierung der DNA.....	43
4.1.1.1 DNA-Isolierung mittels QIAamp® DNA Blood Mini Kits.....	43
4.1.1.2 DNA-Isolierung mittels Aussalzmethode (Miller et al., 1988).....	44
4.1.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	45
4.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	46
4.1.3 Agarosegelelektrophorese.....	48
4.1.4 Reinigung der PCR-Produkte.....	49
4.1.5 Fragmentanalyse durch denaturierte Polyacrylamidgelelektrophorese.....	50
4.2 Statistische Auswertung.....	52

4.2.1	Voraussetzungen für die statistische Auswertung.....	53
4.2.2	Chi-Quadrat (χ^2)-Test.....	53
4.2.3	Allelfrequenzberechnung	54
4.2.4	Zwei-Punkt-Haplotypen und Kopplungsungleichgewichte	54
5.	Ergebnisse	56
5.1	Neu identifiziertes Allel MICA* 055.....	56
5.2	Genotypen und Allelfrequenzen der untersuchten Mikrosatelliten.....	56
5.2.1	Allelfrequenzen von MICA-TM	56
5.2.1.1	Allelfrequenzen von MICA-TM unterteilt nach Geschlecht.....	57
5.2.1.2	Allelfrequenzen von MICA-TM unterteilt nach Nikotinkonsum	57
5.2.2	Allelfrequenzen von MICB-C1_2_A	58
5.2.2.1	Allelfrequenzen von MICB-C1_2_A unterteilt nach Geschlecht	58
5.2.2.2	Allelfrequenzen von MICB-C1_2_A unterteilt nach Nikotinkonsum	59
5.2.3	Allelfrequenzen von C1_4_1	59
5.2.3.1	Allelfrequenzen von C1_4_1 unterteilt nach Geschlecht.....	60
5.2.3.2	Allelfrequenzen von C1_4_1 unterteilt nach Nikotinkonsum.....	60
5.3	Zwei-Punkt-Haplotypen und Kopplungsungleichgewichte	60
6.	Diskussion	62
6.1	Studiendesign und Methoden	62
6.1.1	Pathogenese der chronischen marginalen Parodontitis	62
6.1.2	Studiendesign bei genetischen Assoziationsstudien	62
6.1.3	Auswahl der Probanden	63
6.2	Validität der erhobenen Ergebnisse.....	65
6.2.1	Fragmentanalyse und Sequenzierung von MICA-TM	66
6.2.2	Fragmentanalyse und Sequenzierung von MICB-C1_2_A.....	67
6.2.3	Fragmentanalyse und Sequenzierung von C1_4_1	67
6.3	Bewertung der Ergebnisse aus genetischer Sicht.....	68
6.3.1	Vergleich der Ergebnisse des Mikrosatelliten MICA-TM mit Daten aus der Literatur..	68
6.3.2	Vergleich der Ergebnisse des Mikrosatelliten MICB-C1_2_A mit Daten aus der Literatur	71
6.3.3	Vergleich der Ergebnisse des Mikrosatelliten C1_4_1 mit Daten aus der Literatur.....	72

6.3.4 Vergleich der Zwei-Punkt-Haplotypen und der Kopplungsungleichgewichte mit Daten aus der Literatur	73
6.4 Bewertung der erhobenen Daten aus funktioneller Sicht.....	75
6.5 Schlussfolgerung	77
7. Zusammenfassung.....	78
8. Literaturverzeichnis.....	79
9. Anhang	89
Danksagung.....	98

1. Einleitung

1.1 Entzündliche Parodontopathien

Unter dem Begriff Parodontopathien werden Erkrankungen der Gingiva und des Zahnhalteapparats zusammengefasst. Zu unterscheiden sind sie von der Gingivitis, bei der sich die Entzündung ausschließlich auf das Zahnfleisch beschränkt. Dagegen ist bei den Parodontopathien der Zahnhalteapparat immer mit betroffen, dies kann bei Fortschreiten der Erkrankung bis zum Verlust des Zahns führen. Die Diagnose erfolgt klinisch; zusätzlich werden auch laborchemische und mikrobiologische Verfahren eingesetzt. Der Verlust der Knochensubstanz wird radiologisch erfasst (Armitage, 2004; Hellwig et al., 2003).

1.1.1 Klassifikation der Parodontitiden

Beim internationalen Workshop zur Klassifizierung von parodontalen Erkrankungen im Jahr 1999 wurde eine Einteilung in über 40 gingivale Erkrankungen vorgenommen (Armitage, 1999). Geringe Unterschiede und fließende Übergänge zwischen den klinischen Bildern machen eine eindeutige Diagnose und Klassifizierung der Parodontitiden allerdings oft schwierig. Nachfolgend sollen nur kurz die wichtigsten parodontalen Krankheitsbilder beschrieben werden.

Die chronische Parodontitis ist die häufigste Form der Parodontitiden. Auf sie wird in dieser Arbeit noch näher eingegangen.

Die aggressive Parodontitis ist gekennzeichnet durch eine schwere parodontale Destruktion mit raschem Attachmentverlust. Es kann innerhalb von wenigen Jahren zur vollständigen Destruktion des Zahnhalteapparats kommen, welche den Verlust der betroffenen Zähne zur Folge haben kann. Unterschieden wird zwischen der lokalen und der generalisierten aggressiven Parodontitis. Die lokale Form beginnt in der Pubertät und geht meist vom ersten Molaren aus. Die generalisierte Form beginnt vor dem 35. Lebensjahr. Sie kann aus einer lokalen aggressiven Parodontitis entstehen. Allerdings sind hier mindestens drei Zähne betroffen, die nicht den ersten Molaren oder den Inzisivi entsprechen (Hellwig et al., 2003).

1.1.2 Krankheiten mit parodontalem Befall

Zahlreiche systemische Erkrankungen stehen in engem Zusammenhang mit dem Auftreten von parodontalen Veränderungen. Einige Erkrankungen, wie Lichen planus, Herpes simplex-Infektionen oder das bullöse Pemphigoid, betreffen vor allem die Gingiva. Andere Erkrankungen können auch den parodontalen Zahnhalteapparat befallen. Bei Leukämien, bei der Wegener'schen Granulomatose, bei der Tuberkulose, bei ausgedehntem Pilzbefall und bei der Langerhanszell-Erkrankung wurden solche Phänomene beobachtet. Das Parodontium kann auch Manifestationsort für Metastasen sein. In diesem Zusammenhang sollten das Mamma-Karzinom und das Lungen-Karzinom genannt werden. Bei Kindern metastasieren das Neuroblastom und das Osteosarkom häufig in den Kiefer. Im Allgemeinen ist die Manifestation systemischer Erkrankungen in Form einer Parodontitis jedoch selten (Jordan, 2004).

Die nekrotisierende ulzerative Gingivitis beginnt mit einer schmerzhaften Entzündung der interdentalen Gingiva. Es kommt zu Nekrosen und zu Ulzerationen (Hellwig et al., 2003).

1.1.3 Epidemiologische Daten

Parodontale Erkrankungen kommen weltweit sehr häufig vor. Dabei ist zu beachten, dass es große Unterschiede in den Daten epidemiologischer Studien gibt, abhängig von der jeweiligen Definition parodontaler Erkrankungen. Albandar veröffentlichte 1999 hierzu eine große Untersuchung aus den USA, die zu dem Ergebnis kam, dass ca. 35% der Bevölkerung dieses Landes von einer Parodontitis betroffen sind, dabei etwa 22% von einer milden Form und etwa 13% von einer mittelschweren bis schweren Form. Die Einteilung wurde hier anhand der Sondiertiefe der marginalen Gingiva mit der WHO-Sonde und der Anzahl der befallenen Zähne getroffen. Die milde Parodontitis war durch den Befall von mindestens einem Zahn mit einer Sondiertiefe von mindestens 3 mm gekennzeichnet. Ab einer Sondiertiefe von 5 mm oder dem Befall von 2 Zähnen mit einer Sondiertiefe von jeweils mindestens 4 mm sprach man von einer mittelschweren Parodontitis. Man kam außerdem zu dem Ergebnis, dass die Prävalenz der Parodontitis sowie deren Schweregrad mit dem Lebensalter zunehmen. Allerdings kommt es in höheren Altersstufen zu einer Abnahme der Prävalenz aufgrund von

Zahnverlusten und Rezessionen. Schwere Formen kamen vermehrt bei Männern vor (Albandar et al., 1999).

Eine europäische Metaanalyse kam zu einem ähnlichen Ergebnis. Die Prävalenz lag bei etwa 36% für die westeuropäische Bevölkerung mit Sondiertiefen zwischen 4 und 5,5 mm. In Osteuropa lag die Prävalenz hingegen bei etwa 45%. Sondiertiefen von über 6 mm wurden bei etwa 9% der Westeuropäer und etwa 23% der Osteuropäer gefunden (Sheiham und Netuveli, 2002).

Das Institut der deutschen Zahnärzte hat im Rahmen der III. Deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS III) im Jahr 1997 Daten zur Parodontitis erhoben. Dabei zeigte sich, dass etwa ein Drittel der Erwachsenen Taschentiefen von bis zu 5 mm aufwiesen. Der Anteil der Bevölkerung mit schwerer Parodontitis belief sich immerhin auf etwa 14%. Auch innerhalb Deutschlands zeigte sich ein ausgeprägter Unterschied zwischen Ost und West im Bezug auf fortgeschrittene Parodontalerkrankungen. Während in Westdeutschland weniger als 10% der Erwachsenen eine Sondiertiefe von mehr als 5 mm aufwiesen, lag der Wert in Ostdeutschland bei etwa 31%. Es zeigte sich hier auch eine Zunahme der Parodontitis mit dem Lebensalter. Die Häufigkeit von Taschentiefen über 4 mm bei den über 65-jährigen betrug etwa 84%, bei etwa 52% betrug die Taschentiefen über 6 mm. Ein geringer geschlechtsspezifischer Unterschied war in allen Altersstufen zu sehen, Männer waren häufiger betroffen und wiesen im Durchschnitt stärkere Attachmentverluste auf (Micheelis und Reich, 1997).

1.1.4 Krankheitsbild der chronischen marginalen Parodontitis und Therapie

Die chronische Parodontitis wurde früher adulte Parodontitis genannt, da man davon ausging, dass sie nur Erwachsene befällt. Seit 1999 hat sich die heute geläufige Bezeichnung durchgesetzt (Armitage, 2004). Bei ihr handelt es sich um eine infektiöse, entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparats. Die beteiligten pathogenen Erreger sind meist obligat anaerobe gram-negative Bakterien; teilweise sind darunter auch gram-positive Bakterien. In bis zu 50% der schweren chronischen Parodontitiden wurden *Porphyromonas gingivalis* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gefunden. Des Weiteren treten *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* und *Micromonas micros* neben einer Reihe anderer Bakterien häufig als pathogene Erreger auf (van Winkelhoff, 2003).

Im Verlauf der Erkrankung entwickeln sich ein progressiver Attachmentverlust und ein Abbau des Alveolarknochens. Dadurch lockern sich die betroffenen Zähne zunehmend bis zum kompletten Zahnverlust. Kardinale Symptome sind Taschenbildung und/oder gingivale Rezessionen. Neben nicht aktiven, ruhenden Zahnfleischtaschen treten auch sog. aktive Taschen auf. Dabei handelt es sich um Zahnfleischtaschen, die Entzündungszeichen, wie Blutungen, Exsudate und Rötungen, aufweisen. Häufig finden sich große Mengen an Plaque und supra- bzw. subgingivalem Zahnstein; dies ist vor allem durch eine unzureichende Zahnhygiene bei den betroffenen Patienten zu erklären. Die chronische Parodontitis ist meist mit einer Gingivitis vergesellschaftet. Weitere klinische Zeichen der chronischen Parodontitis sind Abszesse, Zahnwanderungen und Zahnkippungen. Im fortgeschrittenen Stadium sind erhöhte Zahnbeweglichkeiten zu beobachten.

Die Erkrankung entwickelt sich meist ab dem 30. bis 35. Lebensjahr, kann aber auch schon bei Kindern und Jugendlichen auftreten. Die Progression ist langsam bis mäßig und verläuft manchmal schubweise.

Je nach Anzahl der befallenen Zähne, wird zwischen einer lokalisierten und einer generalisierten Form unterschieden. Bei der lokalisierten chronischen Parodontitis sind weniger als 30 % der Flächen betroffen. Ab einem Befall von über 30 % der Flächen spricht man von der generalisierten Form.

Die Schwere der Erkrankung wird in drei Stufen eingeteilt. Sie kann für einzelne Flächen, einzelne Zähne oder für die gesamte Dentition angegeben werden. Es wird in leicht, mit 1-2 mm Attachmentverlust, mittel, mit 3-4 mm Attachmentverlust oder schwer, ab einem Attachmentverlust von über 6 mm unterteilt (Hellwig et al., 2003).

Die vollständige Gesundung des Gewebes und eine Wiederherstellung der anatomischen und physiologischen Verhältnisse des Parodonts werden als Therapieziele angestrebt. Im Einzelnen entspricht dies einer Elimination der Taschenaktivität, einer Reduktion der Blutung nach Sondierung, einer Reduzierung der Sondiertiefe, einer Verhinderung des weiteren Attachmentverlusts bzw. einem klinischen Attachmentgewinn sowie einer Stabilisierung bzw. Verringerung der Beweglichkeit betroffener Zähne (Hellwig et al., 2003).

Als Therapie der Wahl bei den Parodontiden gilt die mechanische Entfernung der entzündungsverursachenden Infektion. Dabei kommen die subgingivale Plaque- und Zahnsteinentfernung (Scaling) und die Wurzelglättung (Root planning) zum Einsatz. Neben der mechanischen Entfernung hat sich hier der Einsatz von Lasern zur Behandlung der chronischen Parodontitis als wirkungsvoll erwiesen. Hierbei ist vor allem der Einsatz des Nd-YAG- bzw. des Er-YAG-Lasers gegenüber des chirurgischen Scaling und Root planning als

gleichwertig anzusehen (Cobb, 2006). Zusätzlich stehen noch maschinelle Systeme, wie Schall- bzw. Ultraschall und Pulver-Wasser-Strahl-Geräte, zur Verfügung (Wolf et al., 2004). Eine chirurgische Behandlung hat unter anderem den Vorteil, dass ein besserer Zugang für die Reinigung der Zahnwurzeloberfläche geschaffen werden kann und die parodontalen Taschen effektiver reduziert bzw. eliminiert werden können als beim Scaling und Root planning (Teles et al., 2006).

Zusätzlich wird bei einigen Indikationen eine adjuvante Therapie mit antibakteriellen Substanzen empfohlen. Als Standard gilt die systemische Therapie, je nach Schwere der Erkrankung. Dabei sollte der Typ des Erregers beachtet werden, da nicht alle Pathogene auf dasselbe Antibiotikum gleich effektiv ansprechen. Im Allgemeinen wird Metronidazol als sehr wirksam angesehen, besonders wegen des breiten Wirkspektrums im anaeroben Bereich. Auf Grund der oberflächlichen Lokalisation der Parodontitis kann auch eine lokale antibakterielle Therapie indiziert sein. Man kann Antiseptika, z.B. Chlorhexidin, sowie lokale Antibiotika verwenden. Besonders an Stellen, an denen die systemische Therapie keine Wirkung zeigt, oder bei Rezidiven können lokale Antibiotika indiziert sein (van Winkelhoff, 2003). Eine zusätzliche medikamentöse Therapie kann dazu beitragen, pathogene Bakterien effizient zu reduzieren und die Wiederherstellung einer physiologischen subgingivalen Mikroflora zu beschleunigen (Haffajee et al., 2006).

Eine Studie von Lopez aus dem Jahr 2006, nach der auch der alleinige Einsatz von Metronidazol plus Amoxicillin über eine Woche ein ähnliches therapeutisches Ergebnis wie die chirurgische Behandlung der Patienten erzielen konnte, hat zu kontroversen Diskussionen geführt, da sie den bisherigen Standards einer chirurgischen Therapie vor der medikamentösen Behandlung widerspricht (Lopez et al., 2006; Mombelli, 2006).

Es gibt folglich viele Therapieoptionen, von denen sich bislang keine als eindeutig überlegene Therapieform herauskristallisiert hat. Ihr gemeinsames Ziel liegt in der Reduktion der pathogenen Erreger, da deren vollständige Elimination meist nicht möglich und auch nicht nötig ist. Als erstes gilt es, den Erregerherd in den befallenen Taschen zu entfernen und die Anzahl der pathologischen Erreger möglichst rasch mindestens auf die Erregeranzahl von gesunden Individuen zu reduzieren. Gleichzeitig soll sich im subgingivalen Kompartiment eine normale Mikroflora mit möglichst wenig parodontopathogenen und möglichst vielen kommensalischen Bakterien reetablieren (Teles et al., 2006).

1.1.5 Risikofaktoren der Parodontitis

Bei der Entstehung der Parodontitis spielen nicht nur bakteriologische Faktoren eine Rolle. Es gibt einige Risikofaktoren, die zu einem vermehrten Auftreten der Parodontitis beitragen.

Ein entscheidender Risikofaktor ist das Alter. So kommt es zu einem Anstieg der Prävalenz der Parodontitis mit zunehmendem Lebensalter. Allerdings ist ab dem 45. bis 50. Lebensjahr eine Regression der Prävalenz zu verzeichnen, die durch den zunehmenden Zahnverlust in höherem Alter erklärt wird (Albandar, 2002). Durch die Verbesserung der Zahnhygiene und dem damit verbundenen Erhalt der Zähne in höherem Alter kann es in Zukunft eventuell zu einer Abschwächung dieser Regression kommen.

Des Weiteren scheint die ethnische Zugehörigkeit eine Rolle zu spielen. So ergab sich in der schwarzen Bevölkerung Afrikas die höchste Prävalenz, gefolgt von lateinamerikanischen und asiatischen Populationen. Diese Beobachtungen sind nicht ausschließlich auf den mangelnden Zugang zur parodontalen Therapie in diesen Bevölkerungsgruppen zurück zu führen. Es liegt in diesen ethnischen Gruppen ein generell höheres Risiko der Entwicklung einer chronischen Parodontitis vor (Albandar und Rams, 2002). Eine mögliche Ursache hierfür könnte die genetische Varianz der ethnischen Gruppen sein. Zusätzlich könnte aber auch eine höhere Inzidenz an Trägern des Subtyps JP2 des *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ursächlich dafür sein (Haubek et al., 2008).

Auch systemische Erkrankungen, wie ein Diabetes mellitus, stehen im engen Zusammenhang mit der Parodontitis. Patienten mit einem schlecht eingestellten Diabetes mellitus haben meist einen schlechteren Zahnstatus als Diabetiker mit einem gut eingestellten Blutzucker. Auch die Dauer der Erkrankung korreliert mit der Wahrscheinlichkeit, an Parodontitis zu erkranken (Mealey und Oates, 2006; Oliver und Tervonen, 1994).

Dysfunktionen der neutrophilen Granulozyten, wie die Agranulozytose, die konnatale oder zyklische Neutropenie oder verschiedene Formen einer Leukopenie, können neben den systemischen Auswirkungen auch zu einem erhöhten Auftreten von Gingivitiden und Parodontitiden führen (Van Dyke und Hoop, 1990).

Auch das Rauchen gilt als wichtiger Risikofaktor. So haben Raucher ein dreifach erhöhtes Risiko an Parodontitis zu erkranken als Nichtraucher. Auch ehemalige Raucher weisen eine erhöhte Häufigkeit an entzündlichen Parodontalerkrankungen auf. Dies wird dadurch erklärt, dass das Rauchen die systemische Immunreaktion des Organismus herabsetzt. Außerdem hat Tabak eine direkte toxische Wirkung auf die desmodontale Zellpopulation und vermindert dadurch die lokale Immunantwort (Johnson und Hill, 2004).

All diese Risikofaktoren erklären jedoch nicht, warum sich das Auftreten und die Schwere der Erkrankung bei Individuen mit vergleichbaren Risikofaktoren unterscheiden. Eine wichtige Rolle spielt dabei der genetische Unterschied der Individuen. So haben Zwillingsstudien gezeigt, dass die Erbllichkeit der marginalen Parodontitis bei 50 % liegt (Michalowicz et al., 2000). Man hat ein komplexeres Modell als Erklärungsansatz für die Entstehung der marginalen Parodontitis entwickelt. Dabei ist nicht von einer einzigen Ursache für die Erkrankung auszugehen, sondern es kommt zum Zusammenspiel mehrerer pathogenetischer Faktoren, die die Entstehung und das Fortschreiten der Erkrankung bewirken. Dieses Modell wird „critical pathway“ genannt. Danach spielt neben den bereits genannten Risikofaktoren die Stärke der Virulenz der beteiligten Erreger eine Rolle. Zum anderen ist auch der interindividuelle Unterschied in der Immunantwort für die Pathogenese entscheidend (Albandar und Rams, 2002; Timmerman und van der Weijden, 2006).

1.1.6 Das „critical pathway“ Modell

Das Modell des „critical pathway“ geht von der Hypothese aus, dass die immunologische Abwehr von Bakterien in zwei Phasen verläuft. Die erste ist eine unspezifische, angeborene Immunantwort, die schnell und ungerichtet auf pathogene Erreger reagiert. Die zweite Phase springt etwas später an und richtet sich spezifisch gegen den Erreger. Sie wird in eine humorale und eine zelluläre Immunreaktion unterteilt.

Normalerweise bilden der Verband an epithelialen Gingivazellen sowie die Spüleffekte der Speichelsekretion und der sogenannten Sulkusflüssigkeit einen effektiven Schutz vor pathogenen Bakterien. Durch Störung dieser Mechanismen oder durch erhöhte Virulenz der Bakterien kann diese Barriere überwunden werden und die Bakterien können nachfolgend das gingivale Epithel schädigen (Madianos et al., 2005). Die pathogenen Erreger formieren sich im Ursprung aus den Plaques auf dem subgingivalen Kompartiment als mikrobieller Biofilm (Page et al., 1997). Es gibt Bakterien, die gehäuft bei Patienten mit Parodontitis gefunden werden. So werden *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* eng mit der Parodontitis in Verbindung gebracht (Picolos et al., 2005; Timmerman und van der Weijden, 2006). An der Infektion sind auch andere Bakterien mitverantwortlich, die Bestandteil der residualen Mundflora gesunder Probanden sind. Die pathologische Wandlung residueller Bakterien und die dadurch mögliche Etablierung pathogener Bakterien resultiert in einer Immunantwort, die zur Zerstörung von parodontalem Gewebe führt (Paster et al., 2006).

Die angeborene Immunantwort läuft schnell ab, ist aber nicht erregerspezifisch. Ihre zellulären Mediatoren sind neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. Mittels Phagozytose nehmen sie das als körperfremd identifizierte Material auf und zerstören es. Außerdem bewirken sie über die Ausschüttung von Zytokinen, wie IL-1 β , TNF α , IL-6 und IL-12, sowie Chemokinen, wie MCP1 und IL-8, die Anlockung anderer Immunzellen. Dadurch angeregt penetrieren weitere neutrophile Granulozyten durch das Kapillarendothel in den Sulkus bzw. die subgingivale Tasche (Madianos et al., 2005). Außerdem locken epitheliale Zellen, die durch Bakterien oder andere krankheitsbedingte Stressoren angegriffen wurden, natürliche Killer- (NK-) Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen an und aktivieren diese. Nachdem die NK-Zellen und T-Zellen an die infizierte Zelle gebunden haben, vermitteln sie deren Lyse. Eine weitere Komponente stellt das Komplement-System dar. Über eine Kaskade von Proteinaktivierungen kann es selbst Zellen lysieren sowie Granulozyten aktivieren. Außerdem können präformierte Antikörper pathogene Erreger binden und eine Immunreaktion hervorrufen (Dennison und Van Dyke, 1997; Janeway jr. et al., 2005). Somit ist die primäre Immunantwort eine wichtige Barriere für Krankheitserreger. Ihre Effektivität entscheidet über den weiteren Verlauf der Erkrankung. Gelingt es die pathogenen Keime abzutöten, wird die Ausbreitung der Bakterien verhindert. Die Entzündung bleibt lokal auf die Gingiva beschränkt und es kommt nicht zu einem Abbau des Zahnhalteapparats.

Nach dem Modell des „*critical pathway*“ kann die erste Phase der Immunantwort überwunden werden. Die Ursachen dafür können vielfältig sein und entweder auf Seite der Erreger oder des Immunsystems des Wirts liegen.

Falls die primäre Immunantwort nicht ausreicht um die Krankheitserreger abzuwehren, wird die sekundäre Immunreaktion aktiviert. Sie ist nicht angeboren, sondern entwickelt sich erst im Lauf des Lebens und richtet sich hochspezifisch gezielt gegen bestimmte Erreger. Ihre Aktivierung dauert länger als die der angeborenen Immunantwort. Wichtiger Bestandteil sind die Lymphozyten. Vor allem B-Lymphozyten werden durch die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen durch Monozyten bzw. Makrophagen des retikuloendothelialen Systems angelockt und aktiviert. Diese wandeln sich in Plasmazellen um, die spezifische Antikörper gegen die Erreger bilden. Daneben werden auch Th1- und Th2-Lymphozyten ebenso wie weitere Makrophagen und neutrophile Granulozyten aktiviert (Kornman et al., 1997). Die an der Regulierung von Lymphozyten und Plasmazellen beteiligten Zytokine Interleukin- (IL-) 1 β , Tumor Nekrose Faktor (TNF) α und Prostaglandin (PG) E₂ aktivieren zusätzlich Fibroblasten. Diese schütten Matrix-Metalloproteinasen aus, die das umgebende Kollagen abbauen und so zum zunehmenden Verlust des Zahnhalteapparats führen (Madianos et al.,

2005). Vor allem die Metalloproteinasen 3 und 8 werden mit der chronischen Parodontitis in Verbindung gebracht (Tonetti et al., 1993). Jedoch auch andere Immunreaktionswege sind an dem Bindegewebs- und Knochenabbau beteiligt. So kann exsudiertes Plasminogen durch im Gewebe enthaltene Plasminogenaktivatoren in aktives Plasmin umgewandelt werden. Diese Proteinase führt zum Abbau von extrazellulärer Matrix, dagegen nicht von interstitiellem Kollagen. Auch die durch Leukozyten synthetisierten Serin-Proteasen können verschiedene Moleküle der extrazellulären Matrix abbauen. Durch Aktivierung mittels Cathepsin können Fibroblasten und Makrophagen Kollagen-Fibrillen direkt phagozytieren. Neben körpereigenen Immunreaktionen sind auch bakterielle Zytokine und Toxine für den Verlust von Bindegewebe und Knochen verantwortlich (Birkedal-Hansen, 1993). Letztlich kommt es zur irreversiblen Zerstörung des Zahnhalteapparats. Die Aktivierung der Immunreaktionswege ist abhängig von der Anzahl an pathogenen Erregern im subgingivalen Sulkus. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Abbau des Zahnhalteapparats indirekt von der Dichte der anwesenden Bakterien abhängt.

Neben dem Abbau des Zahnhalteapparats kommt es zur Vertiefung des gingivalen Sulkus. Für anaerobe Bakterien stellt dies eine Verbesserung ihrer Lebensbedingungen dar, denn sie sind dadurch besser vor dem für sie schädlichen Sauerstoff geschützt. $TNF\alpha$, PGE_2 und das von aktivierten Mastzellen ausgeschüttete Histamin sind vasoaktive Moleküle, die die Gefäßpermeabilität erhöhen. Dies führt zur vermehrten Exsudation von Flüssigkeit und Proteinen und somit zur erhöhten Produktion von Sulkusflüssigkeit (Madianos et al., 2005). Diese entspricht in ihrer Zusammensetzung im Wesentlichen dem Blutplasma und stellt somit eine hervorragende Nahrungsquelle für die Bakterien dar.

Schließlich führen die genannten pathologischen Mechanismen zu einer Verbesserung der Lebensbedingungen der Bakterien. Die Bakterien vermehren sich und können in höherer Anzahl den Wirt angreifen sowie eine noch stärkere Immunantwort bewirken. Dadurch schliesst sich der Kreis des „*critical pathway*“ und ein Circulus Vitiosus entsteht, an dessen Ende es zum vollständigen Abbau des Zahnhalteapparats und zum Verlust des Zahns kommt. Durch den therapeutischen Eingriff unter Schaffung aerober Verhältnisse kann dieser Kreislauf durchbrochen werden. Der Verlauf und die Schwere der Erkrankung sind folglich von der Virulenz der Bakterien und/oder der inadäquaten bzw. übermäßigen Immunantwort auf den bakteriellen Stimulus abhängig (Kinane et al., 2007). Dadurch können auch die bereits erwähnten Risikofaktoren erklärt werden, die die Immunreaktion des Wirts beeinflussen. Daneben spielt aber insbesondere der interindividuelle Unterschied bezüglich

des genetischen Hintergrundes der an der Abwehrreaktion beteiligten Faktoren eine wichtige Rolle in der Pathogenese der chronischen marginalen Parodontitis (Kinane und Hart, 2003).

1.1.7 Bakterieller Biofilm als pathogenetischer Faktor

Als Hauptlokalisation der parodontopathogenen Keime werden bakterielle Biofilme angesehen. Biofilme werden als Matrix-umschlossene Kolonie aus verschiedenen Bakterien definiert, die sich aneinander sowie an eine Oberfläche binden (Draveau et al., 1997). Grundsätzlich können Biofilme auf dem Schleimhautepithel oder der Zahnoberfläche entstehen, auf der sie als dentaler Plaque in Erscheinung treten (Whittaker et al., 1996). Sie bestehen aus Zusammenschlüssen unterschiedlicher Bakterienarten, die untereinander eine Symbiose bilden. So herrscht gewissermaßen eine Aufgabenteilung, die die Nahrungsbeschaffung erleichtert, die Sauerstoffverteilung regelt und die Resistenz gegenüber der Immunreaktion des Wirts verbessern kann. Über die Diffusion von kleinen Signalmolekülen erfolgt außerdem eine primitive Art der Kommunikation zwischen den einzelnen Bakterien einer Kolonie (Davey und Costerton, 2006). Ein weiterer Vorteil dieser Symbiose für die Bakterien besteht darin, dass die Biofilme durch ihre spezielle Architektur mit einer umhüllenden extrazellulären Matrix resistenter gegenüber antibakterieller Behandlung sind. Zusätzlich weisen die Biofilme eine hohe Stabilität auf, die eine Entfernung durch normale tägliche Zahnhygiene verhindert und den Einsatz einer mechanischen Therapie mit Scaling und Root planing erfordert (Draveau et al., 1997). Im Verlauf der Plaqueentwicklung können sich auf Grund der veränderten Bedingungen im Biofilm bestimmte Bakterienarten etablieren, die zuvor keine passenden Lebensbedingungen vorfanden. Aerobe *Streptokokken* und *Neisserien* sind initial an der Entstehung des Biofilms beteiligt, während anaerobe Spezies wie Korynebakterien und Fusobakterien den Biofilm später besiedeln. So kann sich die ursprüngliche Dominanz von vornehmlich gram-positiven Bakterienspezies in der oralen Flora in Richtung von obligat anaeroben gram-negativen Bakterien verändern. Zu diesen zählen auch die parodontopathogenen Erreger *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* (Kolenbrandner et al., 2006).

1.1.8 Virulenzfaktoren der parodontopathogenen Bakterien

Stellvertretend für eine Vielzahl von Bakterien, die an der Entstehung der Parodontitis beteiligt sein können, sollen hier die Virulenzfaktoren von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* näher erläutert werden. Durch ihr Vorhandensein oder ihre Abwesenheit allein können allerdings keine direkten Rückschlüsse auf die Art der Parodontitis gezogen werden. Folglich ist eine Differenzierung zwischen chronischer und aggressiver Parodontitis anhand der beteiligten Bakterien nicht möglich. Ein Befall mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* kann allerdings den Therapieerfolg beeinträchtigen, da es hier gehäuft zu Rezidiven kommt (Mombelli et al., 2002).

Ein wichtiger Virulenzfaktor von *Porphyromonas gingivalis* ist seine Polysacharidkapsel. Diese schützt die Bakterien vor Austrocknung und sie werden resistent gegenüber der Phagozytose durch die Abwehrzellen des Wirts. Die Lipopolysacharide der Bakterienkapsel interagieren mit den Monozyten und Makrophagen, die dadurch verstärkt proinflammatorische Zytokine produzieren, die den Zahnhalteapparat zerstören. Außerdem produziert *Porphyromonas gingivalis* zahlreiche Enzyme. Unter ihnen befinden sich Kollagenasen und Trypsin-ähnliche Proteasen. Sie bauen Kollagenfibrillen ab und können so zur Ausbreitung der Bakterien und zum Fortschreiten des Abbaus des Zahnhalteapparats führen. Weitere Enzyme können Serumproteine, wie Immunglobuline und Komplementfaktoren, inaktivieren. Ein anderer Virulenzfaktor ist die Gewinnung von Häm und Eisen. Sie sind essentielle Wachstumsfaktoren für *Porphyromonas gingivalis*, die die Bakterien durch ihre Hämagglutinin- und Hämolyse-Aktivität gewinnen. Durch diese Faktoren können sie Erythrozyten lysieren und Serumbestandteile, wie Albumin, Hämopexin, Haptoglobin und Transferrin, spalten (Dennison und Van Dyke, 1997; Ishikawa et al., 1997).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans gehört ebenfalls zu den Bakterienspezies, die die Biofilme spät besiedeln. Er produziert als wichtigen Virulenzfaktor das Leukotoxin. Dieses ist mit dem α -Hämolysin von *E.coli*, der Adenylatzyklase von *Bordetella pertussis* und dem Leukotoxin von *Mannheimia haemolytica* verwandt. Es richtet sich gegen humane Leukozyten. So werden vornehmlich neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen lysiert. Ein weiterer Virulenzfaktor ist die Fähigkeit, in intaktes Gewebe aus epithelialen und endothelialen Zellen zu penetrieren. Des Weiteren wird *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mit Verlust des Zahnhalteapparats sowie mit einem Knochenverlust assoziiert. Dies wird daraus gefolgert, dass zum einen eine Eradikation dieser Spezies zu einer Verbesserung der Knochensubstanz führt, sowie zum anderen, dass es zu einem Fortschreiten

des Substanzverlusts bei erneuter bakterieller Besiedlung der behandelten Tasche kommt. Mehrere Proteine, wie die *cytolethal distending toxins*, verschiedene Proteasen oder Zytokine, werden mit diesem Phänomen in Verbindung gebracht. Manche Genotypen des *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sind außerdem fähig, menschliches Hämoglobin als Eisenquelle zu nutzen (Dennison und Van Dyke, 1997; Fine et al., 2006).

Trotz dieser Virulenzfaktoren sind die genannten Bakterienspezies keine obligaten Krankheitserreger, sondern können auch Bestandteil der Mundflora gesunder Individuen sein.

1.1.9 Mögliche genetische Faktoren für die chronische marginale Parodontitis

Die Immunreaktion des Wirts spielt für die Entstehung der chronischen marginalen Parodontitis eine wichtige Rolle. Diese Immunreaktion steht unter dem Einfluss des genetischen Hintergrunds, so dass interindividuelle genetische Unterschiede das Risiko, an einer Parodontitis zu erkranken, entweder erhöhen oder erniedrigen können. Sicherlich handelt es sich bei der chronischen Parodontitis um eine multifaktoriell bedingte Erkrankung, d.h. es gibt kein bestimmtes Gen, das allein die Krankheit auslöst. Es handelt sich vielmehr um ein komplexes Zusammenspiel zwischen dem genetischen Hintergrund und verschiedenen Umweltfaktoren, wie beispielsweise der bakteriellen Infektion oder des Tabakrauchens (Hart und Kornman, 1997).

Mögliche Kandidatengene sind im Bereich der Immunregulatoren zu finden. Während für die aggressive Form der Parodontitis bereits eindeutige genetische Assoziationen gefunden wurden, sind die bisherigen Forschungsergebnisse zur chronischen marginalen Parodontitis weniger signifikant. Allgemein gelten Gene, die die Immunantwort stimulieren oder regulieren, als potentielle Kandidatengene bei der Erforschung der genetischen Prävalenz der chronischen Parodontitis (Yoshie et al., 2007). Für einige Zytokine, Chemotaxine und immunregulatorische Rezeptoren wurden bereits Assoziationen nachgewiesen (Schenkein, 2002). Auch einige Gene des Histokompatibilitäts-Komplexes wurden mit der chronischen Parodontitis assoziiert (Reichert et al., 2002; Schenkein, 2002; Stein et al., 2003).

1.2 Histokompatibilitäts-Komplex (MHC)

1.2.1 Funktion des MHC

Ein wichtiger Bestandteil des humanen Immunsystems sind die im Major histocompatibility complex (MHC) kodierten Human leukocyte antigen- (HLA-) Moleküle. Zunächst wurden die HLA-Moleküle wegen ihrer Wirkung in der Immunantwort in der Transplantationsmedizin gefunden (Janeway jr. et al., 2005). Dieser Nachweis geht zurück auf die Entdeckung von Unterschieden der antigenen Eigenschaften von weißen Blutzellen verschiedener Individuen (Janeway jr. et al., 2005). Die MHC- bzw. HLA-Moleküle befinden sich an der Zelloberfläche und dienen der Antigenpräsentation. Diese Antigene stammen entweder von Pathogenen, die in der Zelle repliziert wurden, wie Viren oder intrazelluläre Bakterien, oder von Pathogenen oder deren Produkten, die von der Zelle mittels Phagozytose aufgenommen wurden. Die Pathogene werden proteolytisch in kurze, lineare Peptid-Fragmente gespalten (Bjorkman und Parham, 1990). An MHC-Moleküle gebunden werden diese an die Zelloberfläche transportiert und dort als Komplex bestehend aus MHC-Molekül und Peptid an spezifischen Bindungsstellen der T-Lymphozyten präsentiert (Janeway jr. et al., 2005).

1.2.2 Genetische Struktur der MHC-Region

Der Histokompatibilitätskomplex (MHC) befindet sich auf dem Chromosom 6 in der Region 6p21.3. Der Bereich des MHC umfasst etwa 4 Mio. Basenpaare (bp) und kodiert über 200 verschiedene Gene. Er ist in drei Regionen unterteilt. Vom Zentromer aus gesehen liegt zuerst die MHC-Klasse II-Region mit einer Länge von etwa einer Megabase (Mb). Zu den MHC-Klasse II-Genen gehören *HLA-DP*, *HLA-DQ* und *HLA-DR*. Sie befinden sich auf Makrophagen, Monozyten und B-Lymphozyten und präsentieren Peptide, die mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen und dort fragmentiert wurden. Die beladenen MHC-Klasse II-Moleküle aktivieren CD4 T-Zellen. Die nächstgelegene Region in Richtung Telomer ist die MHC Klasse III-Region. Sie ist etwa 1 Mb lang und kodiert unter anderem die Gene für die Komplementfaktoren (C2, C4 und Faktor B), Zytokine (TNF α und TNF β) und Hitzeschockproteine der HSP70-Familie. Am weitesten telomerwärts gelegen befindet sich die MHC Klasse I-Region mit einer Länge von etwa 2 Mb (Shiina et al., 1999; The MHC sequencing consortium, 1999). Vor allem die MHC-Klasse I und -Klasse II-Regionen fallen durch einen ausgeprägten Genreichtum und einen hohen Polymorphismus auf. Dadurch

existiert eine Vielzahl von unterschiedlichen Molekülen, die an Immunreaktionen beteiligt sind. Als polymorph werden Gene definiert, bei denen das häufigste Allel eine Populationsfrequenz von weniger als 95% hat (Ott, 1991). Zusätzlich liegt bei den unterschiedlichen Genen in der MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-Region jeweils eine sehr hohe Anzahl an verschiedenen Allelen vor. Folglich weisen die einzelnen Immunrezeptoren eine große interindividuelle Variabilität auf. Durch diese Eigenschaften der MHC-Gene wird eine Unterdrückung der menschlichen Immunantwort durch pathogene Erreger erschwert (Janeway jr. et al., 2005).

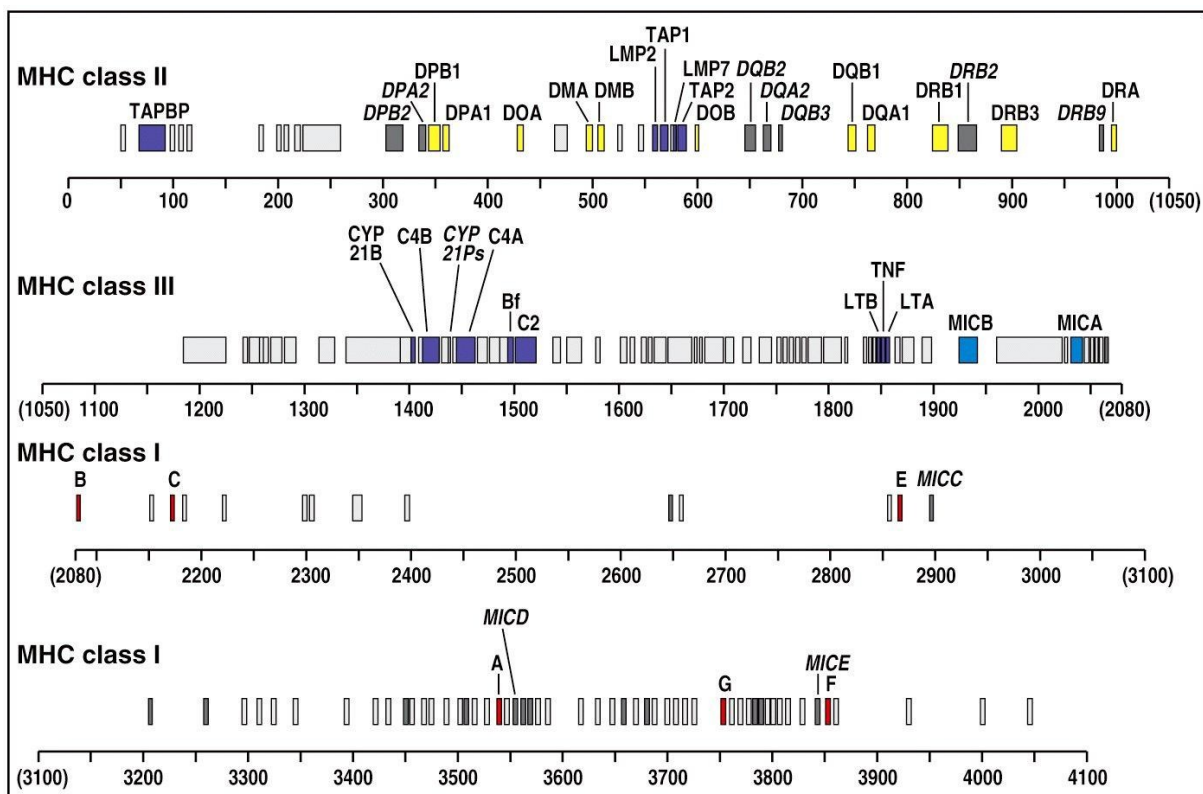


Abb. 1.1 Genkarte der MHC-Region (Janeway jr. et al., 2005)

1.2.3 MHC I-Komplex

1.2.3.1 Funktion des MHC I

Die MHC-Klasse I-Moleküle kommen auf der Zelloberfläche von allen humanen Zelltypen, außer kernlosen Erythrozyten und Trophoblasten vor. Ihre Aufgabe ist die Präsentation von Peptiden, die im Zytosol der Zelle im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert wurden (Germain und Margulies, 1993). Folglich werden durch die MHC-Klasse I-Moleküle intrazellulär gebildete Proteine präsentiert. Die Proteine werden dabei im Zytosol in Peptide

gespalten. Im endoplasmatischen Retikulum werden sie an MHC-Klasse I-Moleküle gebunden und zusammen mit diesen an die Zelloberfläche transportiert (Janeway jr. et al., 2005). Meist handelt es sich um Fragmente von körpereigenen Proteinen, die über MHC-Klasse I-Moleküle präsentiert werden. Diese lösen keine Immunantwort des menschlichen Immunsystems aus. Bei Befall der Zelle mit einem Virus oder bei Neumutationen in einem zelleigenen Protein werden virale bzw. mutierte Proteine synthetisiert, gespalten und über MHC-Klasse I-Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert. CD8⁺ zytotoxische T-Zellen binden sich an diese Komplexe und erkennen die gebundenen Peptide als körperfremd und potentiell schädlich. Es kommt zur gezielten Abtötung der betroffenen Zelle (Germain und Margulies, 1993; Townsend und Bodmer, 1989).

1.2.3.2 Struktur und Bildung des Histokompatibilitäts-Komplexes

Die Struktur der MHC-Klasse I-Moleküle besteht in einem nicht-kovalent gebundenen Heterodimer. Die schwere Kette hat eine Größe von 44 Kilodalton (KD) und ist in die Zellmembran eingebunden. Der größere Teil des Glykoproteins liegt mit seinem N-terminalen Ende außerhalb der Zelle und ist in drei Domänen unterteilt. N-terminal liegt die $\alpha 1$ -Domäne, gefolgt von der $\alpha 2$ -Domäne und der $\alpha 3$ -Domäne. Weitere Domänen sind ein transmembraner Abschnitt mit ca. 25 Aminosäuren und ein kurzer intrazellulärer Schwanz mit ca. 30 Aminosäuren (Bjorkman und Parham, 1990). Die leichte Kette befindet sich ebenfalls extrazellulär und hat eine Größe von 12 KD. Sie wird $\beta 2$ -Mikroglobulin genannt und ist auf Chromosom 15 kodiert. Die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen der schweren Kette bilden die Bindungsgrube für die Peptide. In ihrer dreidimensionalen Struktur bilden sie gemeinsam einen Komplex aus zwei gegenüberliegenden α -Helices. Diese liegen auf einer Lage von acht nicht parallelen β -Faltblättern. Dadurch entsteht eine längliche Tasche, in der Peptide gebunden werden können. An den Enden dieser Tasche befinden sich nicht variable Stellen, die Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Peptid eingehen. Hierbei handelt es sich um eine Ansammlung von Tyrosinen. Am Rande der Tasche weisen die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen einen hohen Polymorphismus auf, der die Bindung von unterschiedlichen Peptiden beeinflusst. Die $\alpha 3$ -Domäne der schweren Kette des MHC-Klasse I-Moleküls und das $\beta 2$ -Mikroglobulin stellen strukturell immunglobulinähnliche Domänen dar (Janeway jr. et al., 2005).

Für die Bildung eines kompletten MHC-Klasse I-Moleküls werden zunächst die beiden Ketten im Zytosol der Zelle von freien Ribosomen synthetisiert. Nach dem Transfer in das

endoplasmatische Retikulum erfolgt die Verbindung der beiden Ketten. Daran ist eine Reihe von Hilfsproteinen beteiligt. Zu diesen als Chaperone bezeichneten Proteinen gehören das Calnexin, der MHC I loading Komplex mit Calreticulin, Tapasin, Erp57 und das TAP (Transporter assoziiert mit Antigen Prozessierung). Nachdem die beiden Ketten des MHC I miteinander verknüpft sind, ist die Bindung von Peptiden möglich. Diese Peptide sind Fragmente von Proteinen, die im Zytosol vom Proteasom in eine Länge von acht bis zehn Aminosäuren gespalten wurden. Ihre Aufnahme ins endoplasmatische Retikulum erfolgt mit Hilfe des TAP. Daraufhin werden sie in die Bindungsgrube des MHC-Klasse I-Moleküls eingebracht. Erst dadurch erlangt der Komplex Stabilität und kann an die Zelloberfläche transportiert werden (Janeway jr. et al., 2005; Williams et al., 2002).

1.2.3.3 Peptidbindung und T-Zell Wirkung

Die Bindung der Peptide erfolgt wie bereits erwähnt an die von den Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ gebildete Bindungsgrube des MHC-Klasse I-Moleküls. Die Bindungsstelle ist an beiden Enden geschlossen und bevorzugt Peptide von einer Länge zwischen acht und zehn Aminosäuren. Dabei handelt es sich häufig um Peptide mit zwei dominanten Ankerpositionen, die die Einbringung in die Bindungsgrube der MHC-Klasse I-Moleküle vermitteln. Diese Ankerpositionen bestehen meist aus einer bestimmten Aminosäure bzw. einer Reihe von chemisch ähnlichen Aminosäuren. Gewöhnlich befindet sich am Carboxylende des Peptids ein hydrophober oder seltener ein basischer Anker. Der andere Anker ist an der zweiten Position lokalisiert (Biddison und Martin, 2001; Janeway jr. et al., 2005). Nach Kopplung des Peptids an das MHC-Klasse I-Molekül wird der Komplex an die Zelloberfläche transportiert (Townsend und Bodmer, 1989). Dort kann er von CD8+ T-Zellen oder NK-Zellen erkannt und gebunden werden. Für jeden Komplex aus Peptid und MHC-Klasse I-Molekül gibt es spezifische T-Zellen, die nur an diesen einen Komplex binden. Die Aufgabe der T-Zelle ist die Differenzierung, ob es sich bei den gebundenen Peptiden um Fragmente von viralen Proteinen oder mutierten zellulären Proteinen oder ob es sich um nicht schädliche Antigene handelt. An diesem Vorgang sind zahlreiche Proteine und Rezeptoren beteiligt. Diese können MHC-Klasse I-Moleküle erkennen, befinden sich auf der Oberfläche von NK-Zellen und können diese inhibieren oder aktivieren. Dazu gehören Rezeptoren der C-Typ Lektin Familie, wie CD94/NKG2A und -B, sowie aus der Immunglobulinsuperfamilie die Killer cell-inhibitory receptors (KIRs). Bei Letztgenannten handelt es sich um monomere

Typ I-Glykoproteine, die zwei oder drei Ig-ähnliche, extrazelluläre Domänen für die Erkennung der MHCs enthalten. CD94/NKG2A und -B sind heterodimere Glykoproteine, die über zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Trotz der Unterschiede in ihrer extrazellulären Region wirken sie ähnlich auf die NK-Zellen. Dies liegt an dem Aufbau ihres zytoplasmatischen Abschnitts. Sie besitzen ITIMs (*immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motifs*) und nehmen somit eine wichtige Rolle in der Supprimierung autoreaktiver Wirkungen der NK-Zellen ein. Sie verhindern deren Aktivierung, ihre zytotoxischen Effekte sowie die Ausschüttung von Zytokinen. Sie sind polymorph und unterscheiden sich in der Spezifität für die einzelnen Untergruppen der MHC-Klasse I-Moleküle. Jede NK-Zelle enthält mindestens einen inhibitorischen Rezeptor (Chini und Leibson, 2001; Lopez-Botet und Bellon, 1999).

Zu den KARs (killer cell-activating receptors) gehört eine weitere Gruppe der MHC-Klasse I-spezifischen Rezeptoren aus der C-Typ Lektin Familie, CD94/NKG2C, -E und -H. Strukturell bilden sie ebenfalls Heterodimere. Als Unterschied zu den inhibitorischen Rezeptoren sind sie intrazellulär nicht-kovalent an DAP12 gebunden; dieses Molekül trägt als funktionelle Einheiten *Immunoreceptor tyrosin-based activatory motifs* (ITAMs). Über die Phosphorylierung von Tyrosinen rekrutieren sie ZAP-70 oder Syk und vermitteln so die Aktivierung der NK-Zellen (Borrego et al., 2002; Chini und Leibson, 2001; Lopez-Botet und Bellon, 1999).

Die Wirkung der NK-Zellen ist abhängig von dem Verhältnis von positiven und negativen Signalen. Unter physiologischen Bedingungen ist die Anzahl der MHC-Klasse I-Moleküle auf der Zelloberfläche relativ hoch. Diese zeigen eine hohe Bindungskapazität für Rezeptoren, die die NK-Zellen inhibieren. Dadurch sind gesunde Zellen relativ resistent gegenüber der Aktivierung und zytotoxischen Wirkung der NK-Zellen. Ist die Zelle virusinfiziert oder exprimiert mutierte Proteine, so werden weniger MHC-Klasse I-Moleküle gebildet. Sie haben dadurch eine geringere Affinität und Wirkung auf die inhibitorischen Rezeptoren. Zusätzlich binden die mit körperfremden Peptiden beladenen MHC-Klasse I-Moleküle an aktivierende Rezeptoren der NK- und T-Zellen. Dieser Vorgang wird auch natürliche Zytotoxizität genannt, da bei der Aktivierung der NK-Zellen keine Anwesenheit und vorherige Sensibilisierung von Antikörpern notwendig ist (Chini und Leibson, 2001; Lopez-Botet und Bellon, 1999).

1.2.3.4 Genetik und Klassifikation der MHC-Klasse I-Region

Bei der MHC-Klasse I-Region handelt es sich um eine Sequenz von knapp 1,8 Mb Länge. Sie beginnt bei dem Gen *MICB* und endet bei *HLA-F*. Sie gehört im menschlichen Genom zu den Regionen, die die höchste Dichte an Genen und potentiell kodierenden Sequenzen aufweisen. Zu den klassischen MHC-Klasse I-Genen gehören *HLA-A*, *-B* und *-C*. Sie werden auch als Klasse IA Gene bezeichnet. Ihre Merkmale sind das Vorhandensein auf allen kernhaltigen Zellen, ein hoher Polymorphismus, der sie zahlreiche unterschiedliche Peptide binden lässt, und die Bindung an $\alpha\beta$ T-Zell Rezeptoren der CD8+ T-Zellen. Die restlichen Gene werden als nicht-klassische MHC I-Gene bezeichnet. Sie werden nach der Taxonomie von *Hughes* von 1999 weiter unterteilt. Zu der Gruppe der Klasse IB Gene zählen *HLA-E*, *-F* und *-G*. Sie weisen eine geringere Variabilität auf (*Bahram und Spies*, 1996). Unter physiologischen Bedingungen sind sie nicht auf der Zelloberfläche exprimiert und interagieren somit nicht mit T-Zellen (*Fodil et al.*, 1996). Eine Ausnahme macht das HLA-G, das im plazento-maternalen Mutter-Kind-Übergang eine wichtige Rolle bezüglich einer Toleranzentwicklung gegenüber dem semiallogenen Fetus spielt (*Lopez-Botet et al.*, 2000; *Maurice et al.*, 2001). HLA-G kann weiterhin natürliche Killerzellen inhibieren, indem es deren transendotheliale Migration vermindert und die Zytokinausschüttung zu Gunsten von CD4+ T-Zellen verändert (*Carosella et al.*, 2001). *HLA-G* wird auf Thymus-, Leber-, Intestinal- und Plazentazellen exprimiert. *MICA*, *MICB* und *Hfe* werden zu den Klasse IC Genen gezählt. Die Klasse ID Gene umfassen *FcRn*, *Zink α 2-Glykoprotein*, *MR I* und *CD I*. Sie sind strukturell mit den MHC-Klasse I-Molekülen verwandt, ihre Gene befinden sich jedoch auf anderen Chromosomen, außerdem sind sie nicht polymorph (*Hughes et al.*, 1999).

1.2.3.5 Haplotypen im MHC-Komplex

Die Gene im MHC-Komplex befinden sich in ausgeprägten Kopplungsungleichgewichten, das bedeutet, dass die verschiedenen Allele der Gene nicht in beliebiger Kombination nach ihren Häufigkeiten vorliegen, sondern dass bestimmte Allelkombinationen überzufällig häufig vorkommen. Diese Kombinationen, die auf einem Chromosom liegen, nennt man Haplotypen. Kopplungsungleichgewichte bestimmter Allele sind umso wahrscheinlicher, je näher die betreffenden Gene beieinander liegen; die Allele können sich jedoch auch über längere Entfernungen im Kopplungsungleichgewicht befinden. So erstreckt sich beispielsweise der

Haplotyp HLA-A1-HLA-B8-HLA-DR3 von der MHC-Klasse I-Region bis zur MHC-Klasse II-Region (Foissac et al., 2000).

1.2.4 MHC I chain-related Gene (MIC)

1.2.4.1 Einteilung und Funktion der MIC-Gene

Die Entdeckung der MHC I chain-related (MIC) Gene geht auf *Seiamak Bahram* und Mitarbeiter zurück. Im Gegensatz zu den anderen MHC-Molekülen kommen sie nicht in allen Säugetierspezies vor (Bahram et al., 1994). Zur Gruppe der MIC-Gene rechnet man sieben Gene, *MICA* bis *MICG* (Bolognesi et al., 2001). Von diesen Genen werden nur *MICA* und *MICB* als Proteine exprimiert; bei den restlichen Genen handelt es sich um Pseudogene (Bahram und Spies, 1996).

MICA und *MICB* kommen im Gegensatz zu den klassischen MHC-Klasse I-Molekülen nicht auf allen kernhaltigen Zellen vor. Auf B- und T-Lymphozyten konnten sie beispielsweise nicht nachgewiesen werden (Bahram et al., 1994). Sie werden vor allem auf epithelialen Zellen, Keratinozyten, Fibroblasten und Monozyten exprimiert (Zwirner et al., 1998). Außerdem sind sie stressinduziert und werden als Antwort auf Hitzeschock (Groh et al., 1998; Groh et al., 1996), oxidativen Stress (Yamamoto et al., 2001), Infektionen (Groh et al., 2001) und DNA-Schädigungen (López-Arbesu et al., 2007; Tang et al., 2008) vermehrt synthetisiert. Dadurch signalisieren sie eine zelluläre Schädigung und rufen eine Immunantwort hervor. Auf normalen Zellen werden die MIC-Proteine nicht oder nur in geringer Anzahl exprimiert, wahrscheinlich als Schutzmechanismus vor der Zytotoxizität MIC-induzierter NK-Zellen (Molinero et al., 2006). *MICA* wird schon bei geringerem Zellschaden vermehrt exprimiert, während für die erhöhte Expression von *MICB* eine ausgeprägtere Schädigung der Zelle erforderlich ist (Venkataraman et al., 2007). Im Gegensatz zu anderen MHC-Klasse I-Molekülen werden sie nicht durch γ -Interferon stimuliert (Bahram et al., 1994).

Nach aktueller Meinung werden die MIC-Moleküle insbesondere auf den epithelialen Zellen des gesamten Intestinaltrakts, und damit auch in der Mundschleimhaut, auf den endothelialen Zellen und auf Fibroblasten exprimiert (Choy und Phipps, 2010) und von $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen gebunden. Dort spielen sie eine wichtige Rolle in der Immunantwort, indem sie an der Erkennung von infizierten, geschädigten oder generell gestressten Epithelzellen beteiligt sind (Groh et al., 1998). Als Ligand für *MICA* und *MICB*-Moleküle dient der NKG2D-Rezeptor auf NK-Zellen und intraepithelialen T-Zellen. Werden ausreichend viele *MICA* und

MICB-Moleküle auf den Zielzellen exprimiert, so können NK- und T-Zellen aktiviert werden und zu einer Lyse der befallenen Zelle führen (Bauer et al., 1999; Schrambach et al., 2007). Somit wird vermutet, dass die MIC-Moleküle sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunantwort beeinflussen können und neben anderen Funktionen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von chronisch entzündlichen Erkrankungen spielen (Lopez-Hernandez et al., 2010).

1.2.4.2 Strukturen der MIC-Moleküle

Die MIC-Moleküle sind strukturell sehr ähnlich den oben beschriebenen klassischen MHC-Klasse I-Molekülen. Sie besitzen ebenfalls die extrazellulären Domänen $\alpha 1$ bis $\alpha 3$, eine transmembrane Region und einen zytoplasmatischen Schwanz. Als wesentlicher Unterschied sind sie nicht mit $\beta 2$ -Mikroglobulin assoziiert (Groh et al., 1996). Des Weiteren ist ihr Polymorphismus nicht nur auf die Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf die $\alpha 3$ -Domäne. Die dreidimensionale Struktur von MICA und MICB weist eine Deletion von fünf Aminosäuren an den Positionen 45 bis 49 in der $\alpha 1$ -Domäne auf. Dieser Bereich korrespondiert mit der Peptidbindungsstelle der klassischen MHC-Klasse I-Moleküle. Wie bereits erwähnt, gelten vor allem Tyrosinreste als Bindungsstellen für Peptide. Von vier bekannten Tyrosinresten fehlen bei MICA zwei. An Position 147 in der $\alpha 2$ -Domäne am Rande der Bindungstasche sind zusätzliche sechs Aminosäuren inseriert. Des Weiteren fehlen den MIC-Molekülen bestimmte Abschnitte, die für die Bindung mit dem CD8-Rezeptor von Bedeutung sind (Ando et al., 1997; Bahram et al., 1994). Diese strukturellen Unterschiede führen dazu, dass die MIC-Moleküle keine Peptide präsentieren, obwohl dies theoretisch möglich wäre. Trotz fehlender Peptidbindung erreichen die Moleküle eine ausreichende Stabilität (Groh et al., 1996).

Die Wirkung der MICA- und MICB-Moleküle auf die NK- und T-Zelle ist somit unabhängig von einer Peptidbindung. Der Aktivierungsgrad bzw. das Lysepotential der NK- und T-Zellen ist abhängig von der Anzahl der exprimierten MIC-Moleküle auf der Oberfläche der Zielzellen.

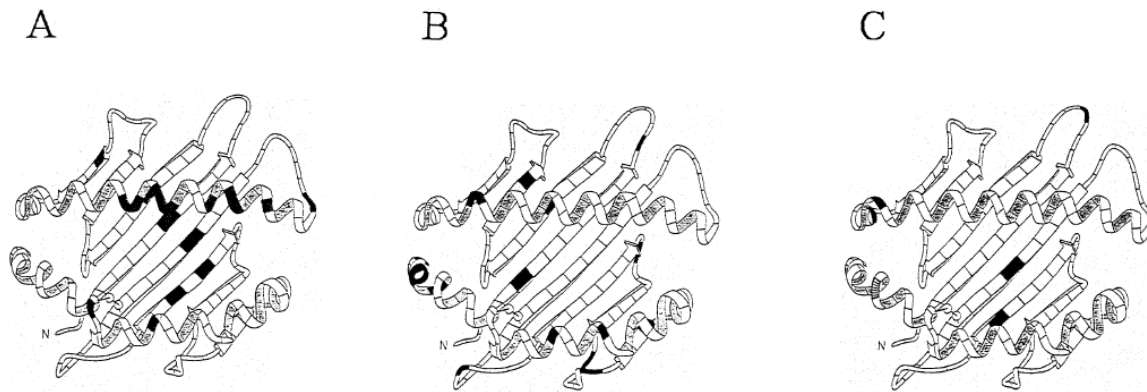


Abb. 1.2: A: Klassisches MHC-Klasse I-Molekül, B: MICA, C: MICB. Variable Stellen sind schwarz gekennzeichnet. Die für die Peptidbindung verantwortlichen α -Helices sind bei MICA und MICB im Gegensatz zu den klassischen MHC-Klasse I-Molekülen weitestgehend strukturstabil (Quelle: Ando, 1997)

1.2.4.3 Rolle des NKG2D-Rezeptors als Ligand für NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen

In der Funktion der MIC-Moleküle spielt der NKG2D-Rezeptor eine entscheidende Rolle. Er gehört auch zu der Gruppe der C-Typ Lektin-Rezeptoren, wie die oben beschriebenen Rezeptoren der NKG2-Familie, obwohl er mit diesen nur eine geringe Homologie aufweist. Im Gegensatz zu diesen ist er kein inhibitorischer Rezeptor und unterscheidet sich strukturell dadurch, dass er kein Dimer mit CD94 bildet, sondern die Struktur eines Homodimers hat. Er setzt sich zusammen aus zwei β -Faltblättern, zwei α -Helices, vier Disulfidbrücken und einem zusätzlichen β -Faltblatt, das ihn von den anderen Rezeptoren der C-Typ Lektin-Familie unterscheidet (Vivier et al., 2002). NKG2D ist mit DAP10 assoziiert, das mit Hilfe eines zytoplasmatischen Motivs intrazellulär die Rezeptoraktivierung vermittelt (Roda-Navarro und Reyburn, 2009). Diese wird durch die Aktivierung der p85 Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase erreicht. Außerdem werden durch Vermittlung von NKG2D Kalzium mobilisiert und zusätzlich Kinasen aktiviert (Borrego et al., 2002; Vivier et al., 2002; Wu et al., 1999). Somit führt die Bindung des Rezeptors NKG2D an MICA oder MICB zur Aktivierung mehrerer Signalkaskaden in der Zelle. Neben den MIC-Molekülen gibt es auch noch andere Moleküle, die an NKG2D binden, wie ULBP oder RAET (Eagle et al., 2006). NKG2D wird auf NK-Zellen, sowie auf $\gamma\delta$ und CD8⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen exprimiert (Bauer et al., 1999; Vivier et al., 2002). Während die Stimulierung auf NK-Zellen ausreichend ist um die

Zelle zu aktivieren und die Zielzelle zu lysieren, dient es auf T-Zellen als Co-Rezeptor. Neben NKG2D muss hier der T-Zell-Rezeptor aktiviert werden um die maximal mögliche Lyseaktivität zu erreichen (Ehrlich et al., 2005).

1.2.4.4 Genetische Struktur und Besonderheiten von MICA und MICB

Die MIC-Gene liegen in der Klasse I-Region des MHC. Das *MICA*-Gen befindet sich ca. 40 kb zentromerwärts von dem klassischen MHC-Klasse I-Gen *HLA-B*. Nach ca. 70 Kilo Basen (kb) folgt das *MICB*-Gen, das am zentromerwärtigen Ende der MHC-Klasse I-Region am Übergang zur MHC-Klasse III-Region liegt. Die restlichen *MIC*-Gene liegen verstreut über die gesamte MHC-Klasse I-Region (The MHC sequencing consortium, 1999). Auf Grund von mehreren Punktmutationen und/oder Deletionen handelt es sich bei ihnen um Pseudogene, die kein funktionelles Protein kodieren (Bahram et al., 1996). Das *MICA* und *MICB* sind ungewöhnlich lange Gene. Das *MICA*-Gen umfasst 11722 bp und das *MICB*-Gen 12930 bp. Sie sind sich in ihrer genetischen Organisation sehr ähnlich, unterscheiden sich jedoch von der Genstruktur der anderen Klasse I-Gene. Zum einen werden die ersten beiden Exons von einem grossen Intron getrennt, bei *MICA* zählt dieses Intron 6840 bp, bei *MICB* 7352 bp. Zum anderen kodiert das sechste Exon gemeinsam für den zytoplasmatischen Schwanz und die 3'-untranslatierte Sequenz. Dieses Exon ist für den Längenunterschied von ca. 1 kb zwischen den beiden Genen verantwortlich, da es in *MICA* 302 bp und in *MICB* 1338 bp umfasst (Bahram et al., 1996b; Bahram et al., 1996a).

Ähnlich wie in den anderen MHC I-Genen kodiert das Exon 1 für das Signalpeptid, die Exons 2 bis 4 kodieren die $\alpha 1$ bis $\alpha 3$ -Domänen und das Exon 5 für die transmembrane Region.

Als Besonderheit existiert auch ein *MICA-MICB*-Null-Haplotyp. Dieser ist gekennzeichnet durch die Deletion einer 100 kb großen Sequenz, die im *MICA*-Gen liegt, und das Vorhandensein eines Stop-Kodons im Exon 3 des *MICB*-Gens. Für diesen Null-Haplotyp homozygote Personen sind, trotz des Fehlens funktioneller *MICA* und *MICB*-Proteine, phänotypisch normal. Entdeckt wurde dieser Haplotyp in Japan und weist dort eine Frequenz von 3,8% auf. Auch bei den Ureinwohnern Nordamerikas ist dieser Haplotyp häufig, während er in der kaukasischen Bevölkerung eher selten auftritt (Ando et al., 1997; Bahram et al., 2005; Komatsu-Wakui et al., 1999).

Auf der einen Seite weisen die *MICA* und *MICB* Gene einen hohen Verwandtschaftsgrad besonders in ihren kodierenden Sequenzen für die extrazellulären Regionen auf. Die

Sequenzübereinstimmung beträgt 91% für Exon 2, 90% für Exon 3 und 98% für Exon 4 (Bahram et al., 1996b). Auf der anderen Seite unterscheiden sie sich gerade hier von den übrigen MHC-Klasse I-Molekülen. Die durchschnittliche Sequenzübereinstimmung liegt bei nur 19% für Exon 2, bei 25% für Exon 3 und bei 35% für Exon 4 (Bahram et al., 1994; Fodil et al., 1996). Diese Tatsache macht *MICA* und *MICB* zu den bezüglich der Nukleotidsequenzen am meisten abweichenden Genen innerhalb der MHC I-Klasse-Gene. Wahrscheinlich ist dies durch eine früh unabhängige Entwicklung in der Evolution zu erklären. Dies hat zu den Unterschieden in der Struktur und der Funktion der MIC-Moleküle gegenüber den übrigen MHC-Klasse I-Molekülen geführt (Bahram et al., 1994; Fodil et al., 1996).

Auch in ihrem Grad der Variabilität unterscheiden sie sich von den klassischen MHC-Klasse I-Molekülen. Dabei werden die Gene in Allele unterteilt, die sich an einem bestimmten Genlocus befinden und durch Variationen die Vielfalt des Gens ausmachen. Während bislang 1601 Allele für *HLA-A*, 2125 Allele für *HLA-B* und 1102 Allele für *HLA-C* entdeckt wurden, zeigen sich *MICA* mit 76 Allelen und *MICB* mit 31 Allelen zwar polymorph, aber erreichen nicht die Werte der klassischen MHC-Klasse Ia Familie (Stand: März 2011, EMBL-Genbank)

1.2.4.5 Kopplungsungleichgewichte mit den MIC-Genen

Es bestehen starke Kopplungsungleichgewichte zwischen *MICA* bzw. *MICB* und den anderen Genen des MHC. Wie erwartet existiert ein starkes Kopplungsungleichgewicht zwischen *MICA* und *HLA-B* auf Grund ihrer physikalischen Nähe (Gao et al., 2006). *MICB* weist ein Kopplungsungleichgewicht zu *HLA-B* und zu *TNF* auf. Hervorzuheben ist die eher geringe Assoziation zwischen *MICA* und *MICB*, als man auf Grund der physikalischen Nähe erwarten könnte (Bolognesi et al., 2001). Dies könnte die These eines Rekombinations-Hot-Spots zwischen den beiden Regionen bestätigen, zumal sich zwischen den beiden Loci ein TA-Dinukleotid-Polymorphismus mit ca. 1000 Wiederholungen befindet, der einen dieser Hot-Spots repräsentieren könnte (Ando et al., 1997; Kimura et al., 1998b; Shiina et al., 1998). Für den Mikrosatelliten *CI_4_1* ist ein starkes Kopplungsungleichgewicht mit *HLA-B* beschrieben worden, das auf Grund der physikalischen Nähe auch zu erwarten war (Glas et al., 2001).

1.2.4.6 Assoziationen zwischen MICA und MICB mit unterschiedlichen Erkrankungen

Einige Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises wurden mit Varianten des MICA assoziiert. Meist wurde dabei der Trinukleotid-Mikrosatellitenpolymorphismus der transmembranen Region des *MICA*-Gens (*MICA-TM*) untersucht. So wurde beispielsweise für *MICA-TM* A6 eine Assoziation mit dem Morbus Behçet beschrieben (Mizuki et al., 1997). Im Gegensatz dazu, zeigte sich keine Korrelation zwischen *MICB-CI_2_A*-Mikrosatelliten und dem Morbus Behçet (Kimura et al., 1998b). Dagegen wies eine Studie an einer japanischen Kohorte eine Assoziation des *MICA-TM*-Polymorphismus mit der Takayasu-Arteriitis nach (Kimura et al., 1998a). Eine spanische Studie erbrachte ebenfalls eine Assoziation mit der Riesenzellartheritis; hier war die Häufung des TM A5 bei den Patienten signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Gonzalez-Gay et al., 2007). Die akute anteriore Uveitis wurde mit dem TM A4 assoziiert (Goto et al., 1998). Für das TM A5 konnten Assoziationen mit dem systemischen Lupus erythematoses nachgewiesen werden (Gambelunghe et al., 2005). Das TM A5.1 wies eine Assoziation mit Patienten mit einer Colitis ulcerosa auf (Ding et al., 2005). Für das *MICB* konnte eine Assoziation mit der rheumatoiden Arthritis nachgewiesen werden (López-Arbesu et al., 2007). Durch die unkontrollierte Expression der MIC-Moleküle auf der Zelloberfläche können auch Immunreaktionen getriggert werden, die zu einer schädlichen Wirkung für den Patienten führen. Dies gilt beispielsweise für die Zöliakie (Caillat-Zucman, 2006; Ding et al., 2005; Rodriguez-Rodero et al., 2006). Auch beim Morbus Addison zeigte sich eine Assoziation mit einzelnen *MICA-TM*- und *MICB-CI_2_A*-Varianten (Gambelunghe et al., 1999). Für den Diabetes mellitus Typ I wurden ebenfalls starke Assoziationen mit dem *MICA-TM*-Polymorphismus gefunden (Gambelunghe et al., 2007; Van Autreve et al., 2006).

Des Weiteren werden MICA und MICB vermehrt auf epithelialen Tumorzellen exprimiert und mit einer möglichen tumoreigenen Kontrollfunktion in Verbindung gebracht. Dies wurde bei Tumoren der Brust, der Nieren, des Ovar, der Prostata und des Kolon beobachtet (Groh et al., 1999).

Außerdem wurde für die orale submuköse Fibrose eine Assoziation mit der Variante A6 im *MICA-TM* beschrieben (Liu et al., 2004). Für die gleiche Variante wurde auch eine Häufung bei Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom entdeckt (Liu et al., 2002).

Untersuchungen des *CI_4_1*-Polymorphismus haben ebenfalls Assoziationen mit chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie dem Morbus Behçet und der Spondylarthropathie, gezeigt (Thomas et al., 2006).

Im Bezug auf die chronische Parodontitis liegen bislang keine Daten zur Assoziation mit dem *MICA-TM*-, dem *MICB-CI_2_A*- oder dem *CI_4_1*-Polymorphismus vor.

1.3 Untersuchte Mikrosatelliten

1.3.1 *MICA-TM*

Als Mikrosatelliten bezeichnet man DNA-Sequenzen von tandemartig wiederholten kurzen Basenmotiven von 2 bis 10 bp; im Englischen werden sie als *short tandem repeats* (STRs) bezeichnet. Sie erstrecken sich gewöhnlich über eine Länge von weniger als 60 bp und enthalten als Sequenzmotive meist Di-, Tri- oder Tetranukleotide (Hamada und Kakunaga, 1982; Weber und Wong, 1993).

Der hier untersuchte Mikrosatellitenpolymorphismus liegt im Exon 5 des *MICA*-Gens, das der transmembranen Domäne entspricht. Er ist der am häufigsten untersuchte Polymorphismus im *MICA*-Gen.

Der *MICA-TM*-Mikrosatellitenpolymorphismus besteht aus einem GCT Trinukleotid. Die Anzahl der Wiederholungen ergibt die verschiedenen Varianten. Im Folgenden werden diese als Allele bezeichnet. Zu den häufigen Allelen zählen A4, A5, A5.1, A6 und A9; dagegen sind A7, A8 und A10 relativ selten. Bei dem Allel A5.1 ist zwischen dem zweiten und dritten Triplet ein zusätzliches G eingeschoben, dies führt zu einer Leserasterverschiebung, so dass dadurch ein vorzeitiges Stopcodon entsteht. Dies hat zur Folge, dass die transmembrane Domäne verkürzt ist und der zytoplasmatische Schwanz fehlt. Dadurch kommt es zum fehlerhaften Einbau in die Plasmamembran. Das Molekül ist nicht, wie normalerweise üblich, in der basolateralen Plasmamembran lokalisiert, sondern wird in der apikalen Oberflächenmembran exprimiert (Suemizu et al., 2002). Das Allel A5.1 ist in der europäischen Population mit einer Häufigkeit von etwa 40% vertreten. Träger dieser Variante synthetisieren trotzdem funktionelle MICA-Moleküle; dies ist durch den positiven Nachweis der Oberflächenexpression von MICA auf der für das Allel 008 homozygoten Zelllinie HeLa (Groh et al., 1999), das in Exon 5 das Allel A5.1 beinhaltet (Fodil et al., 1996), bewiesen.

1.3.2 *MICB-C1_2_A*

Im Intron 1 des *MICB*-Gens liegt ein Mikrosatellitenpolymorphismus mit einem CA-Dinukleotid-Polymorphismus. Von diesem sind bislang 16 Allele bekannt (Foissac et al., 2000). Je nach Anzahl der CA-Wiederholungen werden sie als CA14 bis CA29 bezeichnet.

1.3.3 *C1_4_1*

Der Mikrosatellit *C1_4_1* liegt zwischen *MIC-A* und *HLA-B* in einer Entfernung von 6 kb vom *HLA-B*. Er entspricht einem Tetranukleotidrepeat mit der Sequenz CAAA. Die Anzahl der Wiederholungen liegt zwischen vier und neun. Daraus ergeben sich sechs Allele, die mit Allel 1-6 bezeichnet werden. Die Fragmentlänge des Mikrosatelliten liegt zwischen 213 und 233 bp (Foissac et al., 2000; Glas et al., 2001). Die physikalische Nähe zum *HLA-B*-Gen bedingt ein starkes Kopplungsungleichgewicht zwischen beiden Loci (Tamiya et al., 1998). Deshalb soll der Mikrosatellitenpolymorphismus *C1_4_1* stellvertretend für eine mögliche Assoziation von *HLA-B* zur chronischen Parodontitis untersucht werden.

2. Ziele der Studie

Die Ursachen der chronischen Parodontitis sind zu einem großen Teil noch ungeklärt. Die Genetik scheint hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen. Allerdings zeigten die bisherigen Studien widersprüchliche Ergebnisse oder nicht ausreichende Assoziationen der untersuchten Polymorphismen mit der chronischen Parodontitis. Ziel dieser Arbeit war es, den möglichen Einfluss der nichtklassischen MHC-Klasse Ic-Gene *MICA* und *MICB* auf die Pathogenese der chronischen Parodontitis zu untersuchen. Als Kandidatengene sind sie insofern anzusehen, da

- a) sie im oralen Epithel exprimiert werden,
- b) ihre Expression durch oxidativen Stress sowie virale oder bakterielle Entzündungen induziert wird,
- c) sie eine wichtige Rolle in der Immunreaktion spielen,
- d) andere HLA Gene bereits Assoziationen mit der chronischen Parodontitis gezeigt haben.

Primär wurden die Allelfrequenzen der untersuchten Mikrosatellitenmarker *MICA-TM* und *MICB-CI_2_A* bei Patienten mit chronischer Parodontitis mit den Allelfrequenzen bei gesunden, unverwandten Kontrollpersonen verglichen. Dabei wurde untersucht, ob bestimmte Allele bei der Gruppe der Patienten signifikant häufiger oder seltener als in der Kontrollpopulation sind und sich dadurch eine Assoziation mit der Parodontitis ergibt.

Außerdem wurde der Einfluss des *HLA-B*-Gens sowie bestimmter Haplotypen der *MICB-MICA-HLA-B*-Region auf die Erkrankung betrachtet. Dazu wurde zusätzlich der Mikrosatellit *CI_4_1*, der durch seine physikalische Nähe zu *HLA-B* eng mit diesem Gen assoziiert ist, getestet. Das starke Kopplungsungleichgewicht zwischen *HLA-B* und *CI_4_1* wurde durch eine Studie zu bestimmten Zelllinien gezeigt (Tamiya et al., 1998). Zweipunkt- und Dreipunkthaplotypen aus den Markern *MICA-TM*, *MICB-CI_2_A* und *CI_4_1* wurden für die Patientengruppe und die Kontrollgruppe berechnet und miteinander verglichen. Eventuell abweichende Frequenzen bestimmter Haplotypen sollten eine mögliche Assoziation mit der chronischen Parodontitis zeigen.

3. Material

3.1 Studienpopulation

3.1.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 389 Patienten mit chronischer Parodontitis aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Universität München in die Studie aufgenommen. Alle Studienpatienten waren kaukasischer Herkunft. Der Altersdurchschnitt lag bei 54,0 Jahren (Standardabweichung $\pm 11,1$) und die Altersverteilung war zwischen 18 und 84 Jahren. Das Verhältnis von Männern zu Frauen war bei 47,5% zu 52,5% (Tabelle 2.2). Voraussetzung für die Aufnahme in die Studie war eine anhand eines standardisierten Protokolls zur Erhebung des parodontalen Status gestellte Diagnose einer chronischen Parodontitis. Dieses Protokoll beinhaltete die Evaluierung (1) der Sondiertiefe, gemessen an sechs Stellen eines Zahns (mesio-bukkal, bukkal, disto-bukkal, mesio-lingual, lingual, disto-lingual) unter Benutzung der Michigan Type „O“ Sonde, (2) der Furkationsbeteiligung mit Hilfe der Sonde nach Nabers, (3) der Blutungsneigung nach Sondierung registriert als vorhanden oder nicht vorhanden und (4) des Knochenverlusts erhoben durch ein Orthopantomogramm.

Die Sondiertiefe wurde definiert als der Abstand vom freien Gingivarand bis zum Grund der parodontalen Tasche bei einer Sondenposition in Längsachse des Zahns. Zur Beurteilung des Furkationsbefalls wurde außerdem die Durchgängigkeit der Furkation mittels horizontaler Sondierung gemessen. Gemäß des Protokolls von *Nyman* und *Lindhe* wurde der Furkationsbefall in drei Grade eingeteilt: (1) horizontaler Attachmentverlust bis 3 mm, (2) horizontaler Attachmentverlust von mehr als 3 mm, nicht durchgängig und (3) durchgängiger Furkationsbefall (Nyman und Lindhe, 1997).

Zur Aufnahme in die Studie mussten die Patienten folgende Kriterien erfüllen: (1) mindestens 15 Zähne in situ, (2) ≥ 8 Zähne mit einer Sondiertiefe ≥ 5 mm bzw. einen Attachmentverlust von ≥ 2 mm an mindestens einer Stelle oder einer Furkationsbeteiligung \geq Klasse II, (3) der Nachweis des Knochenverlustes manifestiert als der Abstand zwischen dem Alveolarkamm und der Schmelz-Dentin-Grenze ≥ 3 mm um den befallenen Zahn. Die in die Studie einbezogenen Patienten wurden auf Grundlage der oben beschriebenen Kriterien in milde, mittelschwere und schwere Parodontitis eingeteilt. Die Klassifikation ist in Tabelle 3.1 aufgelistet. Patienten, die klinische, radiologische und/oder mikrobiologische Symptome einer aggressiven Parodontitis gemäß der Einteilung von *Tonetti* und *Mombelli* (Tonetti und Mombelli, 1999) aufwiesen, wurden von der Studie ausgeschlossen.

In der Patientengruppe gaben 32 % der Personen an, Raucher zu sein. Als Raucher wurden Personen klassifiziert, die angaben, mehr als 10 Zigaretten pro Tag in einem Zeitraum von mindestens einem Jahr zu rauchen.

Als Material zur DNA-Gewinnung für die Studie wurde venös entnommenes Vollblut verwendet.

	Parodontitis (mild)	Parodontitis (mittelschwer)	Parodontitis (schwer)
Maximale Sondiertiefe	6 mm	8 mm	> 8 mm
Attachementverlust > 30%	< 5 Zähne	< 8 Zähne	≥ 8 Zähne
Attachementverlust > 50%	keine	< 8 Zähne	≥ 8 Zähne

Tabelle 3.1 Kriterien zur Statifikation der Untersuchungsgruppe nach dem klinischen Stadium der Parodontalerkrankung

3.1.2 Kontrollkollektiv

Als Kontrollkollektiv dienten 771 gesunde, unverwandte Blutspender. Der Altersdurchschnitt lag bei 47,4 Jahren (Standardabweichung $\pm 9,2$), die Altersverteilung lag zwischen 31 und 68 Jahren. Das Verhältnis von Männern zu Frauen wurde mit 67,1 % zu 32,9 % angegeben (Tabelle 3.2). Sie waren alle kaukasischer Herkunft und durften keine klinischen Anzeichen einer chronischen Parodontitis aufweisen. Die Aufnahmekriterien waren (1) mindestens 22 Zähne in situ, (2) ≤ 1 Stelle mit einer sondierten Taschentiefe von ≥ 3 mm, (3) keinerlei Furkationsbefall und (4) keine systematische und generalisierte Parodontaltherapie in den letzten fünf Jahren. Des Weiteren wurden Personen mit gravierendem Medikamentenmissbrauch, Diabetes mellitus, erhöhtem Risiko für bakterielle Endokarditis und Frauen in Schwangerschaft von der Studie ausgeschlossen. In der Kontrollgruppe wurden 12,6 % als Raucher klassifiziert.

Aus praktischen und ethischen Gründen wurde auf eine Röntgenkontrolle verzichtet. Die Studie richtete sich nach den ethischen Grundlagen der Helsinki Deklaration und wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in

München geprüft (Nr. 290/01). Alle Teilnehmer gaben vor der Aufnahme in die Studie ihr schriftliches Einverständnis.

	Patientengruppe	Kontrollgruppe
Anzahl	389	771
Altersdurchschnitt ± Standardabweichung (Jahre)	54,0 ± 11,1	47,4 ± 9,2
Altersverteilung (Jahre)	18 – 84	31 - 68
Geschlechtsverhältnis (männlich /weiblich)	47,5 % / 52,5 %	67,1 % / 32,9 %
Raucher/Nichtraucher	32,0 % / 68 %	12,6 % / 87,4 %

Tabelle 3.2 Basisdaten des Studienkollektivs

3.2 Kits und Chemikalien

3.2.1 Materialien für DNA-Isolierung

Ethanol absolut	Merck
Isopropylalkohol (2-Propanol)	Merck
Proteinkinase K	Qiagen
QIAamp® DNA Blood Mini Kit	Qiagen
gesättigte Natriumchloridlösung	5 M NaCl
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung	20 %
Erythrozyten-Lyse-Puffer:	155 mM NH ₄ Cl 400 mM NaCl 1 mM EDTA
Kernlysepuffer:	10 mM Tris/HCl pH 8 400 mM NaCl 10 mM EDTA
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 8 1 mM EDTA

3.2.2 Materialien für die Polymerasekettenreaktion und für die Reinigung der PCR-Produkte

Aqua ad injectabilia	Braun
Desoxynukleotid-Mix (dNTP, je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Sigma
HotStarTaq™ DNA-Polymerase	Qiagen
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen

3.2.3 Materialien für die Agarosegelelektrophorese

100 bp DNA Molekulargrößenstandard	Cambrex
Agarose, Typ I-A	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Polaroidfilm Typ 667	Polaroid
10 × TBE:	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA pH 8
DNA-Auftragspuffer:	10 mM Tris/HCl pH 8 2 mM EDTA 20 % Ficoll 400 0,25 % Orange G

3.3 Zelllinien und Goldstandards für die Fragmentanalyse

Als Goldstandards bei der Fragmentanalyse diene genomische DNA von auf dem X. International Histocompatibility Workshop klassifizierten Zelllinien mit bekannten Genotypen im Bezug auf *MICA-TM*, *MICB-C1_2_A* und *C1_4_1*. BOLETH (XIIHW-Nr. 9031, GeneBank accession number U65416), BM9 (XIIHW-Nr. 9068), BM-16 (XIIHW-Nr.

9038), BSM (XIIHW-Nr. 9032), HHKB (XIIHW-Nr. 9065), PE117 (XIIHW-Nr. 9028), PITOUT (XIIHW-Nr. 9051), SCHU (XIIHW-Nr. 9013), VAVY (XIIHW-Nr. 9023) und WT47 (XIIHW-Nr. 9063). Diese Goldstandards wurden durch Sequenzierung der Mikrosatellitensequenzen und Analyse durch eine kommerzielle Sequenzierungsfirma (Sequiserve, Vaterstetten, Deutschland) validiert. Nach Bestätigung der bereits beschriebenen Ergebnisse (Bolognesi et al., 2001; Tamiya et al., 1998) konnte durch Mischen der PCR-Produkte eine Allelleiter hergestellt werden, die für die Analyse der PCR-Produkte aus der Patienten- bzw. Kontrollgruppe als Goldstandard diene.

3.4 PCR-Primer

Primer ohne angegebene Referenz wurden für diese Arbeit mit Hilfe des Programms MacVector™ Version 6.5 ausgewählt. Alle Primer wurden von TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland, synthetisiert.

3.4.1 Primer für die Fragmentanalyse

3.4.1.1 *MICA-TM*-Primer

Name	Sequenz (5'→3'-Richtung)
MICA-TM-5'	CAGAGTCATTGGCAGACA (5'-Joe6-Markierung)
MICA-TM-3'	TTCTTCTTACAACAACGGAC

3.4.1.2 *MICB-C1_2_A*-Primer

Name	Sequenz (5'→3'-Richtung)
MICB-5'	ATACAGGGGCTTCAGTTTCTCTACC
MICB-3'	ACCAATCAGGGTGGCTATTATCA (5'-Fam6-Markierung)

3.4.1.3 *C1_4_1*-Primer

Name	Sequenz (5'→3'-Richtung)
C1_4_1-5'	CGAGAGAACAACACTGGCAGGACTG
C1_4_1-3'	GACAGTCCTCATTAGCGCTGAGG (5'-Fam6-Markierung)

3.4.2 Primer für die Sequenzierung

3.4.2.1 *MICA-TM*-Primer

Name	Sequenz (5'→3'-Richtung)
MICA-TM-5'	CGGGAATCACAGCACTCACC
MICA-TM-3'	CAACATGCCTATCTTTGCAGGAGC

3.4.2.2 *MICB-C1_2_A*-Primer

Name	Sequenz (5'→3'-Richtung)
MICB-5'	CCATAGTGTTTTCCATTGCAGGC
MICB-3'	AGCCATGAGAAGCTATGTGGGG

3.4.2.3 *C1_4_1*-Primer

Name	Sequenz (5'→3'-Richtung)
C1_4_1-5'	CGAGAGAACAACACTGGCAGGACTG
C1_4_1-3'	GACAGTCCTCATTAGCGCTGAGG

3.4 Geräte

Brutschränke	Memmert und Techne
Elektrophoresekammer	Sub-cell [®] GT, BioRad
Mikrowellenofen	Bosch
Mikrozentrifuge	Modell SD und AL, Roth
Video-Geldokumentationssystem	Infinity 3000, Vilber Lourmat
Rotator	Bachofer
Spannungsquelle	Power Pac 300, BioRad
Spectrophotometer	GeneQuant pro, Amersham Pharmacia
Thermocycler	PTC 220 Dyad, MJ Research
Tischzentrifuge	Universal 30RF, Hettich
Vortex-Schüttler	Heidolph
Wasserbad	Julabo
Zentrifuge	Rotixa/P, Hettich

4. Methoden

4.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

4.1.1 Isolierung der DNA

Den Probanden der Patientengruppe und der Kontrollgruppe wurde venöses Blut aus der Ellenbeuge abgenommen. Dazu dienten sterile 9 ml EDTA-Röhrchen (S-Monovette[®], Sarstedt, Nümbrecht). Den Blutproben der einzelnen Probanden wurde zur Anonymisierung der Daten jeweils eine Probandennummer zugeteilt, unter der sie während des Verlaufs der Studie geführt wurden. Innerhalb von 24 Stunden wurden die Blutproben weiterverarbeitet. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 2000 Upm (Rotixa/P, Hettich) wurde das überstehende Plasma abpipettiert. Die anschließende Isolierung der DNA erfolgte entweder mit Hilfe eines kommerziellen Kits (QIAamp[®] DNA Blood Mini Kits, Qiagen) oder mittels der Aussalzmethode (Miller et al., 1988).

4.1.1.1 DNA-Isolierung mittels QIAamp[®] DNA Blood Mini Kits

Durch die erste Zentrifugation kam es zu einer Trennung der zellulären Blutbestandteile in eine obere lymphozytenreiche Schicht, die auch als Buffycoat bezeichnet wird, und eine untere Schicht aus Erythrozyten. Aus dem Buffycoat wurden 200 µl abpipettiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 20 µl Proteinase K Lösung (20 mg/ml) überführt. Anschließend wurden 200 µl des Lysepuffers AL zugegeben, auf dem Vortex-Schüttler mindestens drei mal für je 5 Sekunden gemischt und im Wasserbad bei 56°C für zehn Minuten inkubiert. Danach wurden 200 µl 100 % Ethanol zugefügt und nach erneutem Mischen auf dem Vortex-Schüttler auf die dafür vorgesehene Säule gegeben. Anschließend wurde mit 13000 Upm für eine Minute zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dabei wurde die ursprünglich in Lösung befindliche DNA an die Silica-Gel-Matrix der Säule gebunden. Daraufhin erfolgten zwei Waschschriffe. Zuerst wurden auf die Säule 500 µl Puffer AW 1 pipettiert, für eine Minute bei 13000 Upm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im anschließenden Waschschriff wurden 500 µl Puffer AW 2 auf die Säule gegeben, für drei Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert und erneut der Durchfluss verworfen. Um die vollständige Beseitigung des ethanolhaltigen Puffers AW 2 sicher zu stellen, wurde erneut für eine Minute bei 13000 Upm zentrifugiert und der Durchfluß wiederum verworfen. Anschließend erfolgte die Elution der

DNA. Dazu wurde die Säule in ein sauberes 1,5 ml Zentrifugenröhrchen gestellt und 200 µl Elutionspuffer AE direkt auf die Membran der Säule aufgetragen. Nach Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde für drei Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. Um die Ausbeute an DNA zu erhöhen wurde das Eluat erneut auf die Membran der Säule geladen und die Zentrifugation wiederholt. Die so gewonnene DNA wurde bei -20°C eingelagert.

4.1.1.2 DNA-Isolierung mittels Aussalzmethode (Miller et al., 1988)

Für die Isolierung der DNA mit Hilfe der Aussalzmethode wurde nach der ersten Zentrifugation und Verwerfung des Plasmas der gesamte zelluläre Anteil, also der Buffycoat und das Erythrozytensediment, das die Granulozyten enthält, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt. Anschließend wurde das Röhrchen bis zu einem Gesamtvolumen von 12 ml mit Erythrozytenlysepuffer aufgefüllt, um die kernlosen und somit DNA-freien Erythrozyten zu eliminieren. Es erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur für einige Minuten auf einem Rotator (Bachofer). Die Lyse der im Gegensatz zu den Leukozyten osmotisch weniger resistenten Erythrozyten war komplett sobald die Lösung klar und durchsichtig geworden war. Anschließend wurde mit 2000 Upm für zehn Minuten zentrifugiert, um die Leukozyten zu sedimentieren und den Überstand zu verwerfen. Danach wurden die Leukozyten mit 1 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert, in ein 1,5 ml Gefäß überführt, in einer Tischzentrifuge mit 5000 Upm fünf Minuten abzentrifugiert und der entstandene Überstand verworfen. Das Leukozytensediment wurde entweder sofort zur DNA-Isolierung verwendet oder bis dahin bei -80°C aufbewahrt.

Zur DNA-Isolierung wurden die Leukozyten in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 6 ml Kernlysepuffer gegeben. Durch Auf- und Abpipettieren und unter Zuhilfenahme eines Vortex-Schüttlers wurden die Leukozyten mit dem Kernlysepuffer vermischt. Die Zugabe von SDS (Endkonzentration 1%) und Proteinkinase K (Endkonzentration 0,2 mg/ml) diente zur Degradation von Membran- und Proteinanteilen. Danach wurde die Lösung bei 37°C über Nacht inkubiert. Zwischendurch wurde immer wieder auf dem Vortex-Schüttler gemixt, um die DNA zu scheren und in Lösung zu bringen. Die zuvor zähflüssige Lösung wurde dadurch dünnflüssig. Es musste vermieden werden, dass die DNA als geleeartiges Aggregat vorlag, da sie sonst für die weiteren Schritte verloren gegangen wäre. Gegebenenfalls musste Kernlysepuffer hinzupipettiert, um die DNA vollständig in Lösung zu bringen, und die Inkubation bei 37°C verlängert werden. Nach Lösung der DNA wurde die Fällung der

degradierten Membran- und Proteinfragmente durch Zugabe von 1/3 Volumen 5 M NaCl-Lösung vorgenommen. Dazu wurde die Probe auf dem Vortex-Schüttler gemixt und für mindestens 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte für 15 Minuten eine Zentrifugation mit 3600 Upm um die Proteine zu sedimentieren. Der DNA-haltige Überstand wurde abpipettiert und erneut 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt, 0,6 Volumen 100 % Isopropylalkohol hinzugegeben und langsam gemischt, bis die DNA fadenförmig ausgefallen war. Mit einer Pasteurpipette mit Häkchen wurde sie aufgenommen und zweimal in 70%igem Ethanol gewaschen. Zur Trocknung der DNA wurde sie in ein Eppendorf-Gefäß abgestreift. Anschließend wurde sie in 100-500 µl TE-Puffer gelöst und bei -20°C eingelagert.

4.1.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dort weisen diese ein Absorptionsmaximum auf. Zur Bestimmung des Reinheitsgehalts der DNA-Lösung kann zusätzlich die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt werden, die als Absorptionsmaximum der Proteine gilt. Der hieraus errechnete Quotient E_{260}/E_{280} sollte über 1,8 liegen.

Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes lässt sich aus dem gemessenen Extinktionswert die Konzentration bestimmen:

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

C = Konzentration (ng/µl)

E_{260} = gemessener Extinktionswert bei 260 nm

f = Verdünnungsfaktor

d = Schichtdicke (1 cm)

ϵ	= Extinktionskoeffizient:	ds DNA	= 50^{-1} µl/ng
		RNA	= 40^{-1} µl/ng
		Oligonukleotide	= 30^{-1} µl/ng

Zur Bestimmung der Konzentration wurden Verdünnungen von 1:20 bis 1:200 verwendet. Dadurch lagen die Messwerte für die Extinktion zwischen 0,1 und 1. Nur in diesem Bereich liegt ein linearer Zusammenhang zwischen Extinktion und Konzentration vor.

Für die weitere Versuchsdurchführung wurde die DNA-Konzentration durch Verdünnung mit TE-Puffer auf 100 ng/µl eingestellt.

4.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) kann eine bestimmte Zielsequenz einer komplexen genomischen DNA selektiv exponentiell vervielfältigt werden. Die PCR zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus, da nur wenige Kopien der Zielsequenz genügen, um sie ausreichend zu amplifizieren. Zusätzlich besitzt die Methode eine sehr hohe Spezifität, die eine selektive Vermehrung einer bestimmten Sequenz aus dem gesamten Genom möglich macht. Dazu dienen zwei Primer, die zu jeweils einer flankierenden DNA-Sequenz der gewünschten Region komplementär sind. Diese sind Oligonukleotide einer Länge von 15-35 Basen. Nach der Denaturierung der doppelsträngigen DNA können die Primer an die Zielsequenz des jeweiligen Einzelstrangs anlagern. Eine hitzestabile Polymerase bindet an das 3'-Ende des Primers und amplifiziert die DNA in 5' Richtung. Durch erneute Denaturierung wird das DNA-Amplifikat wiederum aufgeschmolzen und die Amplifikation kann erneut mit der doppelten Anzahl von Matrizen gestartet werden. So wird durch mehrere hintereinander gestartete Zyklen aus Denaturierung, Primeranlagerung (Primer-Annealing) und Extension die gewünschte Sequenz exponentiell vermehrt. Die Zyklen werden 30- bis 40-mal wiederholt bis die Zielsequenz ausreichend amplifiziert wurde. Um das Auftreten unspezifischer Amplifikate zu verhindern, kann eine Heiss-Start Taq-DNA-Polymerase verwendet werden, die erst durch eine Erhitzung am Anfang über mehrere Minuten auf 94°C aktiviert wird. Die Extensionsdauer ist abhängig von der Länge des Produkts. Die Amplifikationsgeschwindigkeit beträgt etwa 30 Nukleotide pro Sekunde. Die Temperatur des Primer-Annealing ist vom jeweiligen Primer abhängig. Nach Abschluss der Zyklen wird noch eine Endextension durchgeführt, die die Vervollständigung der noch nicht komplett amplifizierten PCR-Produkte zum Ziel hat.

Daraus ergibt sich ein standardisierter Ablauf der PCR, der aus Tabelle 4.1 ersichtlich ist.

Abschnitt	Zyklenanzahl	Temperatur	Zyklusdauer
Anfangsdenaturierung	1	94°C	5 Minuten
Denaturierung	30-40	94°C	30 Sekunden
Primer-Annealing		Primerabhängig	30 Sekunden
Extension		72°C	Abhängig von Produktlänge
Endextension	1	72°C	10 Minuten

Tabelle 4.1 PCR-Ablauf

Ein PCR-Ansatz besteht aus einem PCR-Puffer, den Desoxynukleotidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), den beiden Oligonukleotid-Primern, einer Magnesiumchloridlösung, der Taq-DNA-Polymerase, gereinigtem PCR-Wasser und der als Matrize dienenden Ausgangs-DNA.

Bei jedem PCR-Ansatz wird eine Negativkontrolle aus Wasser statt der Ziel-DNA mitgeführt.

Ein 20 µl PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 1 x PCR-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- 0,2 mM dNTP (Sigma, Steinheim, Deutschland)
- 0,25 µM der beiden Primer
- 1-5 mM MgCl₂
- 0,025 U/µl HotStar Taq-DNA-Polymerase (Qiagen)
- 50-200 ng genomische DNA
- H₂O ad 20 µl

Die optimale MgCl₂-Konzentration wurde durch Austesten ermittelt.

Die Annealingtemperatur (T_A) ist von der Länge und Sequenz der Primer abhängig und kann nach folgender Formel berechnet werden (Firma MWG-Biotech):

$$T_A (°C) = [69,3 + 0,42 \times \text{GC-Gehalt (in \%)} - 650 / \text{Primerlänge} + 3] °C$$

Die ideale Annealingtemperatur wurde durch Austesten von mindestens drei Temperaturen um die errechnete Temperatur bestätigt.

Die verwendeten MgCl₂-Konzentrationen und Annealingtemperaturen sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst:

	MICA-TM	MICB-C1_2_A	C1_4_1
MgCl ₂ - Endkonzentration	5,0 mM	3,0 mM	1,5 mM
Primer- Annealingtemperatur	55 °C	65 °C	65 °C
Zyklenzahl	35	35	35

Tabelle 4.2 Bedingungen für die PCR

4.1.3 Agarosegelelektrophorese

Mit der Agarosegelelektrophorese wird die Doppelstrang-DNA nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld horizontal aufgetrennt. Bei einzelsträngigen Nukleinsäuren spielt ihre Sekundärstruktur eine zusätzliche Rolle. Die Poren des Agarosegels wirken wie ein Sieb, durch das die verschieden langen DNA-Fragmente wandern. Das Gel wird in eine Kammer mit einer Pufferlösung gebracht, an die ein elektrisches Spannungsfeld angelegt wird. Durch ihre negative Ladung wandern die Nukleinsäuren zur positiv geladenen Anode. Kleinere Fragmente laufen schneller durch die Poren des Gels als größere, dadurch kann ihre Größe mit Hilfe eines aufgetragenen Molekulargewichtstandards ermittelt und ihre Konzentration grob abgeschätzt werden. Die Banden werden durch Zugabe des im UV-Licht orange fluoreszierenden Farbstoffs Ethidiumbromid, der in die DNA interkaliert, sichtbar gemacht. Der Farbstoff wird zur Gellösung und/oder dem Laufpuffer zugegeben.

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurde eine Agarosekonzentration von 1-2,5% (w/v) verwendet. Im Einzelnen wurden folgende Konzentrationen benutzt:

Länge der DNA-Fragmente	Agarosekonzentration
> 500 bp	1 %
200 – 500 bp	1,5 %
< 200 bp	2,5 %

Die entsprechende Menge Agarose wurde in 200 ml 1 × TBE-Puffer durch Kochen in einem Mikrowellenofen vollständig gelöst. Die durch das Aufkochen verdunstete Flüssigkeit wurde durch deionisiertes Wasser ersetzt. Nach erneutem Aufkochen wurden 4 µl Ethidiumbromid

(10 mg/ml, Sigma) zugegeben und vermischt. Die Gellösung wurde danach möglichst blasenfrei in einen Gelträger (15 × 25 cm) gegossen, in den zuvor vier Gelkämme mit 20 Zähnen eingesetzt wurden. Nach Erstarren der Lösung wurden die Gelkämme vorsichtig gezogen und der Gelträger in eine mit Laufpuffer (1 × TBE-Puffer mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid) gefüllte Gelkammer gestellt. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen DNA-Auftragspuffer gemischt und in die Taschen des Gels aufgetragen. Zusätzlich wurden in einer am Rand gelegenen Spur 20 µl einer 100 bp-Leiter (4 µl Orange G + 2 µl (400 ng DNA) Leiter + 14 µl H₂O) als Größenstandard aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei 100-120 Volt für etwa zwei Stunden. Schließlich wurde das Gel auf dem UV-Transilluminator betrachtet und fotografiert.

Die Agarosegelelektrophorese wurde für die Austestung der MgCl₂-Konzentrationen und der Bestimmung der Primer-Annealingtemperatur, sowie für die Kontrolle der erfolgreichen Amplifikation der zu untersuchenden Proben, die Kontrolle der Amplifikation der verwendeten DNA-Goldstandards und der Negativkontrollen der PCR-Ansätze verwendet.

4.1.4 Reinigung der PCR-Produkte

Zur Reinigung der PCR-Produkte, die zur Sequenzierung hergestellt worden waren, wurde ein kommerzieller Kit (QIAquick® PCR Purification Kit, Qiagen) verwendet. Zweck der Reinigung war, die nicht eingebauten Primer, Primerdimere und andere Reagenzien aus dem PCR-Produkt effektiv zu entfernen. Doppelsträngige DNA-Fragmente einer Größe von 100 bp bis 10 kb können mit diesem Kit gereinigt werden.

Die PCR-Produkte wurden in ein 1,5 ml großes Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden 5 Volumen des im Kit enthaltenen Bindungspuffers PB hinzugefügt und sorgfältig mit diesem vermischt. Anschließend wurde das Gemisch auf die dafür vorgesehene Säule aufgetragen und mit 13000 Upm für eine Minute zentrifugiert. Die in der Lösung enthaltene DNA wurde dadurch an die Silica-Gel-Matrix der Säule gebunden. Zum Waschen wurde die Säule mit 750 µl Puffer PE beladen und mit 13000 Upm für eine Minute zentrifugiert. Um alle Reste des ethanolhaltigen Puffers zu entfernen, wurde nach Verwerfung des Durchflusses erneut mit 13000 Upm für eine Minute zentrifugiert. Für die Elution der DNA aus der Silica-Gel-Matrix musste die Säule in ein sauberes 1,5 ml fassendes Gefäß platziert und 40-60 µl Elutionspuffer EB direkt auf die Membran der Säule aufgetragen werden. Nach Inkubation von fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde eine Zentrifugation von 13000 Upm für drei Minuten

durchgeführt. Um die Ausbeute an DNA zu erhöhen, wurde das Eluat erneut auf die Membran der Säule geladen und zentrifugiert. Das so gewonnene und gereinigte PCR-Produkt wurde in einem kommerziellen Labor sequenziert.

4.1.5 Fragmentanalyse durch denaturierte Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung von kleineren DNA-Fragmenten ist die Polyacrylamidgelelektrophorese besonders gut geeignet. Ihre Obergrenze liegt bei etwa 1000 Basen und ihr maximales Auflösungsvermögen bei einer Base. Dies ist sowohl für die DNA-Sequenzierung als auch für die Fragmentanalyse, wie etwa bei der Analyse von Mikrosatelliten, erforderlich.

Zunächst werden durch PCR die DNA-Fragmente hergestellt. Diese werden markiert, indem einer der beiden Primer am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Diese Fragmente werden bei der Fragmentanalyse auf einem automatischen Sequenzierer mit Hilfe einer vertikalen denaturierenden Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt. Es muss eine Denaturierung vorgenommen werden, da nur einer der beiden DNA-Stränge die Fluoreszenzmarkierung trägt. Hierfür enthält das Gel Harnstoff, der die Wasserstoffbrückenbindungen im DNA-Doppelstrang spaltet. Außerdem wird dadurch erreicht, dass der DNA-Einzelstrang keine Sekundärstruktur ausbilden kann und deshalb nur entsprechend seiner Länge im elektrischen Feld wandert. Der ALFexpress ist mit einer Laserlichtquelle ausgestattet, die das Gel mit konstanter Wellenlänge horizontal durchleuchtet. Sobald die Fragmente das Laserlicht passieren wird der Fluoreszenzfarbstoff angeregt. Das emittierte Licht wird von hinter der Gelkammer angeordneten Photoelektroden detektiert. Die Größe der Fragmente lässt sich durch den Zeitpunkt der Detektion ermitteln. Dafür müssen zur Größenbestimmung bei jeder Probe interne Standards mitgeführt werden, bei denen es sich um fluoreszenzmarkierte, einzelsträngige DNA-Fragmente mit bekannter Länge handelt. Aus den Zeitpunkten der Detektion der Größenstandards wird eine Standardkurve errechnet, mit deren Hilfe sich die Fragmentlänge der Probe bestimmen lässt. Durch separat mitgeführte Goldstandards wird eine optimale Genauigkeit bei der Längenbestimmung der unbekanntenen Fragmente erreicht. Diese Goldstandards sind Fragmente, die in Sequenz und Länge mit den zu untersuchenden Fragmenten übereinstimmen. Dies ist bei einer Allelleiter aus den möglichen Fragmenten oder bei Amplifikaten einiger bekannter Allele des zu untersuchenden Polymorphismus der Fall.

Die Fragmente wurden zunächst mit PCR hergestellt. Der Ansatz und die Bedingungen der PCR entsprachen den im Absatz 3.1.2 beschriebenen Parametern.

Für die Elektrophorese wurde ein 6%iges Polyacrylamidgel (Acrylamid/Bisacrylamid 19:1) mit 7 M Harnstoff und $0,6 \times$ TBE verwendet. Die Dicke betrug 0,3 mm. Die Gellösung wurde durch Filtration (0,4 μ m Poren) entgast und nach Zugabe von TEMED und 10% APS (45 μ l bzw. 175 μ l für 50 ml Gellösung) in die sorgfältig mit Ethanol gereinigte Gelkammer gegossen. Das Gel wurde 90 Minuten bei Raumtemperatur zur Polymerisation stehen gelassen. Als interne Standards wurden die ALFexpressTM Sizer[®] 50 (50 bp), ALFexpressTM Sizer[®] 150 (150 bp), ALFexpressTM Sizer[®] 200 (200 bp) bzw. ALFexpressTM Sizer[®] 250 (250 bp) verwendet, je zwei pro aufzutrennendem Amplifikat entsprechend ihrer Fragmentlänge. Die Goldstandards (siehe 3.3) wurden auf eigene Spuren aufgetragen. Es wurden 0,6-1 μ l PCR-Produkt mit je 5 fmol der internen Standards und mindestens ein Volumen Auftragspuffer (100 % deionisiertes Formamid mit 5 mg/ml Dextranblau) gemischt und zur Denaturierung zwei Minuten bei 85 °C erhitzt. Um eine Renaturierung zu verhindern, wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und danach auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Auftragspuffer wurde $0,6 \times$ TBE verwendet. Die Laufbedingungen waren wie folgt: Spannung 1500 V, Strom maximal 38 mA, Leistung maximal 34 W, Temperatur 50 °C, Intervall der Datenaufzeichnung zwei Sekunden, Laufzeit 7 Stunden. Die Fragmentanalyse wurde durch eine kommerzielle Sequenzierungsfirma durchgeführt (Eurofins Medigenomix, Martinsried, Deutschland). Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms *AlleleLinks* von Amersham Pharmacia.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Längenbereiche der zu untersuchenden Fragmente und der verwendeten Standards

	MICA-TM	MICB-C1_2_A	C1_4_1
Fragmentlängenbereich	92-107 bp	94-122 bp	213-233 bp
Interner Standard 1	50 bp	50 bp	150 oder 200 bp
Interner Standard 2	150 bp	150 bp	250 bp
Goldstandards	BM16: 92 bp BOLETH: 95 bp SCHU: 96 bp PITOUT: 98 bp BM9: 107 bp	PE117: 94 bp bzw. 104 bp WT 47: 96 bp SCHU: 100 bp PITOUT: 102 bp BSM: 108 bp BOLETH: 112 bp BM16: 116 bp VAVY: 118 bp	PE117: 213 bp bzw. 221 bp PITOUT: 217 bp SCHU: 225 bp BM9: 229 bp

Tabelle 4.3 Fragmentlängen der internen Standards und verwendete Goldstandards mit den zu erwartenden Fragmentlängen (Bolognesi et al., 2001; Tamiya et al., 1998)

10 × TBE (Herstellerangabe): 1 M Tris
 0,83 M Borsäure
 10 mM EDTA

4.2 Statistische Auswertung

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine Populationsstudie, in der der mögliche Zusammenhang zwischen einem Krankheitsbild und dem Auftreten bestimmter Faktoren - in dieser Studie Polymorphismen bestimmter Mikrosatellitenmarker – untersucht wird. Man vergleicht dazu eine Gruppe aus unverwandten Patienten mit einer Kontrollgruppe aus gesunden, unverwandten Probanden und berechnet die Signifikanz der ermittelten Assoziationsstärke.

4.2.1 Voraussetzungen für die statistische Auswertung

Eine wesentliche Voraussetzung für die statistische Auswertung der Ergebnisse ist eine ausreichend hohe Zahl an Testpersonen. Die Zahl der untersuchten Kontrollindividuen sollte etwa ein- bis zweimal so groß sein wie die Patientengruppe. In der vorliegenden Studie ist die Kontrollgruppe 1,98-mal so groß wie die Patientengruppe. Zusätzlich müssen verwandte Personen für die Untersuchung von genetischen Assoziationen ausgeschlossen werden.

4.2.2 Chi-Quadrat (χ^2)-Test

Für den χ^2 -Test wurde folgende 2×2 Tabelle verwendet:

	Patienten	Kontrolle	Summe
Positiv	a	c	a + c
Negativ	b	d	b + d
Summe	a + b	c + d	a + b + c + d (=N)

Der χ^2 -Test wird zur Feststellung eines signifikanten Unterschieds zwischen den erwarteten Werten und den tatsächlich erhobenen Werten herangezogen. Man setzt dabei voraus, dass keinerlei Assoziationen zwischen den Werten bestehen. Die Signifikanz wird in drei Niveaus ausgedrückt:

1. Signifikanzniveau (5 %-Stufe, $p \leq 0,05$) $3,84 \leq \chi^2 < 6,64$ wahrscheinlich signifikant
2. Signifikanzniveau (1 %-Stufe, $p \leq 0,01$) $6,64 \leq \chi^2 < 10,83$ signifikant
3. Signifikanzniveau (0,1 %-Stufe, $p \leq 0,001$) $10,83 \leq \chi^2$ hoch signifikant

Die Berechnung erfolgt nach der Formel (Korrektur nach Yates):

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

Dabei besitzt der Test für eine 2×2 Tabelle einen Freiheitsgrad (df). Die Fallzahlen sollten über fünf und die Summe aller Häufigkeiten über 40 liegen (Svejgaard et al., 1974). Für Fallzahlen unter fünf wurde der Fischer's-Exact-Test verwendet. Der χ^2 -Test wurde zur Analyse der Allelfrequenz und der relativen Delta-Werte der Zwei-Punkt-Haplotypen eingesetzt.

Für multiple Vergleiche wurden die Signifikanzwerte nach Bonferroni korrigiert, dazu wurde folgende Formel der Korrektur der p-Werte verwendet:

$$p_{\text{korr}} = p \times (n + 1)$$

wobei n = Anzahl der Freiheitsgrade.

4.2.3 Allelfrequenzberechnung

Die Allelfrequenzen berechnen sich aus folgender Formel:

$$f = \frac{n}{N}$$

wobei n = Anzahl eines Allels und N = Anzahl aller Allele.

Für die Gültigkeit der Formel wird vorausgesetzt, dass alle Allele bekannt sind und Individuen mit nur einem Allel homozygot für dieses sind (Sierp, 1989). Da die verwendeten Marker kodominant vererbt werden, gilt zusätzlich N (Allele) = $2 \times$ Anzahl der Individuen.

4.2.4 Zwei-Punkt-Haplotypen und Kopplungsungleichgewichte

Die zuvor bereits berechneten Gen- und Allelfrequenzen werden zur Berechnung der Haplotypfrequenzen verwendet (Yasuda, 1978). Die Haplotypfrequenzen wurden nach der Hill Methode bestimmt (Hill, 1974). Die Analyse der Zwei-Punkt-Haplotypen erfolgte anhand des oben beschriebenen χ^2 -Tests mit Korrektur nach Yates. Die Berechnung wurde mit der PASW Software, Version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Das Kopplungsungleichgewicht wurde für jedes Allel der untersuchten Mikrosatelliten (*MICA*-

TM, *MICB-CI_2_A*, *CI_4_I*) einzeln mit Hilfe der MIDAS 1.0 Software (<http://www.genes.org.uk/software/midas>) bestimmt (Gaunt et al., 2006).

5. Ergebnisse

5.1 Neu identifiziertes Allel MICA* 055

In der Studie wurde ein neues Allel, das MICA* 055, gefunden. Zwei Personen aus der Patientengruppe wiesen ein Allel mit acht GCT-Wiederholungen (A8) auf. Dies wurde bereits von *Gambelunghe et al.* beschrieben, aber ohne die für die offizielle HLA-Nomenklatur notwendige Sequenzierung der Exone 2-5 (*Gambelunghe et al.*, 2006). In der vorliegenden Studie wurde diese durchgeführt und erbrachte eine identische Nukleotidsequenz der Exone 2-5 wie bei den bereits bekannten Allelen A7 (MICA* 050), A9 (MICA* 00201) und A10 (MICA* 020). Das neue Allel mit den acht GCT-Wiederholungen wurde MICA* 055 benannt und in die GenBank der WHO mit der Nummer EU254723 aufgenommen (*Glas et al.*, 2008; *Marsh*, 2008).

5.2 Genotypen und Allelfrequenzen der untersuchten Mikrosatelliten

In diesem Abschnitt wurden die Allelfrequenzen der *MICA-TM*-, *MICB-CI_2_A*- und *CI_4_I*-Mikrosatelliten in der Patientengruppe mit chronisch-marginaler Parodontitis dargestellt und mit den Allelfrequenzen der Kontrollgruppe mit gesunden Individuen verglichen. Zusätzlich wurden die Allel- und Genotypfrequenzen der Kontrollgruppe mit den Daten in anderen Normalpopulationen verglichen, um die Plausibilität der eigenen Ergebnisse zu bestätigen.

Sowohl in der Patientengruppe als auch in der Kontrollgruppe wurden Berechnungen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes für alle drei Polymorphismen vorgenommen. Die beobachteten Frequenzen homozygoter und heterozygoter Individuen zeigten keine statistisch signifikanten Abweichungen von den erwarteten Werten.

5.2.1 Allelfrequenzen von *MICA-TM*

Im *MICA-TM*-Polymorphismus war das Allel A5.1 in beiden Gruppen am häufigsten vertreten. In der Patientengruppe kam es mit einer Frequenz/Prävalenz von 40 % und in der Kontrollgruppe mit 44 % vor. Des Weiteren lagen die Allelfrequenzen von A4, A5, A6 und A9 in beiden Gruppen jeweils über 10%. Die übrigen Allele traten hingegen wesentlich seltener auf. Das neu klassifizierte Allel A8 war zweimal in der Patientengruppe vertreten.

Auch das Allel A10 wurde nur zweimal gefunden, jeweils einmal in der Patienten- und in der Kontrollgruppe. Das Allel A7 wurde in der vorliegenden Studienpopulation nicht nachgewiesen (Tabelle 5.1).

In der statistischen Analyse der Allelfrequenzen fand sich eine Signifikanz (p-Wert = 0,039, χ^2 -Wert = 4,28, Odds-Ratio = 2,05, Konfidenzintervall bei 95% = 1,63 – 2,60) für eine Häufung des Allels A5 in der Patientengruppe. Für die übrigen Allele fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Tabelle 5.1).

5.2.1.1 Allelfrequenzen von *MICA-TM* unterteilt nach Geschlecht

Anschließend wurden die beiden Gruppen für die statistische Auswertung nach den unterschiedlichen Geschlechtern stratifiziert. Bei den Männern zeigte sich eine hohe Signifikanz (p-Wert = 0,000, χ^2 -Wert = 20,05, Odds-Ratio = 2,17, Konfidenzintervall bei 95% = 1,55 – 3,03) für die Häufung des Allels A5 bei Patienten mit chronischer Parodontitis. Das Verhältnis von Patienten- zur Kontrollgruppe lag bei 18,7 % zu 9,6 %. Das Ergebnis bei den Frauen war nicht signifikant, vielmehr kam das Allel A5 in der Kontrollgruppe mit 13,7 % sogar häufiger als in der Patientengruppe mit 10,1 % vor. Eine Signifikanz (p-Wert = 0,045, χ^2 -Wert = 4,02, Odds-Ratio = 0,77, Konfidenzintervall bei 95% = 0,60 – 0,99) fand sich beim männlichen Geschlecht für die Häufung des Allels A5.1 in der Kontrollgruppen mit 43,7 % gegenüber den Patienten mit 37,4 %. Die übrigen Allele zeigten auch nach Geschlechtsdifferenzierung der Gruppen keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 5.4).

5.2.1.2 Allelfrequenzen von *MICA-TM* unterteilt nach Nikotinkonsum

Des Weiteren wurden die Gruppen nach der Differenzierung in Raucher und Nichtraucher untersucht. Hier ergab sich eine Signifikanz bei den Rauchern in den Allelen A5.1 und A9. Das Allel A 5.1 zeigte eine signifikante Häufung (p-Wert = 0.007, χ^2 -Wert = 7,26, Odds-Ratio = 0,57, Konfidenzintervall bei 95% = 0,38 – 0,85) in der Kontrollgruppe mit 45,9 % gegenüber der Patientengruppe mit 32,6 %. Das Allel A9 zeigte hingegen eine positive Signifikanz (p-Wert = 0.009, χ^2 -Wert = 6,8, Odds-Ratio = 2,18, Konfidenzintervall bei 95% = 1,24 – 3,82) und war bei den Patienten mit 20,0 % gegenüber den Gesunden mit 10,3 %

erhöht. Im Übrigen fanden sich bei Rauchern und Nichtrauchern keine signifikant unterschiedlichen Allelfrequenzen (Tabelle 5.4).

5.2.2 Allelfrequenzen von *MICB-CI_2_A*

Bezüglich des *MICB-CI_2_A*-Mikrosatelliten war in beiden Gruppen das Allel CA17 am häufigsten vertreten mit 18,6 % in der Patientengruppe und 20,4 % in der Kontrollgruppe, dicht gefolgt von dem Allel CA14 mit 18,0 % bei den Patienten und 19,2 % bei den Gesunden. Häufigkeiten um die 10 % wiesen außerdem die Allele CA15, CA18, CA21 und CA 24 auf. Die übrigen Allele kamen seltener vor. Das CA16 war nur in drei Individuen in der Patientengruppe vertreten, ebenso wie das CA27 mit jeweils zwei Fällen in der Patienten- bzw. Kontrollgruppe und das CA28 mit einem Fall in der Kontrollgruppe (Tabelle 5.2).

Ein signifikanter Unterschied (p-Wert = 0,009, χ^2 -Wert = 6,87, Odds-Ratio = 1,68, Konfidenzintervall bei 95% = 1,15 – 2,45) zwischen den Allelfrequenzen ergab sich im CA25 mit einer Häufigkeit von 6,7 % bei den Patienten gegenüber 4,1% bei den Gesunden. Ein signifikanter Unterschied (p-Wert = 0,016, χ^2 -Wert = 5,76, Odds-Ratio = 1,39, Konfidenzintervall bei 95% = 1,07 – 1,81) wurde für die Prävalenz des CA15 in der Patientengruppe mit 13,6 % im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 10,2 % gefunden. Die vermehrte Anzahl an CA24 Allelen in der Kontrollgruppe mit 12,1 % gegenüber der Patientengruppe mit 8,9 % war ebenfalls signifikant (p-Wert = 0,024, χ^2 -Wert = 5,07, Odds-Ratio = 0,71, Konfidenzintervall bei 95% = 0,53 – 0,95). Die übrigen Allele waren nicht signifikant unterschiedlich verteilt (Tabelle 5.2).

5.2.2.1 Allelfrequenzen von *MICB-CI_2_A* unterteilt nach Geschlecht

Nach der Aufteilung der beiden Gruppen nach Geschlechtern konnte für die Prävalenz des Allels CA24 bei Männern in der Kontrollgruppe mit 11,4 % gegenüber männlichen Individuen der Patientengruppe mit 7,5 % ein signifikanter Unterschied (p-Wert = 0,047, χ^2 -Wert = 3,94, Odds-Ratio = 0,63, Konfidenzintervall bei 95% = 0,41 – 0,98) gefunden werden. Die Berechnung der übrigen Allelfrequenzen nach der Geschlechterverteilung erbrachte keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 5.5).

5.2.2.2 Allelfrequenzen von *MICB-CI_2_A* unterteilt nach Nikotinkonsum

Zusätzlich wurden die beiden Gruppen in Raucher und Nichtraucher unterteilt. Danach fand sich das CA22 (p-Wert = 0,042, χ^2 -Wert = 4,15, Odds-Ratio = 2,39, Konfidenzintervall bei 95% = 1,09 – 5,28) bei Rauchern mit chronischer Parodontitis mit 10,4 % gegenüber Rauchern der Kontrollgruppe mit 4,6 % sowie für das CA15 (p-Wert = 0,019, χ^2 -Wert = 5,51, Odds-Ratio = 1,47, Konfidenzintervall bei 95% = 1,08 – 2,00) bei erkrankten Nichtrauchern mit 13,9 % im Vergleich zu gesunden Nichtrauchern mit 9,9 % jeweils ein signifikanter Unterschied. Das Allel CA16 (p-Wert = 0,023, χ^2 -Wert = 5,21, Odds-Ratio = k.A., Konfidenzintervall bei 95% = k.A.) war häufiger bei den Patienten ohne Nikotinkonsum im Vergleich zu gesunden Nichtrauchern. Ansonsten ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede für die übrigen Allele nach Aufteilung nach dem Rauchverhalten eruieren (Tabelle 5.5).

5.2.3 Allelfrequenzen von *CI_4_1*

Im Mikrosatellit *CI_4_1* war in den beiden untersuchten Studiengruppen das Allel 2 mit 38,6 % in der Patientengruppe und 37,1 % in der Kontrollgruppe am häufigsten vertreten. Die Allele 3 und 4 folgten im Bereich von 20 % bzw. etwa 25 %. Die Allele 1 und 5 waren mit einer Häufigkeit von unter 10% seltener vertreten. Das in der Literatur beschriebene sechste Allel (Glas et al., 2001) wurde in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden (Tabelle 5.3).

Die Häufigkeit von Allel 3 war in der Kontrollgruppe mit 24,3 % gegenüber der Patientengruppe mit 19,1 % statistisch signifikant unterschiedlich (p-Wert = 0,006, χ^2 -Wert = 7,6, Odds-Ratio = 0,74, Konfidenzintervall bei 95% = 0,60 – 0,91). Auch das Allel 5 war in der Patientengruppe (9,5 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe (7,1 %) signifikant häufiger anzutreffen (p-Wert = 0,048, χ^2 -Wert = 3,92, Odds-Ratio = 1,38, Konfidenzintervall bei 95% = 1,01 – 1,88). Die Analyse der übrigen Allelfrequenzen erbrachte keine weiteren signifikanten Unterschiede (Tabelle 5.3).

5.2.3.1 Allelfrequenzen von *CI_4_1* unterteilt nach Geschlecht

Auch für den Mikrosatellit *CI_4_1* erfolgte die separate Allelfrequenzanalyse anhand der Einteilung der Gruppen nach dem jeweiligen Geschlecht. Bei Männern war das Allel 3 (p-Wert = 0,034, χ^2 -Wert = 4,49, Odds-Ratio = 0,71, Konfidenzintervall bei 95% = 0,53 – 0,97) in der Kontrollgruppe mit 24,3 % gegenüber 18,7 % in der Patientengruppe signifikant gehäuft. In der Gruppe der Frauen ergab die unterschiedliche Verteilung des Allels 3 in der Patienten- und der Kontrollgruppe keinen statistisch signifikanten Unterschied. Auch die Frequenzen der übrigen Allele bei Männern und Frauen zeigten keinen signifikanten Unterschied (Tabelle 5.6).

5.2.3.2 Allelfrequenzen von *CI_4_1* unterteilt nach Nikotinkonsum

Schließlich erfolgte die Auswertung der Allelfrequenzen in den Untergruppen Raucher und Nichtraucher. Nur für das Allel 3 fand sich ein signifikanter Unterschied (p-Wert = 0,024, χ^2 -Wert = 5,13, Odds-Ratio = 0,74, Konfidenzintervall bei 95% = 0,57 – 0,95) in der Gruppe der Nichtraucher mit einem vermehrten Vorkommen in der Kontrollgruppe (24,9 %) gegenüber der Patientengruppe (19,7 %). Für die übrigen Allele konnte weder bei Rauchern noch bei Nichtrauchern eine signifikante Assoziation gefunden werden (Tabelle 5.6).

5.3 Zwei-Punkt-Haplotypen und Kopplungsungleichgewichte

Bei der Berechnung der Zwei-Punkt-Haplotypen wurden nur Allelkombinationen mit einer Häufigkeit von über einem Prozent berücksichtigt. Insgesamt erfüllten 41 Zwei-Punkt-Haplotypen diese Bedingung.

Die Auswertung ergab eine Signifikanz (p-Wert = 0,002, χ^2 -Wert = 10,1, Odds-Ratio = 2,63, Konfidenzintervall bei 95% = 1,46 – 4,74) für den Haplotypen aus dem Allel A5 des Mikrosatelliten *MICA-TM* und dem Allel 5 aus dem Mikrosatelliten *CI_4_1*. Die Berechnung dieses Zwei-Punkt-Haplotypen ergab ein mit 3,3 % häufigeres Vorkommen in der Patientengruppe gegenüber einer Prävalenz von 1,3 % in der Kontrollgruppe. Der Haplotyp aus Allel CA 17 im *MICB-CI_2_A*-Polymorphismus und Allel 3 im *CI_4_1*-Mikrosatellit war mit einer berechneten Wahrscheinlichkeit von 11,5 % in der Kontrollgruppe

gegenüber der in der Patientengruppe mit 8,2 % signifikant (p -Wert = 0,014, χ^2 -Wert = 6,01, Odds-Ratio = 0,68, Konfidenzintervall bei 95% = 0,50 – 0,92) gehäuft. Des Weiteren ergab die Analyse der Zwei-Punkt-Haplotypen keine statistische Signifikanz (Tabelle 5.7).

Die Analyse des Kopplungsungleichgewichts zwischen den Mikrosatelliten *MICA-TM*, *MICB-CI_2_A* und *CI_4_I* erfolgte anhand einer Allel-abhängigen Betrachtungsweise für alle möglichen Kombinationsmöglichkeiten. Es ergab sich ein starkes Kopplungsungleichgewicht zwischen den Allelen A5.1 des *MICA-TM* und dem Allel CA25 des *MICBCI_2_A* ($D' = 0,92$). Außerdem zeigte sich zwischen dem Allel CA16 des *MICB-CI_2_A* und dem Allel 3 des *CI_4_I* ein weiteres starkes Kopplungsungleichgewicht ($D' = 0,92$).

6. Diskussion

6.1. Studiendesign und Methoden

6.1.1 Pathogenese der chronischen marginalen Parodontitis

Die chronisch marginale Parodontitis ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung. Ihre Entstehung und Ausprägung wird von vielen endogenen und exogenen Faktoren beeinflusst. Die genetische Prädisposition spielt dabei eine ganz wesentliche Rolle, so wurde dessen Anteil am Risiko an einer Parodontitis zu erkranken auf bis zu 50 % geschätzt (Michalowicz et al., 2000). Sicherlich gibt es kein spezifisches Gen das für die Entwicklung der chronischen Parodontitis verantwortlich ist, vielmehr ist das Risiko multigenetisch bedingt. So zeigten in früheren Studien einige Zytokine, Chemotaxine und immunregulatorische Rezeptoren Assoziationen mit dieser Erkrankung. Insbesondere für den mit *MICA* und *MICB* im starken Kopplungsungleichgewicht stehenden Histokompatibilitätskomplex wurden unterschiedliche Assoziationen nachgewiesen (Reichert et al., 2002; Schenkein, 2002; Stein et al., 2003). Entscheidend bei der Auswahl der zu untersuchenden Gene ist der pathophysiologische Zusammenhang ihrer Proteine mit der Erkrankung (Gambano et al., 2000), wie es bei den MIC-Genen der Fall ist. Zu beachten ist, dass die untersuchten Gene in der vorliegenden Studie in einem funktionellen Zusammenhang stehen, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen.

6.1.2 Studiendesign bei genetischen Assoziationsstudien

Einen Ansatzpunkt zur Analyse genetischer Faktoren bietet die direkte Assoziationsstudie. Dabei werden genetische Polymorphismen, in diesem Fall die drei Mikrosatelliten *MICA-TM*, *MICB-CI_2_A* und *CI_4_I* untersucht und mit dem Auftreten der Erkrankung, hier der chronisch marginalen Parodontitis, assoziiert. Dazu müssen die Allel- und Genotypfrequenzen der untersuchten Polymorphismen in einer Patientengruppe erhoben und mit den Frequenzen in einer Gruppe mit gesunden Probanden mit Hilfe statistischer Tests verglichen werden. Dieser Versuchsaufbau gilt als Standard bei genetischen Assoziationsstudien. Wichtige Voraussetzungen im Studiendesign sind zu erfüllen, um eine hohe Aussagekraft der erhobenen Ergebnisse zu erreichen. Wichtig ist eine große Fallzahl an Probanden, um auch schwächere Assoziationen zu erkennen. Dabei sollte die Anzahl der untersuchten Personen in

der Kontrollgruppe ein- bis zweimal so hoch wie die in der Patientengruppe sein. Die Probanden sollten nicht miteinander verwandt sein. Die Probanden der Kontrollgruppe sollten in ihrer ethnischen und genetischen Zusammenstellung der Patientengruppe entsprechen, um falsch positive Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher ethnischer Herkunft zu vermeiden (Cardon und Bell, 2001; Ioannidis et al., 2001; Ioannidis et al., 2003; Ioannidis et al., 2004). Dies ist besonders bei der Parodontitis zu berücksichtigen, da sich ein unterschiedliches Erkrankungsrisiko abhängig von der ethnischen Herkunft gezeigt hat. Individuen mit afro-amerikanischem Hintergrund sind überdurchschnittlich häufig von einer Parodontitis betroffen, ebenso lateinamerikanische und asiatische Ethnien (Albandar und Rams, 2002).

6.1.3 Auswahl der Probanden

In der vorliegenden Studie wurden 389 Patienten mit chronisch marginaler Parodontitis mit 771 gesunden, nicht verwandten Probanden verglichen. Die beiden Gruppen wurden nach den oben genannten Voraussetzungen zusammengesetzt. Alle Teilnehmer an der Studie kamen aus dem süddeutschen Raum und waren kaukasischer Herkunft. Der Altersdurchschnitt in der Patientengruppe lag mit 54 Jahren etwas über dem in der Kontrollgruppe mit 47,4 Jahren. Während in der Patientengruppe mit 52,5 % ein leichtes Übergewicht an Frauen vorherrschte, waren in der Kontrollgruppe die Männer mit 67,1 % zahlreicher vertreten.

Ein Auswahlkriterium für die Aufnahme in die Patientengruppe bestand darin, dass die Patienten nicht unter einer aggressiven bzw. früh beginnenden Form der Parodontitis litten. Die Gründe für die zum Untersuchungstermin bereits bestehenden Zahnverluste wurden anamnestisch erhoben. Es ist also nicht auszuschließen, dass Traumata oder ausgedehnter kariöser Befall einzelner Zähne für deren Verlust ursächlich verantwortlich waren.

Außerdem können aggressive Formen der Parodontitis auch im mittleren Alter auftreten und fälschlicher Weise als chronisch marginale Parodontitis klassifiziert werden, da eindeutige diagnostische Kriterien bislang fehlen. Die fließenden Übergänge zwischen den Erkrankungen und dem momentanen Erscheinungsbild einer Erkrankung können die genaue Diagnose schwierig machen. Zusätzlich können Vergleiche mit anderen Studien schwierig sein, da zwar seit 1999 eine Klassifizierung der parodontalen Erkrankungen existiert, die aber lange Zeit nicht von allen Autoren umgesetzt wurde (Mombelli et al., 2002). So kann im Einzelfall eine fälschliche Zuordnung nicht ausgeschlossen werden, obwohl zuvor genaue Ausschlusskriterien formuliert wurden.

Die Bedingung für die Aufnahme in die Kontrollgruppe war das Fehlen einer Parodontitis. Da es sich bei der Studie um eine Querschnittsstudie handelt, stellte die Untersuchung der Probanden nur eine Momentaufnahme dar. Um eine bereits behandelte Parodontitis auszuschließen, durften sich die in die Studie untersuchten gesunden Individuen zu keinem Zeitpunkt einer systematischen Parodontaltherapie unterzogen haben. Im Einzelfall ist es allerdings möglich, dass in der anamnestisch erhobenen Krankengeschichte einzelne Daten vergessen wurden. Außerdem kann ein Proband zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie parodontal gesund gewesen sein und dennoch später von einer manifesten Parodontitis befallen worden sein. Der Proband wird fälschlicherweise als gesund eingestuft. Dies kann vorkommen, da es keinen sicheren histopathologischen Befund gibt, der den Ausbruchzeitpunkt der Erkrankung festlegt (Mombelli et al., 2002). Aus Gründen der Praktikabilität wurde jedoch von einer Verlaufskontrolle der Probanden nach einem gewissen Zeitraum abgesehen.

Ein weiterer wichtiger Störfaktor sind Umweltfaktoren. Diese können das Risiko für eine Parodontitis erhöhen und dadurch das Ergebnis einer genetischen Assoziationsstudie beeinflussen. Einer dieser Umweltfaktoren ist das Rauchen. So haben Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern ein knapp dreifach erhöhtes Risiko an Parodontitis zu erkranken (Johnson und Hill, 2004). Das Rauchen stellte in dieser Studie kein Ausschlusskriterium dar. In der Patientengruppe waren Raucher mit einem Anteil von 32 % vertreten. In der Kontrollgruppe gab es 13 % Raucher. Eine ideale Patientengruppe bestünde ausschließlich aus Nichtrauchern, da diese trotz des fehlenden Risikofaktors an chronischer Parodontitis erkrankt waren. Die optimale Kontrollgruppe bestünde nur aus Rauchern, weil diese trotz Risikofaktor keine chronische Parodontitis bekommen haben. Aus praktischen Gründen ist dies im Versuchsaufbau nicht durchzuführen.

Andere Umweltfaktoren sind Systemerkrankungen, wie Diabetes mellitus oder Funktionsstörungen der neutrophilen Granulozyten. Diese führen ebenfalls zu einem erhöhten Parodontitisrisiko. Zwar galten diese mittels Anamnese erhobenen Erkrankungen als Ausschlusskriterium, aber im Einzelfall ist ein Übersehen dieser Erkrankungen durch eine noch unbekanntete Diagnose möglich. Insgesamt sollte diese Möglichkeit aber nicht als statistisch relevant angesehen werden.

6.2 Validität der erhobenen Ergebnisse

Wichtige Voraussetzungen für die Durchführung einer Assoziationsstudie sind die Zuverlässigkeit der verwendeten Methoden und die eindeutige Identifizierung aller Allele der zu untersuchenden Mikrosatelliten. Mikrosatelliten sind, wie unter Kapitel 1.3 beschrieben, kurze DNA-Sequenzen, die aus sogenannten *short tandem repeats* bestehen. Diese sind tandemartige Wiederholungen von 2 bis 6 Basenpaaren. Sie zeichnen sich durch eine hohe interindividuelle Varianz in der Anzahl ihrer Wiederholungen aus. Da sich das Genom eines Menschen nur in 0,1 %, d.h. jedem tausendsten Basenpaar, von dem eines anderen Menschen unterscheidet (Kruglyak und Nickerson, 2001), sind die Regionen mit großer genomischer Varianz von großer wissenschaftlicher Bedeutung. Im menschlichen Genom sind über 10.000 dieser *short tandem repeats* bekannt. Sie liegen zumeist in den Exonen von Genen, die mit menschlichen Erkrankungen in Bezug gebracht werden (Madsen et al., 2008). Deshalb eignen sie sich sehr gut zur Analyse genetischer Zusammenhänge mit Erkrankungen. Ein weiterer Grund der häufigen genetischen Untersuchung von Mikrosatelliten ist ihre kurze Länge und ihre einfache und sichere Analyse mittels PCR (Madsen et al., 2008; Weber und Wong, 1993).

In der vorliegenden Studie wurden die Mikrosatelliten *MICA-TM*, *MICB-C1_2_A* und *C1_4_1* mittels PCR und Elektrophorese untersucht. Dies ist eine gängige Methode bei Assoziationsstudien zur Analyse von Mikrosatelliten (Shi, 2002). Die PCR zeichnet sich durch eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität aus. Mögliche Schwierigkeiten bei Identifizierung und Unterscheidung der PCR-Produkte der untersuchten Mikrosatellitenpolymorphismen liegen darin, dass diese zum Teil zahlreiche Allele aufweisen. Außerdem haben die Allele teilweise nur sehr geringe Unterschiede in ihrer Fragmentlänge. Zusätzlich entstehen bei der PCR typischerweise Zusatzprodukte geringerer Länge. Die genannten Gründe können die eindeutige Identifizierung der Allele der Polymorphismen schwierig machen. Allerdings ist die zweifelsfreie und sichere Identifizierung der einzelnen Allele die wichtigste Voraussetzung für eine Assoziationsstudie mit Genpolymorphismen. Um mögliche Fehlerquellen bei der Elektrophorese zu minimieren, wurden Goldstandards verwendet. Diese wurden aus Fragmenten von bereits klassifizierten Zelllinien hergestellt und als Allelleiter mitgeführt. So konnte jede Probe einer exakten Basenlänge zugeordnet werden. Die Anfälligkeit für Fehler ist allerdings bei jeder Methode gegeben und durch entsprechende Sorgfalt zu berücksichtigen. Zur Validierung der

Ergebnisse wurden zusätzlich Stichproben der mit dieser Methode typisierten Proben sequenziert.

In der vorliegenden Studie befanden sich die Allelfrequenzen der drei Mikrosatelliten für beide Gruppen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, was einen systematischen Fehler bei der Zusammenstellung der Gruppen nicht vermuten lässt.

6.2.1 Fragmentanalyse und Sequenzierung von *MICA-TM*

Die Besonderheit im GCT-Trinukleotid-Polymorphismus liegt darin, dass sich die Längen der Allele A5 und A5.1 nur um ein Basenpaar unterscheiden. Dies erschwert die exakte Zuordnung dieser Allele. Die Identifizierung der restlichen Allele A4, A6, A9 und A10 gestaltete sich allerdings unkompliziert, zumal der Mikrosatellit eine charakteristische Allelverteilung aufweist und nur eine begrenzte Anzahl an Allelen besitzt. Die verwendeten Standards BM9, BM-16, BOLETH, BSM, BTB, PE117, HHKB, PITOUT, SCHU, VAVY und WT47 beinhalten die bekannten Allele A4 (92 bp), A5 (95 bp), A5.1 (96 bp), A6 (98 bp) und A9 (107 bp). Durch Mischen ihrer PCR-Produkte konnte eine Allelleiter hergestellt werden, die für die Analyse der PCR-Produkte aus der Patienten- bzw. Kontrollgruppe als Goldstandard diente (Abb. 6.1). Bei einer Fragmentanalyse konnten sie eindeutig zugeordnet werden.

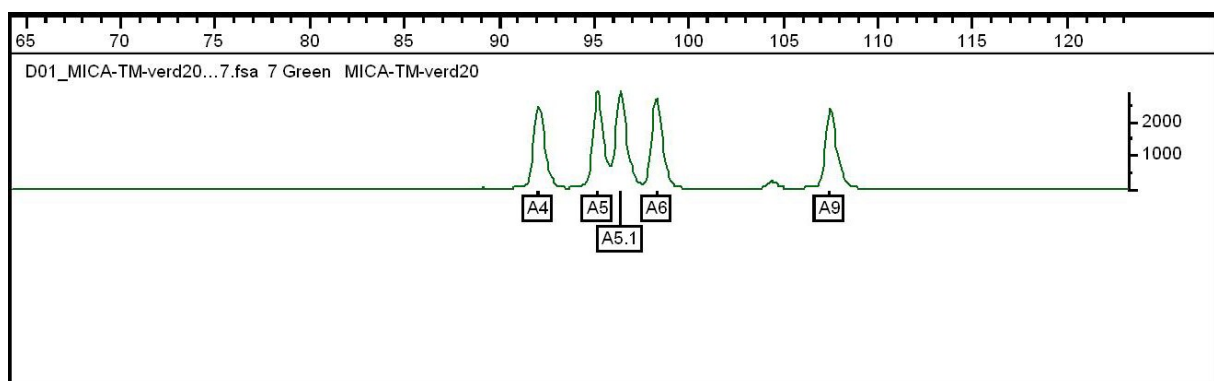


Abb. 6.1 Allelleiter *MICA-TM* als Goldstandard zur Analyse der PCR-Produkte, x-Achse: Molekülgröße in bp, y-Achse: Intensität der Emission

6.2.2 Fragmentanalyse und Sequenzierung von *MICB-CI_2_A*

Als Dinukleotid-Polymorphismus (CA) stellt dieser Mikrosatellit im Intron 1 des *MICB*-Gens eine hohe Herausforderung an die Typisierung. Zum einen unterscheiden sich die Längen der einzelnen Allele nur durch jeweils zwei Basenpaare. Zum anderen weist der Polymorphismus mit 15 Allelen ein breites Allelspektrum auf. Deshalb wurden zur Sequenzierung homozygote Zelllinien als Standards ausgewählt, die das gesamte Fragmentlängenspektrum abdecken. Die Zelllinie BTB enthält das kleinste Allel (CA14), HHKB ein Allel mittlerer Länge (CA17), die Zelllinie BOLETH ein Allel mit längerer Fragmentlänge (CA23) und die Zelllinie VAVY ein weiteres Allel mit langer Fragmentlänge (CA26). Zusätzlich wurden noch weitere Zelllinien zur Bestätigung der Methode sequenziert. Auch für *MICB-CI_2_A* konnte durch Mischen der PCR-Produkte eine Allelleiter hergestellt werden, die als Goldstandard diente (Abb. 6.2).

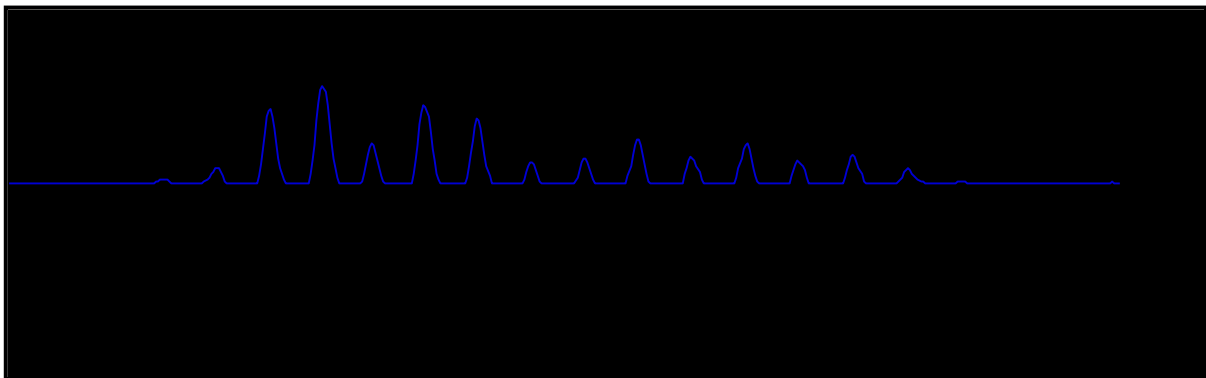


Abb. 6.2 Allelleiter *MICB-CI_2_A* als Goldstandard zur Analyse der PCR-Produkte, x-Achse: Molekülgröße in bp, y-Achse: Intensität der Emission

6.2.3 Fragmentanalyse und Sequenzierung von *CI_4_1*

Die Sequenzierung des CAAA-Tetranukleotid-Polymorphismus war einfacher als die der übrigen Mikrosatelliten. Zum einen waren die Allele auf Grund ihrer größeren Unterschiede in der Fragmentlänge eindeutig zu identifizieren. Zum anderen weist der Mikrosatellit mit fünf gängigen Allelen eine geringe Zahl an Allelen auf (Tamiya et al., 1998). Die Fragmentanalyse der verwendeten Standards bestätigte die aus der Literatur bekannten Werte. Die Zelllinie PE117 enthält die Allele 1 (213 bp) und 3 (221 bp), die Zelllinie PITOUT das

Allel 2 (217 bp), die Zelllinie SCHU das Allel 4 (225 bp) und die Zelllinie BM9 das Allel 5 (229 bp). Auch hier wurde aus den PCR-Produkten ein Goldstandard für die Allelleiter angefertigt (Abb. 6.3).

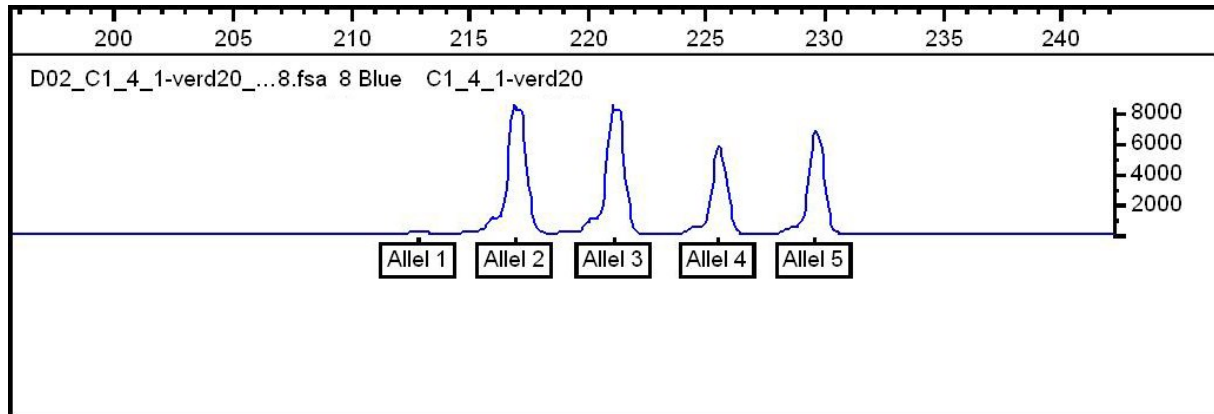


Abb. 6.3. Allelleiter *CI_4_1* als Goldstandard zur Analyse der PCR-Produkte, x-Achse: Molekülgröße in bp, y-Achse: Intensität der Efluoreszenz

6.3 Bewertung der Ergebnisse aus genetischer Sicht

In der vorliegenden Studie wurde zum ersten Mal der Zusammenhang zwischen den Genen *MICA* und *MICB* sowie dem Mikrosatelliten *CI_4_1* und der chronisch marginalen Parodontitis untersucht. Dazu wurden die Allelfrequenzen der Mikrosatelliten *MICA-TM*, *MICB-CI_2_A* und *CI_4_1* von 389 Patienten, die an einer chronisch marginalen Parodontitis erkrankt sind, mit 771 gesunden, unverwandten Kontrollpersonen verglichen und statistisch ausgewertet. Es fanden sich statistisch signifikante Assoziationen mit mehreren Allelen der analysierten Mikrosatelliten.

6.3.1 Vergleich der Ergebnisse des Mikrosatelliten *MICA-TM* mit Daten aus der Literatur

Im Trinukleotidpolymorphismus *MICA-TM* wurden sieben verschiedene Allele gefunden. Zur Überprüfung der Validität der erhobenen Ergebnisse wurde der Vergleich mit Daten aus bisher veröffentlichten Studien herangezogen. Dazu wurden die in der Kontrollgruppe

berechneten Allelfrequenzen mit denen aus den Kontrollgruppen anderer Populationen mit ähnlicher ethnischer Herkunft verglichen. Die Kontrollgruppen unterschiedlicher ethnischer Herkunft können eine starke Heterogenität bezüglich ihrer Allelfrequenzen aufweisen (Ioannidis et al., 2004), so dass nach Möglichkeit nur Studien ähnlicher ethnischer Herkunft zur Kontrolle der Validität der erhobenen Ergebnisse herangezogen werden sollten. So wiesen die Allelfrequenzen in einer Studie von *Glas et al.* mit 154 Probanden aus dem süddeutschen Raum (Glas et al., 2001), einer Arbeit von *Bolognesi et al.* mit 101 Probanden italienischer Herkunft (Bolognesi et al., 2001) sowie einer Veröffentlichung von *López-Arbesu et al.* mit 128 spanischen Personen (López-Arbesu et al., 2007) mit den vorliegenden Daten vergleichbare Ergebnisse auf (Tabelle 6.1). Ein systematischer Fehler ist somit unwahrscheinlich.

	Allelfrequenzen in der eigenen Kontrollpopulation (N = 771)	Glas et al. 2001 Tissue Antigens (N = 154)	Bolognesi et al. 2001 Eur J Immunogenet (N = 101)	López-Arbesu et al. 2007 Rheumatology (N = 128)
	Deutschland	Deutschland	Italien	Spanien
A4	13,3 %	11,7 %	14,1 %	14,3 %
A5	11,0 %	13,6 %	13,6 %	13,6 %
A5.1	44,0 %	37,0 %	31,6 %	28,3 %
A6	18,4 %	22,4 %	27,2 %	26,0 %
A9	13,3 %	15,3%	13,6 %	17,8 %
A10	0,1 %			

Tabelle 6.1 Vergleich der Allelfrequenzen des Mikrosatelliten *MICA-TM* in der vorliegenden Kontrollpopulation mit denen aus den Kontrollpopulationen aus Studien von *Glas et al.*, *Bolognesi et al.* und *Lopez-Arbesu et al.*

In der vorliegenden Studie wurde eine statistisch signifikante Assoziation des Allels A5 mit der chronischen Parodontitis nachgewiesen. Das Allel war in der Patientengruppe häufiger als in der Kontrollgruppe vertreten. In der separaten Analyse der beiden Gruppen nach der Unterscheidung des jeweiligen Geschlechts ergab sich sogar eine hoch signifikante Assoziation mit dem Allel A5 bei den Männern. Möglicherweise ist dies bedingt durch das erhöhte Risiko für Männer an einer Parodontitis zu erkranken. Zahlreiche Studien befassten

sich mit dem Mikrosatelliten *MICA-TM* und dessen mögliche Ursache für Erkrankungen. Für viele unterschiedliche Erkrankungen wurden Assoziationen mit *MICA-TM*-Allelen nachgewiesen. Insbesondere das Allel A5 wurde auch mit anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht. So wurde es mit einer erhöhten Häufigkeit bei Patienten mit einer Riesenzellarthritis (Gonzalez-Gay et al., 2007), mit einer Multiplen Sklerose (Fdez-Morera et al., 2006) oder mit einem systemischen Lupus erythematoses (Gambelunghe et al., 2005) beobachtet. Für die Träger des Allels A5 wurde sowohl eine erhöhte Wahrscheinlichkeit des Auftretens als auch ein schwererer Verlauf der Erkrankung festgestellt. Große Bedeutung wird dem Allel A5 außerdem in der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 1 beigemessen (Gambelunghe et al., 2007; Van Autreve et al., 2006).

Obwohl vermutet wird, dass das fehlerhafte MICA-Molekül bei Trägern des Allels A5.1 zu einem erhöhten allgemeinen Erkrankungsrisiko auf Grund einer möglicherweise gestörten Interaktion mit dem NKG2D-Rezeptor führt (Suemizu et al., 2002), konnte diese Hypothese in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Die Mutation im Allel A5.1 führt zur Ausbildung eines verfrühten Stopcodons. Die synthetisierten Moleküle haben eine verkürzte transmembrane Komponente und werden falsch in die Plasmamembran eingebaut (siehe Kap. 1.3.1). Es wurde bereits eine Assoziation mit dem autoimmunen Morbus Addison bei einer italienischen Population (Gambelunghe et al., 1999) sowie mit der Colitis ulcerosa in einer chinesischen Population (Ding et al., 2005) nachgewiesen. In der vorliegenden Studie hat sich jedoch keine signifikante Assoziation der Parodontitis mit dem Allel A5.1 gezeigt, nachdem die Gruppen nach Geschlechtern und in eine Raucher- und Nichtrauchergruppe eingeteilt wurden. So ist in der Gruppe der Männer sowie der Raucher die Allelfrequenz des TM A5.1 in der Kontrollgruppe signifikant gegenüber der Patientengruppe erhöht.

In der Literatur wurde ein protektiver Effekt gegenüber Erkrankungen für Allelträger des TM A9 beschrieben. So wurden negative Assoziationen beim systemischen Lupus erythematoses (Gambelunghe et al., 2005) und beim Diabetes mellitus Typ 1 (Van Autreve et al., 2006) beobachtet. Im Gegensatz dazu fand sich in der vorliegenden Studie eine positive Assoziation des Allels TM A9 bei Patienten mit chronischer Parodontitis in der Gruppe der Raucher. Dies lässt vielmehr an einen proinflammatorischen Effekt des Allels denken.

6.3.2 Vergleich der Ergebnisse des Mikrosatelliten *MICB-C1_2_A* mit Daten aus der Literatur

Im Dinukleotidpolymorphismus *MICB-C1_2_A* wurden insgesamt 15 Allele gefunden. Die Validierung der Ergebnisse erfolgte zusätzlich durch den Vergleich der erhobenen Allelfrequenzen in der Kontrollgruppe mit Daten aus der Literatur bei Probanden mit ähnlicher ethnischer Herkunft. So können die Allelfrequenzen mit einer Studie von *Glas et al.* mit 154 Probanden aus dem süddeutschen Raum und einer Studie von *Bolognesi* mit 101 Probanden italienischer Herkunft verglichen werden (Tab 6.2).

	Allelfrequenzen in der vorliegenden Kontrollpopulation (N = 771)	Glas et al. 2001 Tissue Antigens (N = 154)	Bolognesi et al. 2001 Eur J Immunogenet (N = 101)
	Deutschland	Deutschland	Italien
CA14	19,2 %	18,2 %	18,4 %
CA15	10,2 %	10,1 %	17,9%
CA16	0 %	0 %	5,0 %
CA17	20,4 %	21,8 %	12,4 %
CA18	8,8 %	8,4 %	9,5 %
CA19	1,8 %	1,0 %	1,0 %
CA20	2,7 %	3,2 %	6,0 %
CA21	10,3 %	9,1 %	8,0 %
CA22	6,4 %	6,5 %	4,0 %
CA23	2,9 %	5,2 %	3,5 %
CA24	12,1 %	11,7 %	9,0 %
CA25	4,1 %	3,6 %	8,0 %
CA26	1,1 %	0,6 %	2,0 %
CA27	0,1 %	0,6 %	
CA28	0,1 %		

Tabelle 6.2 Vergleich der Allelfrequenzen des Mikrosatelliten *MICB-C1_2_A* in der vorliegenden Kontrollpopulation mit denen aus den Kontrollpopulationen aus Studien von *Glas et al.* und von *Bolognesi et al.*

Es wurde eine positive Assoziation mit der chronischen Parodontitis für die Allele CA 15 und CA 25 nachgewiesen, während sich eine negative Assoziation für das Allel CA 24 zeigte. In der Literatur liegen weniger Daten zum *MICB-CI_2_A* vor als zu dem häufiger erforschten Mikrosatelliten *MICA-TM*. Auch für die Polymorphismen wurde über vereinzelte Assoziationen mit entzündlichen Erkrankungen berichtet. So konnte für das MICB ein Zusammenhang des Allels CA 17 mit der rheumatoiden Arthritis in einer spanischen Population nachgewiesen werden (López-Arbesu et al., 2007). In einer chinesischen Studie fand sich eine Assoziation des Allels CA 18 mit der Colitis ulcerosa, während für das Allel CA 14 eine negative Assoziation ermittelt werden konnte (Lü et al., 2006). In einer indischen Population wurde für das Allel CA 21 ebenfalls ein protektiver Effekt gegen die Lepra gezeigt (Tosh et al., 2006). Da bislang nur wenige Studien zu Assoziationen des Mikrosatelliten *MICB-CI_2_A* und entzündlichen Erkrankungen durchgeführt wurden, können noch keine spezifischen Rückschlüsse über mögliche proinflammatorische oder protektive Effekte einzelner genetischer Varianten geschlossen werden. Möglicherweise besteht jedoch eine Kopplung einer funktionellen Variante des MICB mit entzündlichen Erkrankungen; insbesondere bei der chronischen Parodontitis scheint dies der Fall zu sein.

6.3.3 Vergleich der Ergebnisse des Mikrosatelliten *CI_4_1* mit Daten aus der Literatur

Im Mikrosatelliten *CI_4_1* wurden insgesamt 5 Allele gefunden. Bislang sind erst zwei Studien über den Mikrosatelliten *CI_4_1* veröffentlicht worden. Von diesen entsprach nur die bereits erwähnte Studie von *Glas et al.* über die Zusammenhänge mit der Colitis ulcerosa und dem Morbus Crohn in ihrer ethnischen Zusammenstellung der vorliegenden Studie. Zur Überprüfung der Plausibilität der Ergebnisse erfolgte der Vergleich mit den veröffentlichten Daten. Es zeigten sich vergleichbare Allelfrequenzen (Tabelle 6.3), so dass ein systematischer Fehler nicht wahrscheinlich ist.

	Allelfrequenzen in der vorliegenden Kontrollpopulation (N = 771)	Glas et al. 2001, Tissue Antigens (N = 154)
	Deutschland	Deutschland
Allel 1	7,1 %	7,1 %
Allel 2	37,1 %	39,0 %
Allel 3	24,3 %	17,9 %
Allel 4	24,4 %	25,3 %
Allel 5	7,1 %	10,7 %

Tabelle 6.3 Vergleich der Allelfrequenzen des Mikrosatelliten *CI_4_1* in der vorliegenden Kontrollpopulation mit denen der Kontrollpopulation der Studie von *Glas et al.*

In der hier vorgestellten Arbeit konnte eine negative Assoziation des Allels 3 mit der chronisch marginalen Parodontitis beobachtet werden. Daraus lässt sich rückschließen, dass Träger dieser Allelvariante möglicherweise eine bessere immunologische Abwehreffizienz gegenüber der chronischen Parodontitis besitzen. In den bislang veröffentlichten Studien fand sich weder für die Colitis ulcerosa noch für den Morbus Crohn eine Assoziation mit dem *CI_4_1* (Glas et al., 2001). Hingegen konnte in einer indischen Population ein Zusammenhang mit Spondylarthropathien nachgewiesen werden (Thomas et al., 2006). Da allerdings nur wenige Studien zu diesem Polymorphismus vorliegen, lässt sich noch keine allgemeine Tendenz einzelner Allelvarianten schlussfolgern. Jedoch lässt sich der Mikrosatellit *CI_4_1* mit der chronisch marginalen Parodontitis in Verbindung bringen.

6.3.4 Vergleich der Zwei-Punkt-Haplotypen und der Kopplungsungleichgewichte mit Daten aus der Literatur

Bei der Analyse der Zwei-Punkt-Haplotypen wurden insgesamt 41 Haplotypen gefunden, die eine Häufigkeit von über einem Prozent aufwiesen. Lediglich zwei zeigten eine Assoziation mit der chronisch marginalen Parodontitis. Die positive Assoziation des Haplotypen *MICA-TM: A5 – CI_4_1*: Allel 5 hängt möglicherweise mit dem beschriebenen proinflammatorischen Effekt des Allels A5 im *MICA-TM*-Mikrosatelliten zusammen. Eine negative Assoziation lies sich für den Haplotypen *MICB-CI_2_A: CA 17 – CI_4_1*: Allel 3

berechnen. Dies lässt sich am ehesten durch die beschriebene protektive Wirkung des Allels 3 bezüglich der chronisch marginalen Parodontitis erklären.

Auf Grund der hohen Gendichte im MHC I-Komplex wird von einem hohen Kopplungsungleichgewicht zwischen den einzelnen Genen ausgegangen (Dawkins et al., 1999). Der D' Koeffizient ist eine der häufigsten Methoden, um ein Kopplungsungleichgewicht zwischen allen möglichen Allelkombinationen bei zwei unterschiedlichen multiallelischen Genen zu beschreiben (Zapata et al., 2001a). Oft wird bei multiallelischen Genen ein allgemeines Kopplungsungleichgewicht zwischen den einzelnen Genen angegeben. Zur Vereinfachung des statistischen Modells, werden dabei die einzelnen Allele in zwei Gruppen eingeteilt, um so ein Zwei-Allel-Modell zu erreichen. Dadurch können jedoch Kopplungsungleichgewichte zwischen den einzelnen Allelen verschleiert werden (Zapata et al., 2001b). Um einen dadurch bedingten Informationsverlust zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Studie für jede mögliche Allelkombination der Mikrosatelliten der D' Koeffizient einzeln berechnet. Berücksichtigt wurden nur Allelkombinationen, die mit einer Häufigkeit von $\geq 1\%$ vorkamen. Insgesamt 41 Haplotypen erfüllten diese Bedingung. Ein starkes Kopplungsungleichgewicht ergab sich zwischen dem Allel A5.1 des *MICA-TM* und dem Allel CA25 des *MICB-C1_2_A* ($D' = 0,92$). Außerdem zeigte sich ein weiteres Kopplungsungleichgewicht zwischen dem Allel CA16 des *MICB-C1_2_A* und dem Allel 3 des *C1_4_1* ($D' = 0,92$). In der Literatur wurde neben dem Kopplungsungleichgewicht zwischen den genannten Mikrosatelliten auch ein starkes Kopplungsungleichgewicht mit den Genen der HLA-B-Region beschrieben. So lies sich abhängig von dem physikalischen Abstand der Gensequenzen das stärkste Kopplungsungleichgewicht mit dem HLA-B für den Mikrosatelliten *C1_4_1* nachweisen, gefolgt vom *MICA-TM* und schließlich vom *MICB-C1_2_A* (Glas et al., 2001).

6.4 Bewertung der erhobenen Daten aus funktioneller Sicht

Wie bereits erwähnt wurde in der vorliegenden Studie ein signifikant erhöhtes Auftreten von Trägern des Allels A5 im *MICA-TM*-Mikrosatelliten bei Patienten mit einer chronischen Parodontitis beobachtet. Auch andere chronisch entzündliche Erkrankungen, wie die Riesenzellartheritis (Gonzalez-Gay et al., 2007), die Multiple Sklerose (Fdez-Morera et al., 2006) oder der systemische Lupus erythematoses (Gambelunghe et al., 2005) wiesen eine erhöhte Prävalenz von A5-Allelträgern auf. Zusätzlich wurde ein schwererer Verlauf der Erkrankungen bei diesen Allelträgern festgestellt. Des Weiteren wurde bei Patienten mit einem Diabetes Typ 1 ein früherer Ausbruch der Erkrankung als bei anderen Allelträgern beschrieben (Gambelunghe et al., 2007). Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass das *MICA-TM* A5 Allel bevorzugt die frühe Immunantwort seines Organismus beeinflusst und zu einem rascheren Ausbruch (Sanjeevi, 2006) bzw. einem schwereren Verlauf der Erkrankung führen kann. Die chronische Parodontitis ist eine multifaktorell bedingte Erkrankung, die keinem eindeutigen Erbgang folgt. In diesem Zusammenhang muss bei Trägern mit dem proinflammatorischen Allel A5 von einem allgemein erhöhten Erkrankungsrisiko ausgegangen werden. Verstärkt wird dieser Effekt noch in Gruppen mit allgemein erhöhtem Erkrankungsrisiko, wie es zum Beispiel bei Männern der Fall ist.

Entgegen der bisherigen Meinung, dass die Allelträger des TM A5.1 ein erhöhtes Erkrankungsrisiko aufweisen (Suemizu et al., 2002), hat sich für die chronische Parodontitis in der vorliegenden Studie eine negative Signifikanz für dieses Allel in der Gruppe der Männer sowie der Raucher gezeigt. Dies läßt einen prädiktiven Effekt bei der Entwicklung der chronischen Parodontitis für deren Allelträger insbesondere beim Vorliegen von Risikofaktoren vermuten. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Beobachtung wäre, dass das fehlerhaft exprimierte MICA-Molekül zu einer gestörten Immunantwort der NK-Zellen sowie der $\gamma\delta$ T-Zellen führt. Dadurch könnte möglicherweise der im Kapitel 1.1.6 beschriebene Teufelskreislauf des „critical pathway“ durchbrochen werden. Dieser Effekt wird wiederum durch das Vorhandensein eines Risikofaktors verstärkt, so dass die Immunantwort weiter supprimiert wird.

Im Polymorphismus *MICB-C1_2_A* konnte eine positive Assoziation für die Allele CA 15 und CA 25 sowie eine negative Assoziation für das Allel CA 24 nachgewiesen werden. Diese Assoziationen waren nach der Aufteilung der Patienten- und Kontrollgruppe in Männer und Frauen bzw. Raucher und Nichtraucher allerdings nicht so stark ausgeprägt. Lediglich in der Gruppen der Männer lies sich weiterhin eine signifikant negative Assoziation für das CA 24

und in der Gruppe der Nichtraucher eine signifikant positive Assoziation für das CA 15 nachweisen. Eine Ursache für die geringer ausgeprägte Signifikanz könnte die geringere Probandenzahl in den einzelnen Untergruppen sein. Möglicherweise zeigen sich bei höheren Anzahlen an Studienteilnehmern stärkere Assoziationen. Das CA 24 scheint jedoch einen protektiven Effekt insbesondere bei Patienten mit Risikofaktoren zu haben. Das CA 15 begünstigt anscheinend das Auftreten der chronischen Parodontitis obwohl keine Risikofaktoren vorliegen. Eine weitere positive Assoziation fand sich in der Gruppe der Nichtraucher für das CA 16, das somit ebenfalls als proinflammatorischer Faktor bei Personen ohne Risikofaktor gelten darf.

Für den Mikrosatellit *CI_4_1* wurde, wie bereits erwähnt, eine negative Assoziation des Allels 3 mit der chronischen Parodontitis ermittelt. Nach der Aufteilung in die verschiedenen Untergruppen und der separaten Signifikanzberechnung konnte weiterhin eine signifikant negative Assoziation für das Allel 3 für die Gruppe der Männer und der Nichtraucher ermittelt werden. Die gleichzeitige Assoziation in einer Gruppe mit bzw. ohne Risikofaktor kann bedeuten, dass die Träger des Allel 3 möglicherweise einen Schutzmechanismus besitzen, der unabhängig von bestehenden Risikofaktoren ist.

6.5 Schlussfolgerung

Anhand der erhobenen Daten kann von einer direkten oder indirekten Assoziation aller drei getesteten Mikrosatelliten der MHC I-Region mit der chronischen Parodontitis ausgegangen werden. So zeigten mehrere Allele positive und negative Assoziationen mit der Erkrankung. Auf Grund der hohen Dichte unterschiedlicher Gene in der untersuchten Region sollten sich zukünftige Studien auf Gene beziehen, die ein starkes Kopplungsungleichgewicht mit den genannten Allelen aufweisen und in einem pathophysiologischen Zusammenhang mit der Erkrankung stehen. In Frage kommen auf Grund des starken Kopplungsungleichgewichts mit den genannten Mikrosatelliten die Gene der HLA-B-Region. Aber auch die übrigen Gene des Histokompatibilitätskomplexes kommen als Kandidatengene in Frage, sofern sie noch nicht bezüglich der chronisch marginalen Parodontitis untersucht wurden.

7. Zusammenfassung

Die chronische Parodontitis ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung. Ihre Entstehung und Ausprägung wird von den Virulenzfaktoren der Krankheitserreger und gewissen Risikofaktoren ebenso beeinflusst wie von dem genetischen Hintergrund des Wirts.

Ziel der vorliegenden Studie war es, Assoziationen der Mikrosatelliten *MICA-TM*, *MICB-CI_2_A* und *CI_4_I* mit der chronisch marginalen Parodontitis zu untersuchen. Aufgrund von früheren Studien scheinen die Moleküle MICA und MICB in direktem pathophysiologischen Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen zu stehen.

Die Studienpopulation bestand aus 389 Patienten und 771 gesunden Kontrollpersonen aus dem süddeutschen Raum. In dieser direkten Assoziationsstudie wurde eine DNA-Analyse mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion, der Fragmentanalyse, der Gelelektrophorese und der Allelsequenzierung durchgeführt. Eine positive Assoziation mit der Erkrankung konnte für das Allel A5 im *MICA-TM* nachgewiesen werden. Weitere positive Assoziationen fanden sich im *MICB-CI_2_A*-Mikrosatelliten für die Allele CA 25 und CA 15. Negative Assoziationen mit der Erkrankung konnten für das Allel CA24 im *MICB-CI_2_A*-Polymorphismus und das Allel 3 im *CI_4_I*-Mikrosatelliten ermittelt werden.

Die chronisch marginale Parodontitis scheint direkt oder indirekt in ihrer Entstehung und Ausprägung von den genannten Mikrosatelliten beeinflusst zu werden. Zukünftige Studien über genetische Ursachen der chronisch marginalen Parodontitis sollten sich auf Gene beziehen, die mit den genannten Mikrosatelliten im Kopplungsungleichgewicht und in einem pathophysiologischen Zusammenhang mit der Erkrankung stehen.

8. Literaturverzeichnis

- Albandar JM (2002) Periodontal diseases in North America. *Periodontol* 29:31-69
- Albandar JM, Brunelle JA, Kingman A (1999) Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol* 70:13-29
- Albandar JM, Rams TE (2002) Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontol* 29:7-10
- Ando H, Mizuki N, Ota M, Yamazaki M, Ohno S, Goto K, Miyata Y, Wakisaka K, Bahram S, Inoko H (1997) Allelic variants of the human MHC class I chain-related B gene (MICB). *Immunogenetics* 46:499-508
- Armitage GC (1999) Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol* 4:1-6
- Armitage GC (2004) Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 34:9-21
- Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T (1994) A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6259-6263
- Bahram S, Inoko H, Shiina T, Radosavljevic M (2005) MIC and other NKG2D ligands: from none to too many. *Curr Opin Immunol* 17:505-509
- Bahram S, Mizuki N, Inoko H, Spies T (1996a) Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 44:80-81
- Bahram S, Shiina T, Oka A, Tamiya G, Inoko H (1996b) Genomic structure of the human MHC class I MICB gene. *Immunogenetics* 45:161-162
- Bahram S, Spies T (1996) The MIC gene family. *Res Immunol* 147:328-333
- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T (1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285:727-729
- Biddison WE, Martin R (2001) Peptide binding motifs for MHC class I and II molecules. *Curr Protoc Immunol Appendix 1:Appendix*
- Birkedal-Hansen H (1993) Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res* 28:500-510
- Bjorkman PJ, Parham P (1990) Structure, function and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* 59:253-288
- Bolognesi E, Dalfonso S, Rolando V, Fasano ME, Pratico L, Momigliano-Richiardi P (2001) MICA and MICB microsatellite alleles in HLA extended haplotypes. *Eur J Immunogenet* 28:523-530

- Borrego F, Kabat J, Kim DK, Lieto L, Maasho K, Pena J, Solana R, Coligan JE (2002) Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol* 38:637-660
- Caillat-Zucman S (2006) How NKG2D ligands trigger autoimmunity? *Hum Immunol* 67:204-207
- Cardon LR, Bell JI (2001) Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2:91-99
- Carosella ED, Moreau P, Aractingi S, Rouas-Freiss N (2001) HLA-G: a shield against inflammatory aggression. *Trends Immunol* 22:553-555
- Chini CC, Leibson PJ (2001) Signal transduction during natural killer cell activation. *Curr Protoc Immunol* Chapter 11:Unit
- Choy MK, Phipps ME (2010) MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. *Trends Mol Med* 16:97-106
- Cobb CM (2006) Lasers in periodontics: a review of the literature. *J Periodontol* 77:545-564
- Davey ME, Costerton J (2006) Molecular genetics analyses of biofilm formation in oral isolates., 42 edn pp 13-26
- Dawkins R, Leelayuwat C, Gaudieri S, Tay G, Hui J, Cattley S, Martinez P, Kulski J (1999) Genomics of the major histocompatibility complex: haplotypes, duplication, retroviruses and disease. *Immunol Rev* 167:275-304
- Dennison, Van Dyke T (1997) The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease., 14 edn pp 54-78
- Ding Y, Xia B, Lu M, Zhang Y, Li J, Ye M, Luo H, Yu J, Zhang X, Tan J (2005) MHC class I chain-related gene A-A5.1 allele is associated with ulcerative colitis in Chinese population. *Clin Exp Immunol* 142:193-198
- Draveau R, Tanner A, Page R (1997) The microbial challenge in periodontitis., 14 edn pp 12-32
- Eagle RA, Traherne JA, Ashiru O, Wills MR, Trowsdale J (2006) Regulation of NKG2D ligand gene expression. *Hum Immunol* 67:159-169
- Ehrlich LIR, Ogasawara K, Hamerman JA, Takaki R, Zingoni A, Allison JP, Lanier LL (2005) Engagement of NKG2D by Cognate Ligand or Antibody Alone Is Insufficient to Mediate Costimulation of Human and Mouse CD8+ T Cells. *J Immunol* 174:1922-1931
- Fdez-Morera JL, Tunon A, Rodriguez-Rodero S, Rodrigo L, Martinez-Borra J, Gonzalez S, Lopez-Vazquez A, Lahoz CH, Lopez-Larrea C (2006) Clinical behavior of multiple sclerosis is modulated by the MHC class I-chain-related gene A. *Tissue Antigens* 67:409-414
- Fine DH, Kaplan J, Scott C, Schreiner H (2006) How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a model for infectious disease., 42 edn pp 114-157

- Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S (1996) Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 44:351-357
- Foissac A, Salhi M, Cambon-Thomsen A (2000) Microsatellites in the HLA region: 1999 update. *Tissue Antigens* 55:477-509
- Gambano G, Anglani F, D'Angelo A (2000) Association studies of genetic polymorphisms and complex disease. *The Lancet* 355:308-311
- Gambelunghe G, Brozzetti A, Ghaderi M, Candeloro P, Tortoioli C, Falorni A (2007) MICA gene polymorphism in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1110:92-98
- Gambelunghe G, Brozzetti AL, Ghaderi M, Tortoioli C, Falorni A (2006) MICA A8: a new allele within MHC class I chain-related A transmembrane region with eight GCT repeats. *Hum Immunol* 67:1005-1007
- Gambelunghe G, Falorni A, Ghaderi M, Laureti S, Tortoioli C, Santeusano F, Brunetti P, Sanjeevi CB (1999) Microsatellite polymorphism of the MHC class I chain-related (MIC-A and MIC-B) genes marks the risk for autoimmune Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3701-3707
- Gambelunghe G, Gerli R, Bocci EB, Del SP, Ghaderi M, Sanjeevi CB, Bistoni O, Bini V, Falorni A (2005) Contribution of MHC class I chain-related A (MICA) gene polymorphism to genetic susceptibility for systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 44:287-292
- Gao X, Single RM, Karacki P, Marti D, O'Brien SJ, Carrington M (2006) Diversity of MICA and Linkage Disequilibrium with HLA-B in Two North American Populations. *Human Immunology* 67:152-158
- Gaunt TR, Rodriguez S, Zapata C, Day IN (2006) MIDAS: software for analysis and visualisation of interallelic disequilibrium between multiallelic markers. *BMC Bioinformatics* 7:227
- Germain RN, Margulies DH (1993) The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* 11:403-450
- Glas J, Maier K, Wetzke M, Henninger M, Weiss EH, Folwaczny M (2008) MICA*055: A new allele with eight GCT repeats in the exon 5 microsatellite. *Tissue Antigens* 72:410-411
- Glas J, Martin K, Brännler G, Kopp R, Folwaczny C, Weiss EH, Albert ED (2001) MICA, MICB and C1-4-1 polymorphism in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 58:243
- Gonzalez-Gay MA, Rueda B, Vilchez JR, Lopez-Nevot MA, Robledo G, Ruiz MP, Fernández O, Garcia-Porrúa C, Gonzalez-Escribano MF, Martin J (2007) Contribution of MHC class I region to genetic susceptibility for giant cell arteritis. *Rheumatology* 46:431-434
- Goto K, Ota M, Maksymowych WP, Mizuki N, Yabuki K, Katsuyama Y, Kimura M, Inoko H, Ohno S (1998) Association between MICA gene A4 allele and acute anterior uveitis in white patients with and without HLA-B27. *American Journal of Ophthalmology* 126:436-441

Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T (1996) Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12445-12450

Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T (2001) Costimulation of CD8 $\alpha\beta$ T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2:255-260

Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T (1999) Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ T cells of MICA and MICB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:6879-6884

Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T (1998) Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells. *Science* 279:1737-1740

Haffajee, Teles R, Socransky S (2006) The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota., 42 edn pp 219-258

Hamada H, Kakunaga T (1982) Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome. *Nature* 298:396-398

Hart TC, Kornman K (1997) Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis., 14 edn pp 202-215

Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Vaeth M, Poulsen S, Kilian M (2008) Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet* 371:237-242

Hellwig E, Klimek J, Attin T (2003) *Einführung in die Zahnerhaltung*, 3. Auflage edn. Urban & Fischer,

Hill WG (1974) Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. *Heredity* 33:229-239

Hughes AL, Yeager M, Ten Elshof AE, Chorney MJ (1999) A new taxonomy of mammalian MHC class I molecules. *Immunol Today* 20:22-26

Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA (2004) 'Racial' differences in genetic effects for complex diseases. *Nat Genet* 36:1312-1318

Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG (2001) Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet* 29:306-309

Ioannidis JP, Trikalinos TA, Ntzani EE, Contopoulos-Ioannidis DG (2003) Genetic associations in large versus small studies: an empirical assessment. *Lancet* 361:567-571

Ishikawa I, Nakashima K, Koseki T, Nagasawa T, Watanabe H, Arakawa S, Nitta H, Nishihara T (1997) Introduction of the immune response of periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis., 14 edn pp 79-111

- Janeway jr. CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (2005) *Immunobiology*, 6th edn. Garland Science Publishing, New York
- Johnson GK, Hill M (2004b) Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol* 75:196-209
- Jordan RC (2004) Diagnosis of periodontal manifestations of systemic diseases. *Periodontol* 2000 34:217-229
- Kimura A, Kobayashi Y, Takahashi M, Nobuhisa O, Kitamura H, Nakamura T, Satoh M, Sasaoka T, Hiroi S, Arimura T, Akai J, Aerbajinai W, Yasukochi Y, Numano F (1998a) MICA gene polymorphism in Takayasu's arteritis and Buerger's disease. *International Journal of Cardiology* 66:S107-S113
- Kimura T, Goto K, Yabuki K, Mizuki N, Tamiya G, Sato M, Kimura M, Inoko H, Ohno S (1998b) Microsatellite polymorphism within the MICB gene among Japanese patients with Behçet's disease. *Human Immunology* 59:500-502
- Kinane DF, Demuth DR, Gorr SU, Hajishengallis GN, Martin MH (2007) Human variability in innate immunity. *Periodontol* 2000 45:14-34
- Kinane DF, Hart TC (2003) Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 14:430-449
- Kolenbrandner PE, Palmer jr. R, Rickard A, Jakubovics N, Chalmers N, Diaz P (2006) Bacterial interactions and successions during plaque development., 42 edn pp 47-79
- Komatsu-Wakui M, Tokunaga K, Ishikawa J, Kashiwase K, Moriyama S, Tsuchiya N, Ando H, Shiina T, Geraghty DE, Inoko H, Juji T (1999) MIC-A polymorphism in Japanese and a MIC-A-MIC-B null haplotyp. *Immunogenetics* 49:620-628
- Kornman K, Page R, Tonetti M (1997) The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players., 14 edn pp 33-53
- Kruglyak L, Nickerson DA (2001) Variation is the spice of life. *Nat Genet* 27:234-236
- Liu CJ, Lee YJ, Chang KW, Shih YN, Liu HF, Dang CW (2004) Polymorphism of the MICA gene and risk for oral submucous fibrosis. *J Oral Pathol Med* 33:1-6
- Liu CJ, Lee YJ, Liu HF, Dang CW, Chang CS, Leu YS, Chang KW (2002) Increase of the frequency of MICA gene A6 allele in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 31:323-328
- Lopez NJ, Socransky SS, Da S, I, Japlit MR, Haffajee AD (2006) Effects of metronidazole plus amoxicillin as the only therapy on the microbiological and clinical parameters of untreated chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 33:648-660
- López-Arbesu R, Ballina-García FJ, Alperi-López M, López-Soto A, Rodríguez-Rodero S, Martínez-Borra J, López-Vázquez A, Fernández-Morera JL, Riestra-Noriega JL, Queiro-Silva R, Quiñones-Lombraña A, López-Larrea C, Gonzalez S (2007) MHC class I chain-related gene B (MICB) is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Rheumatology* 46:426-430

- Lopez-Botet M, Bellon T (1999) Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I. *Curr Opin Immunol* 11:301-307
- Lopez-Botet M, Llano M, Navarro F, Bellon T (2000) NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules. *Semin Immunol* 12:109-119
- Lopez-Hernandez R, Valdes M, Lucas D, Campillo JA, Martinez-Garcia P, Salama H, Lopez M, Salgado G, Botella C, Minguela A, Miras M, Varez-Lopez MR, Carballo F, Muro M (2010) Association analysis of MICA gene polymorphism and MICA-129 dimorphism with inflammatory bowel disease susceptibility in a Spanish population. *Hum Immunol* 71:512-514
- Lü M, Xia B, Li J, Ye M, Zhang X, Tan Q (2006) MICB microsatellite polymorphism is associated with ulcerative colitis in Chinese population. *Clin Immunol* 120:199-204
- Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF (2005) Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol* 32 Suppl 6:57-71
- Madsen BE, Villesen P, Wiuf C (2008) Short tandem repeats in human exons: a target for disease mutations. *BMC Genomics* 9:410
- Marsh SG (2008) Nomenclature for factors of the HLA system, update December 2007. *Tissue Antigens* 71:262-263
- Maurice MM, Gould DS, Carroll J, Vugmeyster Y, Ploegh HL (2001) Positive selection of a MHC class-I restricted TCR in the absence of classical MHC class I molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7437-7442
- Mealey BL, Oates TW (2006) Diabetes mellitus and periodontal diseases
2. *J Periodontol* 77:1289-1303
- Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, Califano JV, Burmeister JA, Schenkein HA (2000) Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol* 71:1699-1707
- Micheelis W, Reich E (1997) Dritte Deutsche Mundgesundheits-Studie (DMS III). Deutscher Ärzteverlag, Köln 1999
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 16:1215
- Mizuki N, Ota M, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsuyama Y, Yamazaki M, Watanabe K, Goto K, Nakamura S, Bahram S, Inoko H (1997) Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: A strong association of six GCT repetitions with Behçet disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:1298-1303
- Molinero LL, Domaica CI, Fuertes MB, Girart MV, Rossi LE, Zwirner NW (2006) Intracellular Expression of MICA in Activated CD4 T Lymphocytes and Protection from NK Cell-Mediated MICA-Dependent Cytotoxicity. *Human Immunology* 67:170-182

- Mombelli A, Casagni F, Medianos P (2002) Can presence or absence of periodotal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review., 29(Suppl. 3) edn pp 10-21
- Mombelli A (2006) Heresy? Treatment of chronic periodontitis with systemic antibiotics only. *J Clin Periodontol* 33:661-662
- Nyman, Lindhe J (1997) Examination of patients with periodontal disease. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP (eds) *Clinical periodontology and implant dentistry*. Munksgaard, Copenhagen, pp 383-395
- Oliver RC, Tervonen T (1994) Diabetes--a risk factor for periodontitis in adults? 24. *J Periodontol* 65:530-538
- Ott J (1991) *Analysis of human genetic linkage*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London
- Page R, Offenbacher S, Schroeder H, Seymour G, Kornman K (1997) Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions., 14 edn pp 216-248
- Paster BJ, Olsen I, Aas J, Dewhirst F (2006) The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites., 42 edn pp 80-87
- Picolos DK, Lerche-Sehm J, Abron A, Fine JB, Papapanou PN (2005) Infection patterns in chronic and aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 32:1055-1061
- Reichert S, Stein J, Gautsch A, Schaller HG, Machulla HK (2002) Gender differences in HLA phenotype frequencies found in German patients with generalized aggressive periodontitis and chronic periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 17:360-368
- Roda-Navarro P, Reyburn HT (2009) The Traffic of the NKG2D/Dap10 Receptor Complex during Natural Killer (NK) Cell Activation. *Journal of Biological Chemistry* 284:16463-16472
- Rodriguez-Rodero S, Rodrigo L, Fdez-Morera JL, Martinez-Borra J, Lopez-Vazquez A, Fuentes D, Lopez-Arbesu R, Lopez-Soto A, Gonzalez S, Lopez-Larrea C (2006) MHC class I chain-related gene B promoter polymorphisms and celiac disease. *Hum Immunol* 67:208-214
- Sanjeevi CB (2006) Genes influencing innate and acquired immunity in type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults. *Ann N Y Acad Sci* 1079:67-80
- Schenkein HA (2002) Finding genetic risk factors for periodontal diseases: is the climb worth the view? *Periodontol* 2000 30:79-90
- Schrambach S, Ardizzone M, Leymarie V, Sibilija J, Bahram S (2007) In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer. *PLoS ONE* 2:e518
- Sheiham A, Netuveli GS (2002) Periodontal diseases in Europe. *Periodontol* 2000 29:104-121
- Shi MM (2002) Technologies for individual genotyping: detection of genetic polymorphisms in drug targets and disease genes. *Am J Pharmacogenomics* 2:197-205

- Shiina T, Tamiya G, Oka A, Takishima N, Yamagata T, Kikkawa E, Iwata K, Tomizawa M, Okuaki N, Kuwano Y, Watanabe K, Fukuzumi Y, Itakura S, Sugawara C, Ono A, Yamazaki M, Tashiro H, Ando A, Ikemura T, Soeda E, Kimura M, Bahram S, Inoko H (1999) Molecular dynamics of MHC genesis unraveled by sequence analysis of the 1,796,938-bp HLA class I region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13282-13287
- Shiina T, Tamiya G, Oka A, Yamagata T, Yamagata N, Kikkawa E, Goto K, Mizuki N, Watanabe K, Fukuzumi Y, Taguchi S, Sugawara C, Ono A, Chen L, Yamazaki M, Tashiro H, Ando A, Ikemura T, Kimura M, Inoko H (1998) Nucleotide Sequencing Analysis of the 146-Kilobase Segment around the *IkBL* and *MICA* Genes at the Centromeric End of the HLA Class I Region. *Genomics* 47:372-382
- Sierp G (1989) *Biomathematische Analyse des HLA-Systems*. Dissertation an der medizinischen Fakultät der LMU München,
- Stein J, Reichert S, Gautsch A, Machulla HK (2003) Are there HLA combinations typical supporting for or making resistant against aggressive and/or chronic periodontitis? *J Periodontal Res* 38:508-517
- Suemizu H, Radosavljevic M, Kimura M, Sadahiro S, Yoshimura S, Bahram S, Inoko H (2002) A basolateral sorting motif in the *MICA* cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2971-2976
- Svejgaard A, Jersild C, Nielsen LS, Bodmer WF (1974) HLA antigens and disease. Statistical and genetical considerations. *Tissue Antigens* 4:95-105
- Tamiya G, Ota M, Katsuyama Y, Shiina T, Oka A, Makino S, Kimura M, Inoko H (1998) Twenty-six new polymorphic microsatellite markers around the HLA-B, -C and -E loci in the human MHC class I region. *Tissue Antigens* 51:337-346
- Tang KF, Ren H, Cao J, Zeng GL, Xie J, Chen M, Wang L, He CX (2008) Decreased *Dicer* expression elicits DNA damage and up-regulation of *MICA* and *MICB*. *J Cell Biol* 182:233-239
- Teles R, Haffajee A, Socransky S (2006) Microbiological goals of periodontal therapy., 42 edn pp 180-218
- The MHC sequencing consortium (1999) Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 401:921-923
- Thomas R, Philip J, Banerjee M (2006) Association of an extended haplotype of HLA class I alleles and their flanking microsatellites with spondyloarthropathies in South Indian patients. *Hum Immunol* 67:318-323
- Timmerman MF, van der Weijden GA (2006) Risk factors for periodontitis. *Int J Dent Hyg* 4:2-7
- Tonetti MS, Mombelli A (1999) Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol* 4:39-53
- Tonetti MS, Freiburghaus K, Lang N, Bickel M (1993) Detection of interleukin-8 and metalloproteinases transcripts in healthy and diseased gingival biopsies by RNA/PCR., 28 edn pp 511-513

- Tosh K, Ravikumar M, Bell JT, Meisner S, Hill AVS, Pitchappan R (2006) Variation in MICA and MICB genes and enhanced susceptibility to paucibacillary leprosy in South India. *Hum Mol Genet* 15:2880-2887
- Townsend A, Bodmer H (1989) Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 7:601-624
- Van Autreve JE, Koeleman BP, Quartier E, Aminkeng F, Weets I, Gorus FK, Van der Auwera BJ (2006) MICA is associated with type 1 diabetes in the Belgian population, independent of HLA-DQ. *Hum Immunol* 67:94-101
- Van Dyke TE, Hoop GA (1990) Neutrophil function and oral disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1:117-133
- van Winkelhoff AJ (2003) Microbiology in diagnosis and treatment planning in periodontics. *Int J Dent Hyg* 1:131-137
- Venkataraman GM, Suciú D, Groh V, Boss JM, Spies T (2007) Promoter region architecture and transcriptional regulation of the genes for the MHC class I-related chain A and B ligands of NKG2D. *J Immunol* 178:961-969
- Vivier E, Tomasello E, Paul P (2002) Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Curr Opin Immunol* 14:306-311
- Weber JL, Wong C (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet* 2:1123-1128
- Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrandner PE (1996) Mechanism of adhesion by oral bacteria. *Annual Review of Microbiology* 50:513
- Williams A, Peh CA, Elliott T (2002) The cell biology of MHC class I antigen presentation. *Tissue Antigens* 59:3-17
- Wolf HF, Rateitschak EM, Rateitschak KH (2004) *Parodontologie, 3., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage* edn. Thieme
- Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, Phillips JH (1999) An Activating Immunoreceptor Complex Formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285:730-732
- Yamamoto K, Fujiyama Y, Andoh A, Bamba T, Okabe H (2001) Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1526:10-12
- Yasuda N (1978) Estimation of haplotype frequency and linkage disequilibrium parameter in the HLA system., 12 edn pp 315-322
- Yoshie H, Kobayashi T, Tai H, Galicia JC (2007) The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontol* 2000 43:102-132
- Zapata C, Carollo C, Rodriguez S (2001a) Sampling variance and distribution of the D' measure of overall gametic disequilibrium between multiallelic loci. *Ann Hum Genet* 65:395-406

Zapata C, Rodriguez S, Visedo G, Sacristan F (2001b) Spectrum of nonrandom associations between microsatellite loci on human chromosome 11p15. *Genetics* 158:1235-1251

Zwirner NW, Fernandez-Vina MA, Stastny P (1998) MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells and monocytes. *Immunogenetics* 47:139-148

9. Anhang

MICA- TM- Allel	Allelfrequenzen Patientengruppe N = 778 (%)	Allelfrequenzen Kontrollgruppe N = 1542 (%)	χ^2-Wert	p-Wert	OR	KI 95%
A4	100 (12,9)	205 (13.3)	0.05	0.823	0.96	0.74-1.24
A5	109 (14,9)	169 (11.0)	4.28	0.039	2.05	1.63-2.60
A5.1	311 (40,0)	679 (44.0)	3.32	0.068	0.85	0.71-1.01
A6	138 (17.7)	283 (18.4)	0.09	0.764	0.96	0.76-1.20
A8	2 (0.3)	0 (0.0)	1.54	0.215	k.A.	k.A.
A9	117 (15.1)	205 (13.3)	1.17	0.279	1.15	0.90-1.48
A10	1 (0.1)	1 (0.1)	0.07	0.791	1.98	0.12-31.75

Tabelle 5.1 Allelfrequenz des *MICA-TM*-Mikrosatellits bei Patienten mit chronisch marginaler Parodontitis im Vergleich zur Kontrollgruppe mit gesunden Individuen. Die Auswertung erfolgte mittels χ^2 -Test mit Yates-Korrektur, angegeben sind zusätzlich die χ^2 -Werte, die p-Werte, die Odds-Ratio (OR) für das seltene Allel und das Konfidenzintervall bei 95% (KI 95%).

MICB- C1_2_A Allel	Allelfrequenzen Patientengruppe N = 778 (%)	Allelfrequenzen Kontrollgruppe N = 1542 (%)	χ^2-Wert	p-Wert	OR	KI 95%
CA14	140 (18.0)	296 (19.2)	0.41	0.522	0.92	0.74-1.15
CA15	106 (13.6)	157 (10.2)	5.76	0.016	1.39	1.07-1.81
CA16	3 (0.4)	0 (0.0)	3.34	0.068	k.A.	k.A.
CA17	145 (18.6)	314 (20.4)	0.86	0.354	0.90	0.72-1.12
CA18	72 (9.3)	135 (8.8)	0.1	0.752	1.06	0.79-1.43
CA19	12 (1.5)	27 (1.8)	0.04	0.842	0.88	0.44-1.74
CA20	17 (2.2)	41 (2.7)	0.3	0.584	0.82	0.46-1.45

CA21	76 (9.8)	159 (10.3)	0.11	0.740	0.94	0.71-1.26
CA22	51 (6.6)	99 (6.4)	0	1.000	1.02	0.72-1.45
CA23	30 (3.9)	45 (2.9)	1.17	0.279	1.33	0.83-2.14
CA24	69 (8.9)	186 (12.1)	5.07	0.024	0.71	0.53-0.95
CA25	52 (6.7)	63 (4.1)	6.87	0.009	1.68	1.15-2.45
CA26	3 (0.4)	17 (1.1)	2.33	0.127	0.35	0.10-1.89
CA27	2 (0.3)	2 (0.1)	0.03	0.863	0.69	0.28-14.12
CA28	0 (0.0)	1 (0.1)	0.12	0.729	k.A.	k.A.

Tabelle 5.2 Allelfrequenz des *MICB-CI_2_A*-Mikrosatellits bei Patienten mit chronisch marginaler Parodontitis im Vergleich zur Kontrollgruppe mit gesunden Individuen. Die Auswertung erfolgte mittels χ^2 -Test mit Yates-Korrektur, angegeben sind zusätzlich die χ^2 -Werte, die p-Werte, die Odds-Ratio (OR) für das seltene Allel und das Konfidenzintervall bei 95% (KI 95%).

C1_4_1- Allel	Allelfrequenzen Patientengruppe N = 778 (%)	Allelfrequenzen Kontrollgruppe N = 1542 (%)	χ^2-Wert	p-Wert	OR	KI 95%
1	53 (6.8)	109 (7.1)	0.02	0.889	0.96	0.68-1.35
2	300 (38.6)	572 (37.1)	0.41	0.522	1.06	0.89-1.27
3	149 (19.1)	375 (24.3)	7.6	0.006	0.74	0.60-0.91
4	202 (26.0)	377 (24.4)	0.56	0.454	1.08	0.89-1.32
5	74 (9.5)	109 (7.1)	3.92	0.048	1.38	1.01-1.88

Tabelle 5.3 Allelfrequenz des *C1_4_1*-Mikrosatellits bei Patienten mit chronisch marginaler Parodontitis im Vergleich zur Kontrollgruppe mit gesunden Individuen. Die Auswertung erfolgte mittels χ^2 -Test mit Yates-Korrektur, angegeben sind zusätzlich die χ^2 -Werte, die p-Werte, die Odds-Ratio (OR) für das seltene Allel und das Konfidenzintervall bei 95% (KI 95%).

MICA- TM-Allel	Allelfrequenzen Patientengruppe (%)	Allelfrequenzen Kontrollgruppe (%)	χ^2-Wert	p-Wert	OR	KI 95%
<i>Frauen</i>						
A4	51 (12.9)	59 (11.7)	0.19	0.663	1.12	0.75-1.66
A5	40 (10.1)	69 (13.7)	2.36	0.125	0.71	0.47-1.07
A5.1	167 (42.2)	226 (44.8)	0.54	0.462	0.90	0.69-1.17
A6	76 (19.2)	96 (19.0)	0	1.000	1.01	0.72-1.41
A8	2 (0.5)	0 (0.0)	0.78	0.377	k.A.	k.A.
A9	60 (15.2)	54 (10.7)	3.56	0.059	1.49	1.00-2.21
A10	-	-	-	-	-	-
<i>Männer</i>						
A4	47 (13.1)	145 (14.1)	0.13	0.718	0.92	0.65-1.31
A5	67 (18.7)	99 (9.6)	20.05	0.000	2.17	1.55-3.03
A5.1	134 (37.4)	450 (43.7)	4.02	0.045	0.77	0.60-0.99
A6	54 (15.1)	185 (17.9)	1.35	0.245	0.81	0.58-1.13
A8	-	-	-	-	-	-
A9	55 (15.4)	150 (14.6)	0.08	0.777	1.06	0.76-1.49
A10	1 (0.3)	1 (0.1)	0	1.000	2.88	0.18-46.20
<i>Raucher</i>						
A4	28 (12.2)	24 (12.4)	0.01	0.920	0.98	0.55-1.76
A5	40 (17.4)	25 (12.9)	1.32	0.251	1.42	0.83-2.44
A5.1	75 (32.6)	89 (45.9)	7.26	0.007	0.57	0.38-0.85
A6	41 (17.8)	36 (18.6)	0	1.000	0.95	0.58-1.56
A8	-	-	-	-	-	-
A9	46 (20.0)	20 (10.3)	6.8	0.009	2.18	1.24-3.82
A10	-	-	-	-	-	-
<i>Nichtraucher</i>						
A4	63 (12.9)	182 (12.9)	0	1.000	1.00	0.73-1.36
A5	62 (12.7)	144 (10.2)	2.05	0.152	1.28	0.93-1.75

A5.1	206 (42.2)	620 (44.0)	0.42	0.517	0.93	0.75-1.143
A6	86 (17.6)	263 (18.7)	0.2	0.655	0.93	0.71-1.22
A8	2 (0.4)	0 (0.0)	2.54	0.111	k.A.	k.A.
A9	68 (13.9)	198 (14.1)	0	1.000	0.99	0.74-1.33
A10	1 (0.2)	1 (0.1)	0	1.000	2.89	0.18-46.28

Tabelle 5.4 Allelfrequenz des *MICA-TM*-Mikrosatellits nach der Differenzierung der Patienten- und Kontrollgruppe nach Geschlecht sowie Raucher bzw. Nichtraucher. Die Auswertung erfolgte mittels χ^2 -Test mit Yates-Korrektur, angegeben sind zusätzlich die χ^2 -Werte, die p-Werte, die Odds-Ratio (OR) für das seltene Allel und das Konfidenzintervall bei 95% (KI 95%).

MICB-C1_2_A-Allel	Allelfrequenzen Patientengruppe (%)	Allelfrequenzen Kontrollgruppe (%)	χ^2 -Wert	p-Wert	OR	KI 95%
<i>Frauen</i>						
CA14	73 (18.4)	92 (18.3)	0	1.000	1.01	0.72-1.42
CA15	55 (13.9)	56 (11.1)	1.34	0.247	1.29	0.87-1.92
CA16	2 (0.5)	0 (0.0)	3.34	0.068	k.A.	k.A.
CA17	76 (19.2)	103 (20.4)	0.14	0.708	0.92	0.66-1.29
CA18	31 (7.8)	44 (8.7)	0.13	0.718	0.89	0.55-1.43
CA19	8 (2.0)	11 (2.2)	0	1.000	0.92	0.37-2.31
CA20	10 (2.5)	12 (2.4)	0.01	0.920	1.06	0.45-2.48
CA21	34 (8.6)	47 (9.3)	0.07	0.791	0.91	0.58-1.45
CA22	22 (5.6)	29 (5.8)	0	1.000	0.96	0.54-1.70
CA23	17 (4.3)	17 (3.4)	0.29	0.590	1.29	0.65-2.55
CA24	40 (10.1)	68 (13.5)	2.1	0.147	0.72	0.48-1.09
CA25	27 (6.8)	19 (3.8)	3.64	0.056	1.87	1.02-3.41
CA26	1 (0.3)	6 (1.2)	1.46	0.227	0.21	0.03-1.75
CA27	-	-	-	-	-	-
CA29	-	-	-	-	-	-
<i>Männer</i>						
CA14	61 (17.0)	202 (19.6)	0	1.000	0.84	0.63-1.15
CA15	46 (12.8)	99 (9.6)	0.98	0.322	1.39	0.96-2.01

CA16	1 (0.3)	0 (0.0)	2.64	0.104	k.A.	k.A.
CA17	65 (18.2)	210 (20.4)	0.31	0.578	0.87	0.64-1.79
CA18	40 (11.2)	90 (8.7)	1.58	0.209	1.31	0.89-1.95
CA19	4 (1.1)	16 (1.6)	0.11	0.740	0.72	0.24-2.16
CA20	6 (1.7)	29 (2.8)	0.98	0.322	0.59	0.24-1.43
CA21	39 (10.9)	111 (10.8)	0	1.000	1.01	0.69-1.49
CA22	28 (7.8)	70 (6.8)	0.28	0.597	1.16	0.74-1.84
CA23	13 (3.6)	28 (2.7)	0.49	0.484	1.35	0.69-2.63
CA24	27 (7.5)	118 (11.4)	3.94	0.047	0.63	0.41-0.98
CA25	24 (6.7)	43 (4.2)	3.17	0.075	1.65	0.99-2.76
CA26	2 (0.6)	11 (1.1)	0.3	0.584	0.52	0.11-2.36
CA27	2 (0.6)	2 (0.2)	0.29	0.590	2.89	0.41-20.58
CA29	0 (0.0)	0 (0.0)	0	1.000	k.A.	k.A.
<i>Raucher</i>						
CA14	40 (17.4)	32 (16.5)	0.01	0.920	1.07	0.64-1.78
CA15	33 (14.3)	18 (9.3)	2.1	0.147	1.64	0.89-3.01
CA16	-	-	-	-	-	-
CA17	33 (14.3)	41 (21.1)	2.91	0.088	0.62	0.38-1.04
CA18	22 (9.6)	23 (11.9)	0.37	0.543	0.79	0.42-1.46
CA19	5 (2.2)	7 (3.6)	0.35	0.554	0.59	0.19-1.90
CA20	7 (3.0)	9 (4.6)	0.36	0.549	0.65	0.24-1.77
CA21	22 (9.6)	18 (9.3)	0	1.000	1.03	0.54-1.99
CA22	24 (10.4)	9 (4.6)	4.15	0.042	2.39	1.09-5.28
CA23	10 (4.3)	4 (2.1)	1.08	0.299	2.16	0.67-7.00
CA24	17 (7.4)	22 (11.3)	1.52	0.218	0.62	0.32-1.21
CA25	16 (7.0)	9 (4.6)	0.64	0.424	1.54	0.66-3.56
CA26	1 (0.4)	2 (1.0)	0.02	0.888	0.42	0.04-4.66
CA27	-	-	-	-	-	-
CA29	-	-	-	-	-	-
<i>Nichtraucher</i>						
CA14	84 (17.2)	265 (18.8)	0.52	0.471	0.90	0.68-1.18
CA15	68 (13.9)	140 (9.9)	5.51	0.019	1.47	1.08-2.00
CA16	3 (0.6)	(0.0)	5.21	0.023	k.A.	k.A.
CA17	99 (20.3)	282 (20.0)	0	1.000	1.02	0.79-1.31
CA18	45 (9.2)	118 (8.4)	0.23	0.632	1.11	0.78-1.59

CA19	4 (0.8)	24 (1.7)	1.39	0.238	0.48	0.16-1.38
CA20	9 (1.8)	35 (2.5)	0.41	0.522	0.74	0.35-1.54
CA21	49 (10.0)	148 (10.5)	0.04	0.842	0.95	0.68-1.33
CA22	25 (5.1)	95 (6.7)	1.35	0.245	0.75	0.47-1.17
CA23	19 (3.9)	43 (3.1)	0.56	0.454	1.29	0.74-2.23
CA24	47 (9.6)	180 (12.8)	3.13	0.077	0.73	0.52-1.02
CA25	32 (6.6)	60 (4.3)	3.66	0.056	1.58	1.01-2.45
CA26	2 (0.4)	15 (1.1)	1.09	0.297	0.38	0.09-1.68
CA27	2 (0.4)	2 (0.1)	0.29	0.590	2.89	0.41-20.59
CA29	0 (0.0)	1 (0.1)	0.31	0.578	k.A.	k.A.

Tabelle 5.5 Allelfrequenz des *MICB-CI_2_A*-Mikrosatellits nach der Differenzierung der Patienten- und Kontrollgruppe nach Geschlecht sowie Raucher bzw. Nichtraucher. Die Auswertung erfolgte mittels χ^2 -Test mit Yates-Korrektur, angegeben sind zusätzlich die χ^2 -Werte, die p-Werte, die Odds-Ratio (OR) für das seltene Allel und das Konfidenzintervall bei 95% (KI 95%).

C1_4_1- Allel	Allelfrequenzen Patientengruppe (%)	Allelfrequenzen Kontrollgruppe (%)	χ^2-Wert	p-Wert	OR	KI 95%
<i>Frauen</i>						
1	29 (7.3)	40 (7.9)	0.05	0.823	0.92	0.56-1.51
2	140 (35.4)	198 (39.3)	1.3	0.254	0.85	0.64-1.11
3	80 (20.2)	124 (24.6)	2.21	0.137	0.78	0.56-1.07
4	111 (28.0)	113 (22.4)	3.44	0.064	1.35	1.00-1.82
5	36 (9.1)	29 (5.8)	3.2	0.074	1.64	0.99-2.72
<i>Männer</i>						
1	22 (6.1)	69 (6.7)	0.06	0.807	0.91	0.56-1.50
2	149 (41.6)	370 (35.9)	3.44	0.064	1.27	0.99-1.63
3	67 (18.7)	251 (24.3)	4.49	0.034	0.71	0.53-0.97
4	83 (23.2)	260 (25.2)	0.5	0.480	0.89	0.67-1.19
5	37 (10.3)	80 (7.8)	1.95	0.163	1.37	0.91-2.06
<i>Raucher</i>						

1	13 (5.7)	13 (6.7)	0.06	0.807	0.83	0.38-1.84
2	104 (45.2)	77 (39.7)	1.1	0.294	1.25	0.85-1.85
3	43 (18.7)	46 (23.7)	1.31	0.252	0.74	0.46-1.18
4	49 (21.3)	47 (24.2)	0.36	0.549	0.85	0.54-1.34
5	21 (9.1)	11 (5.7)	1.34	0.247	1.67	0.78-3.56
<i>Nichtraucher</i>						
1	35 (7.2)	96 (6.8)	0.03	0.863	1.06	0.71-1.58
2	175 (35.9)	503 (35.7)	0	1.000	1.01	0.81-1.25
3	96 (19.7)	350 (24.9)	5.13	0.024	0.74	0.57-0.95
4	135 (27.7)	355 (25.2)	1.01	0.315	1.13	0.90-1.43
5	47 (9.6)	104 (7.4)	2.19	0.139	1.34	0.93-1.92

Tabelle 5.6 Allelfrequenz des C1_4_1-Mikrosatellits nach der Differenzierung der Patienten- und Kontrollgruppe nach Geschlecht sowie Raucher bzw. Nichtraucher. Die Auswertung erfolgte mittels χ^2 -Test mit Yates-Korrektur, angegeben sind zusätzlich die χ^2 -Werte, die p-Werte, die Odds-Ratio (OR) für das seltene Allel und das Konfidenzintervall bei 95% (KI 95%).

Haplotyp	Patientengruppe (%)	Kontrollgruppe (%)	χ^2 -Wert	p-Wert	OR	KI 95%
<i>MICA-TM – MICB-CI_2_A</i>						
A4-CA14	46 (5.9)	81 (5.3)	0.32	0.572	1.13	0.78-1.65
A4-CA17	11 (1.5)	20 (1.3)	0	1.000	1.09	0.52-2.29
A4-CA22	19 (2.5)	38 (2.5)	0.01	0.920	0.99	0.57-1.73
A4-CA26	12 (1.5)	36 (2.3)	1.23	0.267	0.66	0.34-1.27
A5-CA14	14 (1.8)	49 (3.2)	3.21	0.073	0.56	0.31-1.02
A5-CA26	33 (4.3)	49 (3.2)	0.01	0.920	1.35	0.86-2.12
A5.1-CA14	37 (4.8)	73 (4.7)	0.01	0.920	1.00	0.67-1.50
A5.1-CA16	65 (8.3)	166 (10.8)	3.09	0.079	0.76	0.56-1.02
A5.1-CA22	106 (13.7)	238 (15.5)	1.2	0.273	0.86	0.68-1.11
A5.1-CA23	35 (4.5)	63 (4.1)	0.13	0.718	1.11	0.72-1.69

A5.1-CA24	10 (1.3)	27 (1.8)	0.45	0.502	0.73	0.35-1.52
A5.1-CA26	11 (1.4)	26 (1.7)	0.1	0.752	0.84	0.41-1.70
A6-CA14	36 (4.6)	85 (5.5)	0.65	0.420	0.83	0.56-1.24
A6-CA15	16 (2.0)	23 (1.5)	0.69	0.406	1.39	0.73-2.64
A6-CA22	12 (1.5)	17 (1.1)	0.5	0.484	1.41	0.67-2.96
A6-CA23	35 (4.5)	74 (4.8)	0.05	0.823	0.93	0.62-1.41
<i>MICA/TM - CI_4_1</i>						
A4-1	38 (4.9)	58 (3.8)	2.19	0.242	1.31	0.86-2.00
A4-3	53 (6.8)	127 (8.3)	1.27	0.260	0.81	0.58-1.14
A5-1	9 (1.1)	32 (2.1)	2.01	0.156	0.55	0.26-1.16
A5-2	66 (8.5)	123 (8.0)	0.09	0.729	1.07	0.78-1.46
A5-5	26 (3.3)	20 (1.3)	10.1	0.002	2.63	1.46-4.74
A5.1-2	82 (10.6)	135 (8.8)	1.74	0.187	1.23	0.92-1.64
A5.1-3	99 (12.7)	230 (14.9)	1.86	0.173	0.83	0.65-1.07
A5.1-4	131 (16.8)	291 (18.9)	1.3	0.254	0.87	0.69-1.09
A6-2	122 (15.7)	265 (17.2)	0.74	0.390	0.90	0.71-1.13
<i>MICB-CI_2_A - CI_4_1</i>						
CA14-1	40 (5.2)	65 (4.2)	0.82	0.365	1.23	0.82-1.84
CA14-2	73 (9.3)	176 (11.4)	2.02	0.155	0.80	0.60-1.07
CA14-3	16 (2.1)	33 (2.1)	0	1.000	0.96	0.53-1.76
CA14-4	17 (2.2)	26 (1.7)	0.46	0.498	1.30	0.70-2.42
CA15-2	21 (2.7)	32 (2.1)	0.64	0.424	1.31	0.75-2.29
CA17-3	63 (8.2)	177 (11.5)	6.01	0.014	0.68	0.50-0.92
CA17-4	23 (3.0)	27 (1.8)	3.01	0.083	1.71	0.97-3.00
CA22-2	15 (2.0)	41 (2.7)	0.88	0.348	0.72	0.40-1.31
CA22-3	20 (2.6)	52 (3.3)	0.85	0.357	0.76	0.45-1.28
CA22-4	104 (13.4)	213 (13.8)	0.04	0.823	0.96	0.75-1.24
CA23-2	35 (4.5)	74 (4.8)	0.05	0.823	0.93	0.62-1.41
CA23-4	37 (4.8)	63 (4.1)	0.41	0.522	1.17	0.78-1.78
CA24-3	11 (1.4)	20 (1.3)	0	1.000	1.09	0.52-2.29

CA25-2	11 (1.4)	19 (1.3)	0.03	0.863	1.15	0.54-2.43
CA26-2	40 (5.1)	77 (5.0)	0	1.000	1.03	0.70-1.53
CA26-3	14 (1.9)	48 (3.1)	2.94	0.086	0.57	0.31-1.04

Tabelle 5.7 Analyse der Zwei-Punkt-Haplotypen bei Patienten mit chronisch marginaler Parodontitis im Vergleich zur Kontrollgruppe mit gesunden Individuen. Die Haplotypen wurden ab einer Häufigkeit von ≥ 1 berücksichtigt. Die Auswertung erfolgte mittels χ^2 -Test mit Yates-Korrektur, angegeben sind zusätzlich die χ^2 -Werte, die p-Werte, die Odds-Ratio (OR) für das seltene Allel und das Konfidenzintervall bei 95% (KI 95%).

Danksagung

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Matthias Folwaczny für die kompetente Betreuung dieser Arbeit, für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse und für das Korrekturlesen der Dissertationsschrift bedanken.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Jürgen Glas für die Betreuung der Arbeit und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Dissertationsschrift.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung während der Arbeit an dieser Dissertation.

Den Patienten möchte ich für die Bereitschaft, an dieser Studie teilzunehmen, herzlich danken.