

**Aus der Medizinischen Poliklinik, Klinikum Innenstadt der LMU München in
Kooperation mit dem Institut für Anthropologie und Humangenetik der LMU München
komm. Direktor: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff
Institutsleiterin: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. E. Weiß**

Polymorphismen immunrelevanter Gene bei der Rheumatoiden Arthritis

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

vorgelegt von

Jörg Günter Steiner

aus

München

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Privat-Dozent Dr. med. H. Kellner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Roscher
Prof. Dr. H.-G. Klobeck
Prof. Dr. U. Beuers

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2002

I. Inhaltsverzeichnis

II. Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Die Rheumatoide Arthritis.....	1
1.2 Immunabwehr und Arthritis.....	1
1.3 Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC).....	3
1.4 HLA und RA.....	4
1.5 Zytokine.....	4
1.5.1 Tiermodelle.....	5
1.6 Ziel der Arbeit.....	8
2. Material.....	9
2.1 Patientenkollektiv und Kontrollen.....	9
2.2 Geräte.....	9
2.3 Chemikalien.....	10
2.4 Enzyme.....	12
2.4.1 Restriktionsenzyme.....	12
2.4.2 Weitere verwendete Enzyme.....	12
2.5 Molekulargrößenstandard.....	12
2.6 Oligonukleotide.....	13
2.6.1 Faustregel zur Bestimmung der Anlagerungstemperatur.....	13
2.6.2 Primer für den Nachweis des TNFA-Promotorpolymorphismus (-308).....	13
2.6.3 Primer für den Nachweis der LTA-Polymorphismen.....	13
2.6.4 Primer für die Amplifikation der Mikrosatelliten.....	14
3. Methoden.....	15
3.1 Molekulargenetische Methoden.....	15
3.1.1 Isolierung genomischer DNS aus Vollblut.....	15
3.1.2 Die Phenolextraktion.....	15
3.1.3 Photometrische Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren.....	16
3.1.4 Restriktionsverdau.....	16
3.1.5 Die Agarosegelelektrophorese.....	17
3.1.6 Die Polymerasekettenreaktion.....	17
3.1.7 Amplifikation der LTA-Region (Exon 1-3).....	19
3.1.8 Amplifikation der polymorphen TNFA-Promotorregion.....	19
3.1.9 Nachweis des NcoI RFLP im ersten Intron des LTA.....	20
3.1.10 Nachweis des AspHI RFLP im ersten Intron des LTA.....	20
3.1.11 Nachweis des -308 TNFA-Promotorpolymorphismus.....	20
3.2 Mikrosatelliten.....	20
3.2.1 Verwendete Mikrosatellitenmarker.....	21
3.2.2 Amplifikation von TNFa.....	21
3.2.3 Amplifikation von CD40L.....	22
3.2.4 Amplifikation von TNFc.....	22
3.2.5 Amplifikation von IL-1A.....	23
3.2.6 Auftrennung der Mikrosatelliten in einem denaturierenden Polyacrylamidgel.....	23

I. Inhaltsverzeichnis

3.2.6.1 Herstellung des Polyacrylamidgels.....	24
3.2.6.2 Vorbereiten der Mikrosatellitenproben.....	24
3.2.6.3 Auswertung des Gellaufes.....	25
3.3 Statistische Auswertung.....	25
4. Ergebnisse.....	26
4.1 Kriterien der Markerauswahl.....	26
4.2 NcoI-RFLP im ersten Intron des LT α -Gens.....	27
4.3 AspHI-RFLP im ersten Intron des LT α -Gens.....	29
4.4. -308 Promotorpolymorphismus des TNF α -Gens.....	30
4.5 Mikrosatelliten.....	32
4.5.1 Der Mikrosatellit TNFc.....	33
4.5.2 Der Mikrosatellit CD40L.....	35
4.5.3 Der Mikrosatellit IL-1A.....	37
4.5.4 Der Mikrosatellit TNFa.....	39
5. Diskussion.....	41
5.1 TNF: Pathomechanismen und neue Therapieansätze.....	41
5.2 Der TNF-Locus , ein unabhängiges Suszeptibilitätsgen bei der RA?.....	42
5.3 Der CD40-Ligand, Fehlermöglichkeiten bei der Zuordnung von Mikrosatelliten- allelen.....	44
5.4 Der CD40-Ligand, seine Bedeutung bei Immunreaktionen und Hinweise auf eine Beteiligung bei der RA.....	44
5.5 Interleukin-1, weiteres herausragendes Zytokin bei der RA.....	46
6. Zusammenfassung.....	48
7. Literaturverzeichnis.....	49
III. Anhang.....	55

II. Abkürzungsverzeichnis

6-Fam	6-Carboxyfluorescein
A	Adenin
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
bidest.	Bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
CD	Cluster of Differentiation
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENA	Epithelial Neutrophil Activating Protein
FGF	Fibroblast Growth Factor
G	Guanin
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
Gro- α	Growth Related Gene Product alpha
h	Hora
HEX	6-Carboxy-Hexachlorofluorescein
HLA	Human Leucocyte Antigen (Hauptleukozytenantigene)
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IDDM	Insulin Dependent Diabetes mellitus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1Ra	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
JRA	Juvenile rheumatoide Arthritis
kb	Kilobasenpaar(e)
LE	Lupus erythematodes
LT	Lymphotoxin
LIF	Leukaemia Inhibitor Factor
LTA	LT α -Gen
M	Molar
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metallo-Proteinasen
MMTV	Mammatumovirus
ml	Milliliter
mRNS	Messenger Ribonukleinsäure
NO	Nitrogen Oxide
ng	Nanogramm

II. Abkürzungsverzeichnis

nm	Nanometer
nt	Nukleotid(e)
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBMC	Periphere Blutmonozyten
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGA	Prostaglandin
PHA	Phythaemagglutinin
RA	Rheumatoide Arthritis
RANTES	Regulated Upon Activation Normal T-Cell Expressed And Secreted
RFLP	Restriktionslängenpolymorphismus
ROX	6-Carboxyrhodamin
Rpm	Rounds per minute
s	Sekunde
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sTNFR	Soluble Tumor Necrosis Factor
T	Thymin
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethylrhodamin
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TGF β	Transforming Growth Factor beta
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFA	TNF α -Gen
TNFB	TNF β - (LT α -) Gen
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VNTR	Variable Number Of Tandem Repeats
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

1. Einleitung

1.1 Die Rheumatoide Arthritis

Die Stütz- und Bewegungsorgane des Menschen bestimmen die menschliche Haltung, Form und Fortbewegung. Ihre einwandfreie und vor allem schmerzfreie Funktionserfüllung haben großen Anteil an unserer Lebensqualität, Leistungsfähigkeit und Selbstverständnis. Eine Krankheit, die diese Eigenschaften beträchtlich einzuschränken vermag, ist die Rheumatoide Arthritis (RA).

Hierbei handelt es sich, um eine chronisch proliferative zum Teil systemische Entzündungsreaktion des Körpers mit hauptsächlichlicher Gelenkbeteiligung. Sie hat eine weltweite Prävalenz von ca. 1-2% und betrifft zu 2/3 das weibliche Geschlecht. Ihr Häufigkeitsgipfel liegt im 4. Lebensjahrzehnt. Zur ihren Merkmalen zählt die chronische Synovitis mit konsekutiver Hyperplasie der Gelenkschleimhaut, die zu Gelenkreizungen und schließlich zu Knorpel- und Knochendestruktion führt. Extraartikuläre Beteiligungen können, in Form chronischer Anämie, Rheumaknoten, Herz-, Lungen-, Augen- und Gefäßbeteiligung etc. vorhanden sein. Des Weiteren existieren noch eine Vielzahl von Sonderformen beispielhaft seien das Felty-Syndrom und das Still-Syndrom besonders schwere Verlaufsformen des Erwachsenen- beziehungsweise Kindesalters erwähnt. Das Vorkommen autoreaktiver T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Monozyten, Phagozyten etc., sowie von Rheumafaktoren (Autoantikörper gegen das F_c-Fragment des IgG- Antikörpers) charakterisieren sie als Autoimmunkrankheit. Über Ihre Ätiologie ist bislang zahlreich spekuliert worden, sie liegt aber noch immer im Dunkeln. Es wird davon ausgegangen, dass sowohl Umwelt als auch genetische Faktoren bei der Entstehung bzw. Prädisposition eine Rolle spielen. Ihre familiäre Häufigkeit, eine 33fach höhere Wahrscheinlichkeit unter eineiigen Zwillingen, dass auch der bislang gesunde Zwilling erkrankt, weisen auf die Relevanz genetischer Merkmale hin. Trotz allem zeigen die Zwillingstudien auch die Bedeutung von Umweltfaktoren auf und mikrobielle Erreger erscheinen als Auslöser eine plausible Erklärung. Schätzungen zufolge soll sich der genetische Anteil auf 12-50% belaufen (1, 2).

1.2 Immunabwehr und Autoimmunität

Der Mensch ist in seiner Umwelt einer Unzahl von feindlichen Organismen ausgesetzt, trotzdem erkrankt er vergleichsweise selten. Im Laufe der Evolution hat der Mensch eine Reihe von Mechanismen entwickelt, um sich vor diesen Erregern zu schützen. Zum Einem die unspezifische Immunabwehr. Werden Zellen durch Viren, Bakterien oder andere Pathogene angegriffen oder zerstört, setzen sie Substanzen frei, die die Durchblutung des geschädigten Gewebes erhöhen, die Gefäßwände für Plasmabestandteile durchlässiger machen und die Einwanderung immunkompetenter Zellen ermöglichen. Zu den Bedeutendsten der unspezifischen Abwehr zählen die Monozyten, Granulozyten und Makrophagen, die körperfremdes Material phagozytieren und eventuell sofort unschädlich machen können. Des Weiteren sind sie stark sekretorisch aktiv und können dadurch weitere Immunzellen aktivieren. Überlebt der Erreger den ersten Angriff der angeborenen Abwehr und verbreitet sich im Körper werden Teile seiner Struktur von den befallenen Zellen aufbereitet und den spezifischen T_H-Lymphozyten oder CD8 T-Lymphozyten präsentiert. Erstere aktivieren über Botenstoffe die antigen-

präsentierenden Makrophagen, die nun imstande sind die intrazellulären Erreger abzutöten, Letztere zerstören die befallenen Zellen direkt und dämmen somit die weitere Ausbreitung der Infektion ein. Lösliche im Blut verteilende Antigene werden von den B-Lymphozyten erkannt. Ihre auf der Zellmembran gebundenen Antikörper binden die Antigene und bewirken die intrazelluläre Aufnahme, wo deren Strukturen ebenfalls weiterverarbeitet und den T_H-Lymphozyten präsentiert werden, die über Botenstoffe die Antikörpersekretion auslösen. Eine der schwierigsten Aufgaben des Immunsystems ist es zwischen fremden und körpereigenen Molekülen zu unterscheiden. Da das Immunsystem in der Lage sein muß zahlreiche verschiedene Strukturen auf feindlichen Organismen zu erkennen, ist es wahrscheinlich, daß bei der Entwicklung der vielen spezifischen Abwehrzellen B- und T-Lymphozyten entstehen, die auch auf körpereigene Strukturen reagieren können. Diese werden während ihrer Entwicklung im Knochenmark oder Thymus durch klonale Deletion vernichtet. Dies erfolgt meist nicht immer hundertprozentig, trotzdem erkranken nur wenige Menschen an Autoimmunerkrankungen. Das liegt wahrscheinlich daran, dass für diese Zellen entweder die zur Stimulation erforderlichen T_H-Zellen fehlen und/oder durch T-Suppressorzellen unterdrückt werden. Einige Theorien, wie es trotzdem zu Autoimmunkrankheiten kommen könnte, seien nachfolgend erwähnt:

1.Hormonelle Faktoren:

Viele Autoimmunkrankheiten sind bei Frauen häufiger als bei Männern. Eine mögliche Erklärung hierfür mag sein, dass das weibliche Hormon Östrogen die T-Suppressorzellfunktion vermindert, wohingegen das männliche Testosteron deren Funktion steigert.

2.Molekulare Mimikry:

Manche Krankheitserreger versuchen einem Angriff durch das Immunsystem zu entgehen, indem sie menschliche Oberflächenmoleküle nachahmen. Mindestens zwei Prozesse bei denen es im Rahmen molekularer Mimikry zu Autoimmunreaktionen kommen kann sind denkbar. Erstens, daß nachgeahmte Molekül entspricht nicht vollkommen genug dem körpereigenem und es werden Antikörper gegen die divergierenden Oberflächen gebildet, aber auch gegen Oberflächen, die sowohl beim Menschen als auch beim Erreger vorkommen. Zweitens die Molekularen-Mimikry-Moleküle treten lokal in so hohen Konzentrationen auf, daß die Unterdrückung durch die Suppressorzellen nicht mehr greift.

3.Gesteigerte HLA-Expression:

Gelangt ein Erreger in den menschlichen Körper werden Teile seiner Struktur vermehrt von MHC-Molekülen präsentiert. Gelingt es nun dem Erreger über einen längeren Zeitraum zu persistieren, kann dies zur Folge haben, dass es zur einer verstärkten MHC (HLA)-Expression kommt, deren starker Aktivierungsreiz zu einer überschüssenden Immunreaktion führt, die die natürliche Toleranz durchbricht.

4.Polyklonale Stimulation:

Bestimmte Erreger besitzen Eigenschaften, die die spezifische Immunabwehr unabhängig von der Aktivierung durch T_H-Zellen polyklonal, dass heißt Zellen unterschiedlicher Antigenspezifität, aktivieren. Beispiele hierfür sind das Lipopolysacharid aus der Zellwand gramnegativer Bakterien für B-Lymphozyten und das Epstein-Barr-Virus, des Weiteren für T-Lymphozyten hohe Konzentrationen von IL-2 und IFN γ . Ein anderer Weg der polyklonalen Aktivierung, ist der über Superantigene. Superantigene sind Proteine, die in der Lage sind die V β Kette des T-Zell-Rezeptors mit der Proteinkette der MHC-Moleküle der Klasse II zu verbinden, was eine Aktivierung der T-Zelle ohne Beteiligung der antigenbindenden Strukturen zur Folge hat. Die Bindungsfähigkeit des Superantigens ist spezifisch für die jeweilige V β -Kette, so dass es genau genommen nicht zur einer polyklonalen, sondern oligoklonalen Akti-

vierung kommt. Auf diese Weise können Zellen aktiviert werden, die normalerweise supprimiert würden oder für die keine T_H-Zellen vorhanden sind. Superantigene sind bekannt von z.B. Staph. aureus, Mycoplasma arthritis und Retroviren.

5. Aufdeckung normal unsichtbarer Strukturen

Kommt es durch Infektionen, UV-Licht oder andere aggressive Umwelteinflüsse zur Freisetzung von antigenen Strukturen, beispielsweise Zellkernmolekülen, mit denen das Immunsystem noch nie in Kontakt war und folglich auch keine Toleranz entwickelt hat, kann es zur Immunsystemstimulation kommen.

1.3 Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)

Der Major Histocompatibility Complex (MHC) ist wesentlich an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beteiligt, so auch an der RA und soll deshalb an dieser Stelle genauer beschrieben werden.

Entdeckt wurde er in Rahmen von Untersuchungen, die die Ursache von Gewebetransplantationsunverträglichkeiten erklären sollten. Daher auch seine Bezeichnung. Der MHC beim Menschen befindet sich auf dem kurzem Arm des Chromosoms 6 und umfaßt eine Länge von 2–3 Centimorgan. Insgesamt enthält er über 100 Gene, die grob in drei Klassen unterteilt werden. Gene der Regionen MHC I/II kodieren für Glykoproteine, die an der Zelloberfläche exprimiert werden und T-Lymphozyten Antigene präsentieren. Unter MHC III wird eine Ansammlung von Genen zusammengefaßt, die unter anderem für die Tumornekrosefaktoren α und β (neuere Bezeichnung Lymphotoxin α), sowie Komplementfaktoren kodieren. MHC I/II-Moleküle des Menschen werden als Hauptleukozytenantigene (HLA) bezeichnet.

Die MHC-Moleküle der Klasse I bestehen aus zwei verschiedenen Polypeptidketten. Einer im MHC kodierten α -Kette und einer nicht MHC kodierten β -Kette. Die α -Kette besitzt drei extrazelluläre Domänen, wobei α_1 und α_2 miteinander interagieren und eine antigenpräsentierende Furche bilden. Die MHC-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert, präsentieren in der Regel Antigene, die in den Kern oder das Zytosol aufgenommen wurden und aktivieren zytotoxische CD8 positive T-Lymphozyten.

Die MHC-II-Moleküle bestehen aus einer α - und einer β -Kette mit jeweils zwei extrazellulären Domänen. Die antigenbindende Struktur wird aus der α_1 und der β_1 Domäne gebildet und formt eine Furche, die im Vergleich zu den Klasse-I-Molekülen stärker geöffnet ist, was es ihr unter anderem ermöglicht längere Peptidketten zu binden. Exprimiert werden sie vor allem von B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und epithelialen Zellen des Thymus. Sie präsentieren in der Regel CD4 positiven T-Lymphozyten Antigene aus Endosomen der Zelle.

Das Immunsystem des Menschen muß auf eine Vielzahl möglicher Pathogene reagieren können. Um diese Forderung zu erfüllen, besitzt er für jede der MHC-Klassen mehrere verschiedene Genorte auf einem Chromosom, die gleichzeitig auf den Zellen exprimiert werden. Für die meisten dieser Genorte gibt bis zu über 100 verschiedene Allele, z.B. für den HLA-DR β -Locus 122, insgesamt so viele wie an keinem anderem bisher bekannten Genort. Da der Mensch in der Regel heterozygot an diesen Loci ist und die Genprodukte für die α - und β -Domänen auf den zwei Chromosomen miteinander kombiniert werden können, erhöht sich das Spektrum der MHC-Moleküle eines Individuums nochmals. Außerdem kann jede antigenbindende Struktur viele verschiedene Peptide präsentieren.

An allen Autoimmunreaktionen sind T-Lymphozyten beteiligt und ihre Fähigkeit auf ein Antigen zu reagieren hängt von den vorhandenen MHC-Komplexen ab. Zwei grundsätzliche

Überlegungen über die Beteiligung des MHC, die sich aber nicht zwingend gegenseitig ausschließen, werden erwogen. Erstens die Bedeutung der Qualität bestimmter MHC-Moleküle körpereigene Peptide zu präsentieren, zweitens das versäumte Absterben der T-Lymphozyten während der Thymusdifferenzierung, die mit dem MHC assoziierte Autopeptide erkennen können, die mangels bisherigen Auftretens aber noch nicht dargestellt wurden.

Fest steht, dass bisher bereits für mehrere Autoimmunkrankheiten HLA-Assoziationen bekannt sind.

1.4 HLA und RA

Erste Hinweise auf das Vorhandensein von sogenannten Suszeptibilitätsgenen wurden Mitte der achtziger Jahre entdeckt. Stastny et al. (3) berichteten 1976 von einer Assoziation der Rheumatoiden Arthritis mit dem HLA-DR4-Locus. Einerseits bekräftigten anschließende Studien seine Ergebnisse, andererseits zeigten sich auch Ungereimtheiten als in Populationsstudien andere HLA-DR-Loci (HLA-DR1, HLA-DR10, HLA-DRw6) in Assoziation zur RA standen oder HLA-DR4 hier nicht mit RA, aber mit anderen Autoimmunkrankheiten wie den Pemphigus vulgaris assoziiert schien. Eine Erklärung lieferte 1987 Gregersen et al. (4) mit der sogenannten „shared epitope“ Hypothese. Es fand sich, dass die gefundenen Allele alle für die Aminosäurefolgen QKRAA/QRRAA/RRRAA (shared epitope) in der dritten hypervariablen Region der β -Kette der MHC-Klasse-II-Moleküle kodieren, die die Aminosäurepositionen 70 bis 74 umfaßt und an der Antigenpräsentation gegenüber den T-Lymphozyten beteiligt sind (5-11). In der kaukasischen Bevölkerung exprimieren 80-90% der an RA Erkrankten die Allele HLA-DRB1*04 oder *01 (12-13), was die Bedeutung der T-Zellerkennung zu unterstreichen scheint. Trotzdem zeigten weitere Untersuchungen, dass die rheumatoide Ätiologie nicht so einfach zu erklären ist. McDaniel et al. (14) z.B. fanden bei 2/3 der von ihnen untersuchten Afro-Amerikanern kein für das „rheumatoide Epitop“ kodierendes Allel. Hinzu kommt, die Tatsache, dass es Personen gibt die trotz dieser genetischen Prädisposition nicht an RA erkranken. Diese Unstimmigkeiten und die verschiedenen klinischen beobachtbaren Sonderformen der RA führten zu den Schluß einer polygenen Beeinflussung der RA.

1.5 Zytokine

Eine wesentliche Beteiligung von Zytokinen am Krankheitsbild der RA gilt als unbestritten. Zytokine sind in der Regel kurzlebige Botenstoffe, die der Kommunikation der an Immun- und Entzündungsreaktionen beteiligten Zellen untereinander dienen. Außerdem beeinflussen sie die Hämatopoese. Sie lösen auf autokrinen und/oder parakrinen Weg vielfältige Wirkungen aus, die sich oft sogar überlappen. Viele verschiedene Zytokine konnten in den Gelenken von RA-Patienten nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zur zellarmen Synovialflüssigkeit des Gesunden ist die des RA-Patienten mit sehr vielen Zellen vor allem neutrophilen Granulozyten, aber auch Makrophagen und anderen angereichert. Chemokine, eine niedermolekulare Untergruppe der Zytokine, sind in der Lage diese Zellen aus der Zirkulation in die betroffenen Gelenkkompartimente anzulocken. Im Mausmodell konnte bei Unterdrückung äquivalenter Chemokine ein verzögerter Krankheitsbeginn bzw. ein vermindertes Beschwerdebild bei Kollageninduzierter Arthritis nachgewiesen werden (15). Ebenso wie die Synovialflüssigkeit ist auch die Synovialmembran selbst stark zellulär infiltriert. Hier finden sich vor allem aktivierte Makrophagen und T-Lymphozyten,

sowie aktivierte Fibroblasten, Plasmazellen und dendritische Zellen. In Gefäßnähe konnten sogar lymphfollikelähnliche Zellansammlungen beobachtet werden. Hauptschädigungsort ist die Grenze zwischen der stark proliferierten Synovialmembran genannt Pannus und dem Knorpel bzw. Knochen. Als Hauptmediatoren der Knorpelzerstörung und der Knochenresorption wurden Metalloproteinasen (MMP) wie Proteinase und Stromelysin ausgemacht, die aus den aktivierten Makrophagen und Fibroblasten stammen (16-21). Ihre Freisetzung steht hauptsächlich unter der Kontrolle der Zytokine TNF α und Interleukin 1 (22) und/oder direkter T-Zell Vermittlung (23). Auch die Synovialproliferation an sich steht unter Zytokinbeeinflussung. Zu den Wachstumsstimulatoren der Fibroblasten werden die Zytokine PDGF, FGF und TGF β gezählt. Andere wiederum sollen die Knochenneubildung verhindern und eine vermehrte Knochenresorption durch Osteoklastenaktivierung bewirken (13). Mehrere Zytokine lösten in Tierversuchen durch intraartikuläre Injektion Arthritiden aus. Transgene Mäuse für den humanen TNF α entwickelten eine rheumatoide Arthritis, die durch TNF α spezifische Antikörper wieder supprimiert werden konnte. Interessant ist, daß trotz generell verstärkter TNF α Expression vor allem die Gelenke empfindlich reagieren (24). Ein anderer wesentlicher pathogener Faktor zur Aufrechterhaltung der Gelenkentzündung ist die massive Neovaskularisierung in der Synovialis, zumal in Tierversuchen ein applizierter synthetischer Angiogeneseblocker eine Arthritis vermindern konnte (25, 26). Widersprüchliche Ergebnisse liegen zum Teil für Zytokine vor, denen man zuerst einen protektiven Effekt zugesprochen hatte. TGF β beispielsweise löste in Tierversuchen bei lokaler intraartikulärer Applizierung eine Arthritis aus. Wurde TGF β systemisch verabreicht, zeigte es entgegengesetzte Wirkungen (27-30). Weiterhin wurden für TGF β einerseits Monozyten anlockende Eigenschaften (31), andererseits jedoch die Hemmung der für die Gelenkschädigung so wichtigen MMP (32) und eine Steigerung der Produktion ihrer natürlichen Inhibitoren (TIMP) nachgewiesen.

1.5.1 Tiermodelle

Verschiedene Tiermodelle wurden bisher entwickelt um die Entzündungsprozesse bei der RA nachzuahmen. Hierunter fallen die antigeninduzierte Arthritis bei der das Antigen wiederholt direkt in die Gelenke der bereits immunisierten Mäuse injiziert wird. Ein anderes Modell ist die Kollagen-II-induzierte Arthritis bei der für die Entstehung einer Arthritis besonders empfindliche Mäuse mit einem fremden Kollagen II immunisiert werden und der weitere Entzündungsprozeß durch die Immunreaktion gegen das körpereigene Kollagen II aufrechterhalten wird. Ein drittes Modell ist die Induktion von Immunkomplexen durch passive Immunisierung und die Entwicklung von Entzündungsreaktionen durch direkte Injektion von Fremdkörpern aus Hefe und Bakterienbestandteilen. Keines dieser Modelle entspricht jedoch vollständig der menschlichen Arthritis.

In Synovialflüssigkeit bei RA nachgewiesene Zytokine

Proinflammatorische Zytokine	Produzent	Beschriebene Wirkungen
<u>G-CSF</u>	Monozyten, Fibroblasten	Neoangiogenese
<u>GM-CSF</u>	T-Zellen, Fibroblasten, Chondrozyten, Endothelzellen, Monozyten	Freisetzung TNF α , ICAM-1 Expression, Monozyten-, Makrophagenaktivierung, verstärkte MHC-Klasse-II-Molekül-Expression auf Synovialzellen, verstärkte Knochenresorption, Neoangiogenese
IFN α	Monozyten, Makrophagen	Verstärkte MHC-Expression, Aktivierung TH ₁ -Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Suppressor-T-Zell-Hemmung
IFN γ	T-Zellen, NK-Zellen	TNF α -, NO-Freisetzung, TH ₁ -Zell-Aktivierung, TH ₂ -Zell-Hemmung, Inhibierung der IL-10-, MMP-Freisetzung
<u>IL-1</u>	Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten, Granulozyten, glatte Muskelzellen, NK-Zellen, lymphatische Zellen	Freisetzung von TNF α , IL-6, IL-8, MMP 1+3, MCP-1, Expression von ICAM-1, E-Selektin, VCAM-1, Hemmung der Kollagensynthese
IL-12	T-Zellen	TNF α -, IFN γ -, IL-6-Ausschüttung
IL-15	Makrophagen	TNF α -, IFN γ -, GM-CSF-Ausschüttung, T-Zell-Anlockung, B-Zell-Stimulierung
IL-17	T-Zellen	TNF α -, IL-1 β -, IL-6-, MMP-, NO-Freisetzung
IL-18	Makrophagen, Chondrozyten, Osteoblasten	IL-6-, NO-, MMP-, GM-CSF-, IFN γ -Freisetzung, TGF β -, IL-1 β -Hemmung
IL-2	T-Zellen	T-Zell-Aktivierung, IFN γ -Ausschüttung
IL-3	T-Zellen	Osteoklastenbildung
IL-6	Monozyten, Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen	Osteoklastenaktivierung, Synovialzellproliferation, B-Zell-Stimulierung
IL-7	Stromazellen des Knochenmarks, des Thymus, der Milz	T-Zell-Stimulierung
LIF	Fibroblasten	Ausschüttung von TNF α , IL-1 β , IL-8, Akut Phase Proteine, Osteoporose, Proteoglykanresorption, Hemmung der Neoangiogenese
LT α (vormals TNF β)	T-Zellen, B-Zellen	MMP-Freisetzung, Fibroblasten-, Osteoblastenproliferation, Lymphozytenaktivierung
<u>M-CSF</u>	Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen	Makrophagenaktivierung
Oncostatin M	T-Zellen, Makrophagen	Freisetzung von MCP-1, MMP, TIMP, Erniedrigung von IL-8, RANTES, TNF α , IL-1 β
<u>TNFα</u>	Vorwiegend Monozyten, Makrophagen, sowie T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen	Freisetzung IL-1, IL-6, IL-8, IL-18, VEGF, MCP-1, E-Selektin, MMP-1, MMP-3, Gro α , MIP-1, ENA-78, PGE ₂ , Neoangiogenese

<i>Immunregulatorische Zytokine</i>	<i>Produzent</i>	<i>Beschriebene Wirkungen</i>
IFN β	Fibroblasten	Hemmung der TNF α -, IL-1 β -, IL-6-, IL-12-, IFN γ -, MMP-1-, TIMP-1-Freisetzung, Hemmung von T-Zellen, vermehrte IL-1Ra-Freisetzung
<u>IL-10</u>	T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Makrophagen	hemmt TNF α -, IL-1-, IL-6-, IL-8-, IL-12-, GM-CSF-, G-CSF-, IFN α -, MIP-1-Freisetzung, fördert sTNFR-, IL-1Ra-, TIMP-Freisetzung
<u>IL-11</u>	Fibroblasten	hemmt TNF α -, MMP 1+3-Freisetzung
IL-13	T-Zellen	hemmt TNF α -, IL-1 β -, IL-8-, MCP-1-, ENA-78-, PGE $_2$ -Freisetzung
IL-4 (nur sporadisch nachgewiesen)	T-Zellen	hemmt TNF α -, IL-1-, PGE $_2$ -Freisetzung
<u>TGFβ</u>	Viele Zellen	hemmt TNF α -, IL-1-, IFN γ -, MMP-Freisetzung, fördert IL-1Ra-, TIMP-Freisetzung; fördert Neoangiogenese, VEGF, Synoviazellproliferation, Neutrophile

<i>Chemokine</i>	<i>Produzent</i>	<i>Beschriebene Wirkungen</i>
ENA-78	Fibroblasten, Makrophagen	Neutrophilenanlockung, Neoangiogenese
Gro α	Fibroblasten, Chondrozyten, Neutrophile, Monozyten	Fibroblastenproliferation, Neutrophilenanlockung, Neoangiogenese
<u>IL-8</u>	Monozyten, Makrophagen, Granulozyten	Neutrophilenanlockung, Neoangiogenese
MCP-1	Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten	Monozytenanlockung
MIP-1	Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Neutrophile, Endothelzellen	Monozytenanlockung
<u>RANTES</u>	T-Zellen, Fibroblasten	Monozytenanlockung

<i>Wachstumsstimulierende Zytokine</i>	<i>Produzent</i>	<i>Beschriebene Wirkungen</i>
FGF	Fibroblasten	Synovialisfibroblastenproliferation, Neoangiogenese, ICAM-1-Expression
<u>PDGF</u>	Makrophagen, Endothelzellen, Thrombozyten	Synovialisfibroblastenproliferation, Neoangiogenese, ICAM-1-Expression
<u>VEGF</u>	Makrophagen	Neoangiogenese

Die unterstrichenen Zytokine wurden in deutlich erhöhten Konzentrationen nachgewiesen

Abkürzungen: ENA-78 (epithelial neutrophil activating protein 78), FGF (fibroblast growth factor), G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor), gro- α (growth related gene product alpha), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), IFN (interferon), IL (interleukin), IL-1Ra (interleukin-1 receptor antagonist), LIF (leukaemia inhibitor factor), LT (lymphotoxin), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), M-CSF (macrophage colony stimulating factor), MIP-1 (macrophage inflammatory protein-1), MMP (matrix metalloproteinase), NO (nitrogen oxide), PDGF (platelet derived growth factor), PGE $_2$ (prostaglandin E $_2$), RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted), sTNFR (soluble tumor necrosis factor receptor), TGF β (transforming growth factor beta), TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), VEGF (vascular endothelial growth factor).

1.6 Ziel der Arbeit

Viele Studien haben eine Assoziation von Allelen immunregulatorischer Gene mit der Rheumatoiden Arthritis (RA) nachgewiesen. Es wurden jedoch auch gegenteilige Ergebnisse publiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Suszeptibilitätsgene ausgewählt, von denen entweder auf Grund ihrer Lage im Genom und/oder ihrer angenommenen biologischen Funktion eine bedeutende Rolle an dem Pathomechanismus vermutet wird. Es wurden Genorte eingeschlossen, für die von Gomolka et al. Assoziationen publiziert worden waren. Ziel der Arbeit war es die verantwortlichen Allele zu identifizieren, um anschließend die krankmachende biologische Funktion zu untersuchen. Es wurden sowohl DNS-Marker als Einzelbasenaustausche (single nucleotide polymorphism, SNP) als auch Mikrosatellitenmarker ausgewählt, die aufgrund der großen Allelzahl und -frequenz informativer sein können. Die Mikrosatellitenmarker sollten als fluoreszenzmarkiertes Amplifikat auf einem Applied Biosystems 373 DNA Sequencer analysiert werden. Sieben Marker wurden für diese Studie ausgewählt. Sie liegen in Genen, deren Produkte entweder direkt (IL-1, TNF, LT α) oder indirekt (CD40L) Entzündungsreaktionen fördern.

2. Material

2.1 Patientenkollektiv und Kontrollen

Untersucht wurden 139 Patienten der Rheuma-Einheit der Medizinischen Poliklinik, Klinikum Innenstadt der Ludwigs-Maximilians-Universität München. Alle Patienten erfüllten die 1987 letztmals revidierten Klassifikationskriterien für RA der American Rheumatism Association (33) und waren zudem alle Rheumafaktor positiv. Der Altersdurchschnitt betrug (Stichtag 01.01.99) 59,3 Jahre, es handelte sich um 97 Frauen und 38 Männern, von 4 Patienten liegen mir keine Angaben über das Geschlecht vor.

Die Kontrollgruppen für die einzelnen Polymorphismen waren teilweise bereits für diese Loci typisiert worden. Sie umfaßten DNS von gesunden Individuen, die in an der LMU studieren oder arbeiten. Sie wurden zum Teil früheren Doktorarbeiten bzw. Publikationen am Institut für Humangenetik, Ludwigs-Maximilians-Universität München, zum Teil der Literatur entnommen. So für den LTA (TNFB) NcoI-RFLP aus der Dissertation von Dr. med. Gerald Messer (34), für den LTA (TNFB) AspHI-Polymorphismus aus einer früheren Untersuchung des Instituts, für den TNFA (-308) SNP aus der Publikation von Brinkmann et al. (35), für die Mikrosatelliten TNFa und IL-1A aus der Dissertation von Dr. rer. nat. Maria Dorothea Gommelka (36), für den CD40L-Mikrosatelliten aus eigener Untersuchung. Die Daten der Kontrollgruppe für den Mikrosatelliten TNFc wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. E. D. Albert, Labor für Immungenetik, Kinderpoliklinik der LMU zur Verfügung gestellt.

2.2 Geräte

Brutschränke	<ul style="list-style-type: none"> • Be 500, Memmert, Schwabach, Deutschland • Heraeus 6000
Elektrophoresekammer	<ul style="list-style-type: none"> • Horizon 11•14, Gibco BRL Life Technologies, Paisley, Scotland
Photoapparat	<ul style="list-style-type: none"> • Polaroid MP - 4 Land Camera, Polaroid, Cambridge, USA
Präzisionswaage	<ul style="list-style-type: none"> • Sartorius, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Sequencer	<ul style="list-style-type: none"> • Applied Biosystems 373 DNA Sequencer
Spannungsgeräte	<ul style="list-style-type: none"> • Hölzel Technik, Dorfen • Power Supply 2197, LKB Bromma • Power All, Serva Separation Technology
Spektrophometer	<ul style="list-style-type: none"> • CE 1020, Cecil Instruments, Cambridge, USA
Thermocycler	<ul style="list-style-type: none"> • Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer, USA • Omn-E Hybaid, MWG - Biotech, Ebersberg • Techne Progene, Thermo-Dux, Wertheim
UV - Transluminator	<ul style="list-style-type: none"> • Bachhofer, Reutlingen, Deutschland
Vortex	<ul style="list-style-type: none"> • Vortex-Genie 2, Scientific Industries, USA

Wasserbäder	<ul style="list-style-type: none"> • GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel • Gyrotory Water bath shaker Model, New Brunswick Scientific, Edison, USA
Zentrifugen	<ul style="list-style-type: none"> • MGW Lauda C20, Lauda GmbH, Germany • Megafuge 10, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland • Megafuge 10R, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland • Mikrozentrifugen, Bachofer, Reutlingen, Deutschland

2.3 Chemikalien

Acrylamid extra pure	<ul style="list-style-type: none"> • Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
Aqua ad injectabilia	<ul style="list-style-type: none"> • Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland
Agarose	<ul style="list-style-type: none"> • Biozym Agarose, Biozym, Olgendorf • NuSieve Agarose, FMC, Rockland, USA
Alconox	<ul style="list-style-type: none"> • Alconox Inc New York, USA
APS	<ul style="list-style-type: none"> • Kodak Eastman Chemical Company New Haven, USA
Bindesilan	<ul style="list-style-type: none"> • Pharmacia Biotech GmbH, Erlangen, Deutschland
Borsäure	<ul style="list-style-type: none"> • Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	<ul style="list-style-type: none"> • Sigma, St. Louis, USA
Chloroform	<ul style="list-style-type: none"> • Riedel deHaën AG, Seelze, Deutschland
Dinatriumhydrogensulfat	<ul style="list-style-type: none"> • E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol	<ul style="list-style-type: none"> • Sigma, St. Louis, USA
Dextransulphat	<ul style="list-style-type: none"> • Sigma, St. Louis, USA
dNTP	<ul style="list-style-type: none"> • Promega Cooperations, Madison, USA
EDTA	<ul style="list-style-type: none"> • E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Harnstoff	<ul style="list-style-type: none"> • E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	<ul style="list-style-type: none"> • E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	<ul style="list-style-type: none"> • Sigma, St. Louis, USA
Ficoll	<ul style="list-style-type: none"> • Sigma, St. Louis, USA
Formamid	<ul style="list-style-type: none"> • Sigma, St. Louis, USA
Isopropanol	<ul style="list-style-type: none"> • E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	<ul style="list-style-type: none"> • E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat	<ul style="list-style-type: none"> • E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	<ul style="list-style-type: none"> • E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland • AGS Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natriumchlorid	<ul style="list-style-type: none"> • E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	<ul style="list-style-type: none"> • E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Orange G	<ul style="list-style-type: none"> • Sigma, St. Louis, USA
Phenol	<ul style="list-style-type: none"> • Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
Salzsäure	<ul style="list-style-type: none"> • E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
SDS	<ul style="list-style-type: none"> • Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

TEMED	• E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Tris	• ICN Biochemicals Inc., Aurora, USA
Xylen Cyanol FF	• Serva, Heidelberg, Deutschland

Verwendete Lösungen:

<u>1x Laufpuffer für Agarosegele:</u>	200 ml 10x TBE-Puffer 1800 ml deionisiertes Wasser 30 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 µg/µl)
<u>1 M Tris/HCl:</u>	60,57 g Tris reinst. mit bidestillierten Wasser auf 0,5 l aufgefüllt
<u>5 M NaCl:</u>	292,2 g NaCl mit bidestillierten Wasser auf 1 l aufgefüllt
<u>20% SDS:</u> (pH 7,2)	200 g SDS 800 ml bidestilliertes Wasser
<u>10xTBE - Puffer:</u>	90 mM Tris 90 mM Borat 20 mM EDTA
<u>5xAuftragspuffer:</u>	10 mM Tris/HCl pH 7,5 2 mM EDTA 20% Ficoll Bromphenolblau, Xylen Cyanol FF oder Orange G
<u>Molekulargewichtsstandard:</u> (200 µg/10 µl)	15 µl Molekulargewichtsstandard-Stammlösung (Gibco, 1 µg/µl) 200µl 6x Auftragspuffer 535 µl bidestilliertes Wasser
<u>10x PCR - Puffer:</u> (Perkin Elmer)	500 mM KCl 100 mM Tris/HCl, pH 8,3 0,1% (v/v) Gelatine
<u>10x Restriktionspuffer:</u> (NEBuffer 4)	500 mM K-Acetat 200 mM Tris-Acetat 100 mM Mg-Acetat 10 mM Dithiothreitol pH 7,9
<u>10x Restriktionspuffer:</u>	100 mM Tris/HCl pH 7,4 200 mM KCl 80 mM MgCl 100 mM 2-Mercaptoethanol
<u>10x Restriktionspuffer:</u> (Puffer H, Boehringer)	50 mM Tris/HCl 10 mM MgCl 100 mM NaCl 1 mM Dithioerythritol pH 7,5
<u>Erythrozyten-Lyse-Puffer:</u>	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 1 mM EDTA bidestilliertes Wasser
<u>Kernlysepuffer:</u>	10 mM Tris/HCl pH 8,0 400 mM NaCl

10x dNTP-Lösung:

10 mM EDTA pH 8,0
 bidestilliertes Wasser
 2 mM dATP
 2 mM dCTP
 2 mM dTTP
 2 mM dGTP

2.4 Enzyme**2.4.1 Restriktionsenzyme:**

NcoI (10 U/μl)

New England Biolabs, New England, USA

AspHI (10 U/μl)

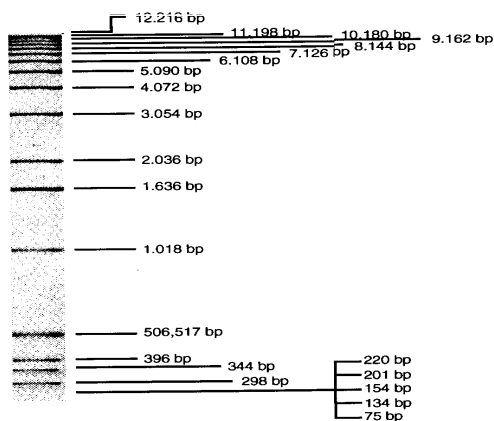
Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim,
Deutschland

BsiHKA I (10.000 U/ml)

New England Biolabs, New England, USA

2.4.2 weitere verwendete Enzyme:Ampli Taq Gold
Proteinase K > 30 U/mgPerkin Elmer, USA
Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Deutschland

Taq-DNS-Polymerase

AGS Angewandte Gentechnologie Systeme
GmbH, Heidelberg, Deutschland**2.5 Molekulargrößenstandard**

2.6 Oligonukleotide

2.6.1 Faustregel zur Bestimmung der Anlagerungstemperatur (nach Wallace et al. 1979)

Die Anlagerungstemperatur für einen Primer berechnet sich nach folgender Grundregel:

$$[m \times 2^{\circ}\text{C} + n \times 4^{\circ}\text{C}] - 5^{\circ}\text{C}$$

m: Anzahl der dATP und der dTTP

n: Anzahl der dCTP und der dGTP

Die Anlagerungstemperatur entspricht maximal der niedrigeren der für beide Primer berechneten und kann je nach verwendetem Primerpaar bzw. je nach verwendetem Thermocycler schwanken.

2.6.2 Primer für den Nachweis des TNFA-Promotorpolymorphismus (-308)

<u>Sequenz 5' -> 3':</u>	TNFA 5':	AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT
	Länge: 23 nt	Anlagerungstemperatur: 63°C
	TNFA 3':	TCCTCCCTGCTCCGATTCCG
	Länge: 20 nt	Anlagerungstemperatur: 61°C

Durch den Mismatch (unterstrichen) wird in das Amplifikat des TNF-Allels mit G in Position -308 eine Nco-I-Schnittstelle eingeführt.

2.6.3 Primer für den Nachweis der LTA-Polymorphismen

<u>Sequenz 5' -> 3':</u>	TNFB 5':	CCGTGCTTCGTGCTTTGGACTA
	Länge: 22 nt	Anlagerungstemperatur: 63°C
	TNFB 3':	AGAGCTGGTGGGGACATGTCTG
	Länge: 22 nt	Anlagerungstemperatur: 61°C

2.6.4 Primer für die Amplifikation der Mikrosatelliten

Mikrosatellit TNFa

<u>Sequenz 5'->3'</u> :	IR4	CTCTCTCCCCTGCAACACACA
	Länge: 21 nt	Anlagerungstemperatur: 66°C
	Markierung : Hex	
	IR2	CCTCTAGATTTTCATCCAGCCAC
	Länge: 22 nt	Anlagerungstemperatur: 66°C

Mikrosatellit IL-1A

<u>Sequenz 5'->3'</u> :	IL1.5:	CCTGCCTAGTGAGTGTGGAAG
	Länge: 21 nt	Anlagerungstemperatur: 66°C
	Markierung: 6-Fam	
	IL1.3:	GTGTTGATGTAGATTGTGTGTGC
	Länge: 23 nt	Anlagerungstemperatur: 66°C

Mikrosatellit CD40L

<u>Sequenz 5'->3'</u> :	CD40L5:	CTCTTCCCTCCCCCAGTCTC
	Länge: 20 nt	Anlagerungstemperatur: 66°C
	Markierung: 6-Fam	
	CD40L3	AAGAAGAGAACTGACTAGCAACG
	Länge: 23 nt	Anlagerungstemperatur: 66°C

Mikrosatellit TNFc

<u>Sequenz 5'->3'</u> :	IR6:	GTTTCTCTGACTGCATCTTGTC
	Länge: 23 nt	Anlagerungstemperatur: 68°C
	Markierung: TAMRA	
	IR7:	TCATGGGGAGAACCTGCAGAG
	Länge: 21 nt	Anlagerungstemperatur: 66°C

3. Methoden

3.1 Molekulargenetische Methoden

3.1.1 Isolierung genomischer DNS aus Vollblut

Verwendet wurden 5-10 ml EDTA- oder Heparin-Blut, welches zumeist 1-2 Tage bei 4°C oder ca. 1 Woche bei -20°C aufbewahrt worden war. Durch Zentrifugation bei 3000 U/min (Megafuge 10 /Heraeus Sepatech) über einen Zeitraum von 10 Minuten wurden die Blutzellen vom Plasma getrennt. Im nächsten Arbeitsschritt wurde überstehendes Plasma vorsichtig von den in der Interphase liegenden Lymphozyten abpipettiert und verworfen. Als nächstes erfolgte die Auflösung der roten Blutkörperchen durch Zugabe von hypotonischen Puffer, deren Bestandteile durch wiederholtes zehnmütiges Zentrifugieren bei 3000 U/min von den Leukozyten getrennt wurden. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment nach und nach unter zwischenzeitlichen kräftigen Schütteln (Vortex) in 3 ml Kernlysepuffer resuspendiert und mit 100 µl SDS und 150 µl Proteinase K-Lösung versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Präzipitation von Nukleinsäuren erfolgt unter Verwendung von Ethanol oder Isopropanol. Durch Zugabe von 1 ml 5 M NaCl-Lösung und kräftigem Mischen wurde der Hauptteil der Proteinfragmente gefällt und bei 4°C 10 Minuten mit 3000 U/min zentrifugiert. Der die Nukleinsäuren enthaltende Überstand wurde daraufhin sauber abgenommen und die DNS unter leichten Schwenken mit dem doppelten Volumen an 100% Ethanol oder 0,6-fachen Volumen an Isopropanol gefällt. Erneut erfolgte die zehnmütige Zentrifugation bei 3000 U/min. Die frisch präzipitierte DNS wurde nun 1-3mal mit 2 ml 70% Ethanol gewaschen und von den niedermolekularen Bestandteilen gereinigt, anschließend kurz getrocknet und in TE oder bidestillierten Wasser über 24 h auf einen Schüttler gelöst. Der hiermit erreichte Reinheitsgrad war in der Regel für eine einwandfreie PCR-Reaktion ausreichend, in seltenen Fällen mußte jedoch zusätzlich eine Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol vorgenommen werden.

3.1.2 Die „Phenolextraktion“

Um bei der Präparation von Nukleinsäuren einen höheren Reinheitsgrad zu erzielen, ist die Extraktion mit Phenol hilfreich.

Hierbei wird eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung im Verhältnis 25:24:1 zur Extraktion von festen und löslichen organischen Verbindungen verwendet, indem Phenol eine augenblickliche Denaturierung von Proteinen bewirkt, die in der Interphase ausfallen. Die „Reinigungslösung“ wird eins zu eins zur gelösten DNS zugegeben, kräftig gemischt und das Gemisch kurz (ca. 5 Minuten) zentrifugiert. Man erhält eine Auftrennung in eine hydrophobe Phase (Phenol/Chloroform) unten, eine Interphase mit den Verunreinigungen und eine wäss-

rige Phase mit den gelösten Nukleinsäuren. Letztere läßt sich vorsichtig abnehmen, ohne dabei Teile der Interphase mitzureißen. Anschließend wird eine Verunreinigung durch gelöstes Phenol durch zusätzliches Aufschütteln mit 1 Volumen Chloroform und erneutem Abzentrifugieren entfernt. Falls die DNS in H₂O vorliegt, wurde die Na-Konzentration durch Zugabe von NaCl auf 0,2 M eingestellt, die DNS mit Ethanol gefällt und zweimal mit 70% Ethanol gewaschen.

3.1.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und der Reinheitsgrad von Nukleinsäuren läßt sich photometrisch messen. Hierbei macht man sich zu Nutzen, dass DNS und Proteine ihre Absorptionsmaxima bei verschiedenen Wellenlängen von 260 nm beziehungsweise 280 nm haben. Aus dem Quotienten der Extinktionen (OD_{260}/OD_{280}) läßt sich ein Rückschluß auf den Reinheitsgrad der DNS ableiten (Wert für reine DNS 1,8)

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt nach dem Lambert–Beer' schen Gesetz:

$$c = OD \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \epsilon$$

Zur Konzentrationsbestimmung wurden mit TE zwei Verdünnungsreihen von 1:100 und 1:200 der gewonnenen DNS-Lösungen hergestellt und deren Extinktion gegen den Nullwert jeweils gemessen. Da eine optische Dichte von 1 bei 260 nm 50 ng/µl dsDNS entspricht, läßt sich hieraus die Konzentration der gemessenen Lösungen leicht berechnen.

$\epsilon =$	Extinktionskoeffizient für dsDNS (50 ng/µl)
$c =$	DNS-Konzentration
$OD_{260} =$	Extinktion bei 260 nm Wellenlänge

3.1.4 Restriktionsverdau

Doppelsträngige DNS läßt sich mit Hilfe bakterieller, sogenannten Restriktionsendonukleasen in einzelne Stücke schneiden. Diese Enzyme sind in der Lage das Phosphodiesterückgrat der DNS immer an den Stellen zu spalten, die eine für das verwendete Enzym spezifische - in der Regel vier bis acht Basenpaare lange - Erkennungssequenz enthalten. Bei diesen Sequenzen handelt es sich überwiegend um Palindrome. Je nachdem, ob die Schnittstelle genau in der Symmetrieachse liegt oder nicht, entstehen glatte oder überhängende, sogenannte klebrige Enden. Die Namen der verwendeten Enzyme leiten sich normalerweise aus dem ersten Buchstaben des Gattungsnamens sowie aus den ersten beiden Buchstaben des Namens der Spezies des Spenderbakteriums ab.

Definitionsgemäß spaltet 1 Einheit (U) Enzym 1 µg DNS innerhalb einer Stunde. Die Reaktionsbedingungen und die zu verwendenden Puffer ergeben sich aus den Lebensbedingungen der Bakterien aus denen die Enzyme gewonnen wurden und werden vom Hersteller angegeben. Fünf µl PCR-Amplifikat wurden mit 3 µl Reaktionspufferlösung vermischt und mit bidestilliertem Wasser auf ein Volumen von 30 µl aufgefüllt. Sodann wurde 1 U Enzym zugegeben. Um eine möglichst vollständige Restriktion zu gewährleisten, wurde zusätzlich zum Enzymüberschuß über mehrere Stunden im Wasserbad bei der optimalen Reaktionstemperatur inkubiert.

3.1.5 Die Agarosegelelektrophorese

Die verschiedenen Fragmente, in die ein Restriktionsenzym ein DNS-Fragment zerlegt, lassen sich leicht durch die Agarosegelelektrophorese auftrennen. Hierbei wandern die verschiedenen langen DNS-Fragmente durch die Gelporen des Agarosegels wie durch ein Sieb. Das Gel wird horizontal in einer Kammer mit einer Pufferlösung gelagert, an der ein Spannungsfeld angelegt wird. Die negativ geladenen Nukleinsäuren bewegen sich dabei zu der positiv geladenen Anode. Da kleinere Fragmente schneller durch die Poren wandern können als die größeren, kann mit Hilfe eines Größenstandards die Fragmentgröße bestimmt werden. Es muß dabei beachtet werden, dass je nach zu erwartender Fragmentgröße zu deren Auftrennung verschieden stark konzentrierte Agarosegele hergestellt werden müssen. Bei meinen Untersuchungen wurden 0,7% bis 2,5% Gele verwendet. Durch das im Laufpuffer enthaltene Ethidiumbromid, welches die Eigenschaft besitzt zwischen den Basen der DNS zu interkalieren und bei Bestrahlung unter UV-Licht (verwendete Wellenlänge 312 nm) orangefarben zu fluoreszieren, können die Fragmente sichtbar gemacht und zu Dokumentationszwecken fotografiert werden.

Für die gewünschte Gelkonzentration wurde die entsprechende Agarosemenge abgewogen, mit 1xTBE-Puffer auf das erforderliche Volumen aufgefüllt und im Mikrowellenherd aufgekocht, bis die Agarose vollständig geschmolzen war. Sodann wurde die Lösung im Eiswasserbad auf etwa 60°C abgekühlt und in einen Gelträger mit den enthaltenden Gelkammern möglichst luftblasenfrei gegossen. Während die Agarose zu erstarren begann, wurden die DNS-Proben vorbereitet, die aus 30 µl Reaktionsansatz und 6 µl farbigen Auftragspuffer hergestellt wurden. Zur Überprüfung der Amplifikation wurden 5 µl der PCR mit 6 µl Auftragspuffer und 10 µl bidestilliertem Wasser versetzt. Nach dem Entfernen der Gelkämme wurden die Proben in die Taschen pipettiert und bei einer Spannung von 80-100 V aufgetrennt.

3.1.6 Die Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) nach Saiki et al. ist eine Methode, mit der in vitro schnell bestimmte Ziel-DNS Sequenzen selektiv vermehrt werden können. Zu ihrer Durchführung wird doppelsträngige genomische DNS durch Erhitzen in ihre Einzelstränge zerlegt, an die dann spezifische meist 20 nt lange Oligonukleotide, sogenannte Primer, binden können,

die den interessierenden DNS-Abschnitt flankieren und die Reaktion starten lassen. Die zugeetzte DNS-Polymerase ist nun in der Lage, das 3' OH-Ende des Primers komplementär zur Matrize zu einem neuem Doppelstrang zu verlängern. Im nächsten Schritt wird die verdoppelte DNS durch Erhitzen wieder einzelsträngig gemacht und die Reaktion kann von neuem beginnen. Diese Zyklen lassen sich beliebig oft wiederholen, so dass in den ersten 30 Zyklen eine exponentiell ansteigende Vervielfältigung des zu untersuchenden DNS-Abschnittes resultiert. Voraussetzung für die Reaktion ist allerdings erstens, dass die Sequenz der Bindungsstellen der Primer für deren synthetische Herstellung bekannt ist, zweitens diese ausreichend spezifisch sind, was durch die Länge von circa 20 nt gewöhnlich erreicht wird. Die PCR erfolgt vollautomatisch mit Hilfe von Thermocyclern, die sich in Temperatur, Zeitdauer und Zyklusfrequenz programmieren lassen.

Die Abfolge der Reaktionen setzt sich wie folgt zusammen:

1. Denaturierung: Menschliche genomische DNS wird bei einer Temperatur von etwa 94-96°C denaturiert.
2. Primeranlagerung: Sie erfolgt gewöhnlich bei 58-62°C und ist von der im Reaktionsansatz gewählten MgCl₂-Konzentration abhängig. Die Wahl der Temperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur T_m der zu erwartenden Doppelhelix und läßt sich für die verwendeten Primer nach der im Abschnitt Material erwähnten Formel berechnen. Da die reale Anlagerungstemperatur maximal so hoch liegt wie die niedrigere der beiden berechneten bzw. meistens sogar etwas niedriger, sowie von Primerpaar zu Primerpaar, als auch von Thermocycler zu Thermocycler schwankt, müssen die optimalen Bedingungen für jede erstmals durchgeführte PCR neu etabliert werden.
3. DNS-Synthese: Sie erfolgt in der Regel bei etwa 72°C. Die Zeitdauer für die Synthese richtet sich dabei nach der Amplifikatlänge. Für 500 bp wird mit ca. 30 s gerechnet.

Um die Vervielfältigung der DNS bei solch hohen Temperaturen zu ermöglichen, ohne bei jedem neuem Zyklus von neuem DNS-Polymerase zugeben zu müssen, wird heute eine Polymerase verwendet, die zumeist aus dem hitzebeständigen Bakterium *Thermus aquaticus* (daher auch Taq-Polymerase) stammt und bis 94°C hitzebeständig ist.

Für einen Standardansatz werden 2 µl 10x Reaktionspuffer, 2 µl 10x dNTP, MgCl₂ (1 mM–1,75 mM), jeweils 1 µl der Oligonukleotide (50 ng/µl), Taq-Polymerase (0,8 U–1 U) gemischt und mit bidestilliertem Wasser auf 20 µl Volumen aufgefüllt. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis vollzogen, um ein vorzeitiges Starten der Reaktion zu verhindern. Von der isolierten DNS war zuvor eine Verdünnungslösung zu 50 ng/µl bzw. 100 ng/µl hergestellt worden. Um eventuelle Kontaminationen durch Fremd-DNS erkennen zu können, wurde bei jeder Amplifikation zusätzlich eine Kontrolle ohne DNS mitgeführt.

3.1.7 Amplifikation der LTA-Region (Exon 1-3)

PCR-Ansatz (20 μ l):

Taq-Polymerase-Puffer (10x)	2,0 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	0,8 μ l
dNTP (2 mM)	2,0 μ l
Primer TNF β 5' (50 ng/ μ l)	1,0 μ l
Primer TNF β 3' (50 ng/ μ l)	1,0 μ l
Taq-Polymerase (3 U/ μ l)	0,3 μ l
DNS (50 ng/ μ l)	2,0 μ l
H ₂ O bidest.	10,9 μ l

Zyklusschritt	T[°C]	Zeit [min]
Erste Denaturierung	94	5
Denaturieren	94	0,5
Primer-Anlagerung	62	0,5
Ketten-Verlängerung	72	0,7
Letzte Verlängerung	72	5

3.1.8 Amplifikation der TNFA-Promotorregion

PCR-Ansatz (20 μ l):

Taq-Polymerase-Puffer (10x)	2,0 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1,4 μ l
dNTP (2 mM)	2,0 μ l
Primer TNF α 5' (50 ng/ μ l)	1,0 μ l
Primer TNF α 3' (50 ng/ μ l)	1,0 μ l
Taq-Polymerase (4 U/ μ l)	0,2 μ l
DNS (50 ng/ μ l)	2,0 μ l
H ₂ O bidest.	10,4 μ l

Zyklusschritt	T[°C]	Zeit [min]
Erste Denaturierung	94	5
Denaturieren	94	1
Primer-Anlagerung	58	1
Ketten-Verlängerung	72	1
Letzte Verlängerung	72	10

3.1.9 Nachweis des NcoI RFLP im ersten Intron des LTA

Bei Verwendung der unter 2.6.3 angegebenen Primer und unter den bei 3.1.7 genannten Bedingungen ergab die PCR ein Amplifikat von 742 bp. Pro zu untersuchender Probe wurden 5 µl PCR-Produkt, 3 µl Puffer H, 1 U Restriktionsenzym NcoI mit bidestilliertem Wasser auf ein Volumen von 30 µl aufgefüllt und anschließend über 2-3 h im 37°C warmen Wasserbad verdaut. Im nächsten Arbeitsschritt wurde der Reaktionsansatz mit einem Dye versehen und auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen.

3.1.10 Nachweis des AspHI RFLP im ersten Intron des LTA

Je 5 µl PCR-Produkt wurden 3 µl Puffer H und 1 U Enzym AspHI mit bidestilliertem Wasser auf einen Reaktionsansatz von 30 µl aufgefüllt und über ca. 3 Stunden bei 37°C im Wasserbad verdaut. Da der Verdau anfangs trotz der relativ langen Reaktionszeit kein befriedigendes Ergebnis zeigte, wurde von mir anstatt des Puffers H ein selbst hergestellter Reaktionspuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,4, 200 mM KCl, 80 mM MgCl₂, 100 mM 2-Mercaptoethanol) verwendet, der ein besseres Ergebnis erbrachte. Der Reaktionsansatz mit dem verdauten PCR-Produkt wurde mit einem Dye versetzt und in die Taschen eines 1 %igen Agarosegels aufgetragen. Nach einer kurzen Einlaufzeit von ca. 10 min bei 80 Volt, wurde die DNS bei 100 Volt aufgetrennt.

3.1.11 Nachweis des -308 TNFA-Promotorpolymorphismus

Fünf µl des PCR-Produkts wurden mit 3 µl NeBuffer 4 und 1 U NcoI Enzym mit bidestilliertem Wasser auf ein Volumen von 30 µl aufgefüllt und bei 37°C ca. 3 Stunden im Wasserbad verdaut. Der Reaktionsansatz wurde so dann mit einem Dye versehen und auf ein 2,5 %iges Agarosegel aufgetragen.

3.2 Mikrosatelliten

Unter Mikrosatelliten-DNS versteht man kurze Folgen hochrepetitiver Einheiten von ein bis vier Basenpaaren. Sie sind über das gesamte menschliche Genom verteilt und weisen in der Regel eine Länge von unter 150 bp auf. Sie befinden sich meistens in nicht kodierenden Abschnitten des menschlichen Genoms, wurden aber in jüngster Zeit auch in kodierenden Sequenzen gefunden. Ihre Funktion ist bis heute unklar. In der Humangenetik werden sie für die Kopplungsanalyse eingesetzt und um Assoziationen zwischen Phänotypen und Genorten herzustellen. Krankheitsassoziierte Gene kann man durch Kosegregation mit gekoppelten gene-

tischen Markern identifizieren, die in den betroffenen Individuen gemeinsam mit diesen vererbt werden. Voraussetzung hierfür ist, dass die verwendeten Marker eng genug zusammenliegen, um eine Rekombination mit dem Krankheitslocus ausschließen zu können. Außerdem sollten die Marker möglichst polymorph sein, um eine Assoziation unter den erkrankten Individuen herstellen zu können. Mikrosatelliten erfüllen meist die oben genannten Bedingungen.

3.2.1 Verwendete Mikrosatellitenmarker

Bezeichnung	Länge des Amplifikats	Markierung
<i>TNFα</i>	80-120 bp	HEX (grün)
<i>CD40L</i>	110-142 bp	6-FAM (blau)
<i>TNFγ</i>	160-162 bp	TAMRA (gelb)
<i>IL-1A</i>	161-179 bp	6-FAM (blau)

3.2.2 Amplifikation von TNF α

PCR-Ansatz (20 μ l):

<i>Taq-Polymerase-Puffer (10x)</i>	2,0 μ l
<i>MgCl₂ (25 mM)</i>	1,0 μ l
<i>dNTP (2 mM)</i>	2,0 μ l
<i>Primer TNFα 5' (50 ng/μl)</i>	1,0 μ l
<i>Primer TNFα 3' (50 ng/μl)</i>	1,0 μ l
<i>Taq-Polymerase (3 U/μl)</i>	0,4 μ l
<i>DNS (50 ng/μl)</i>	2,0 μ l
<i>H₂O bidest.</i>	10,6 μ l

Zyklusschritt	T[°C]	Zeit[<i>min</i>]
<i>Erste Denaturierung</i>	94	5
<i>Denaturieren</i>	94	1
<i>Primer-Anlagerung</i>	58	0,5
<i>Kettenverlängerung</i>	72	0,5
<i>Letzte Verlängerung</i>	72	10

3.2.3 Amplifikation von CD40L

PCR-Ansatz (20 μ l):

Taq-Polymerase-Puffer (10x)	2,0 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1,4 μ l
dNTP (2 mM)	2,0 μ l
Primer CD40L 5' (50 ng/ μ l)	1,0 μ l
Primer CD40L 3' (50 ng/ μ l)	1,0 μ l
Taq-Polymerase (3 U/ μ l)	0,4 μ l
DNS (50 ng/ μ l)	2,0 μ l
H ₂ O bidest.	10,2 μ l

Zyklusschritt	T[°C]	Zeit[min]
Erste Denaturierung	94	5
Denaturieren	94	1
Primer-Anlagerung	61	0,5
Kettenverlängerung	72	0,5
Letzte Verlängerung	72	10

3.2.4 Amplifikation von TNFc

PCR-Ansatz (20 μ l):

Taq-Polymerase-Puffer (10x)	2,0 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	0,8 μ l
dNTP (2 mM)	2,0 μ l
Primer TNFc 5'(50 ng/ μ l)	1,0 μ l
Primer TNFc 3'(50 ng/ μ l)	1,0 μ l
Taq-Polymerase (3 U/ μ l)	0,4 μ l
DNS (50 ng/ μ l)	2,0 μ l
H ₂ O bidest.	10,8 μ l

Zyklusschritt	T[°C]	Zeit[min]
Erste Denaturierung	94	5
Denaturieren	94	1
Primer-Anlagerung	61	0,5
Kettenverlängerung	72	0,5
Letzte Verlängerung	72	10

3.2.5 Amplifikation von IL-1A

PCR-Ansatz (20 µl):

<i>Taq-Polymerase-Puffer (10x)</i>	<i>2,0 µl</i>
<i>MgCl₂ (25 mM)</i>	<i>0,9 µl</i>
<i>dNTP (2 mM)</i>	<i>2,0 µl</i>
<i>Primer IL-1A 5' (50 ng/µl)</i>	<i>1,0 µl</i>
<i>Primer IL-1A 3' (50 ng/µl)</i>	<i>1,0 µl</i>
<i>Taq-Polymerase (3 U/µl)</i>	<i>0,4 µl</i>
<i>DNS (50 ng/µl)</i>	<i>2,0 µl</i>
<i>H₂O bidest.</i>	<i>10,7 µl</i>

Zyklusschritt	T[°C]	Zeit[min]
<i>Erste Denaturierung</i>	<i>94</i>	<i>5</i>
<i>Denaturieren</i>	<i>94</i>	<i>1</i>
<i>Primer-Anlagerung</i>	<i>58</i>	<i>0,5</i>
<i>Kettenverlängerung</i>	<i>72</i>	<i>0,5</i>
<i>Letzte Verlängerung</i>	<i>72</i>	<i>10</i>

3.2.6 Auftrennung der Mikrosatelliten in einem denaturierenden Polyacrylamidgel

Denaturierende Gele dienen dazu einzelsträngige DNS-Moleküle der Größe nach aufzutrennen. Ursprünglich doppelsträngige DNS wird durch Erhitzen zusammen mit einem denaturierenden Agens (hier Formamid) denaturiert und um eine Wiederauslagerung komplementärer Stränge während der Elektrophorese zu verhindern auf ein denaturierendes Gel aufgetragen. Diese Gele enthalten stark polare Substanzen, die die Wasserstoff-Brückenbildung zwischen den Basen unterbinden.

3.2.6.1 Herstellung des Polyacrylamidgels

Zur Herstellung wurde folgende Polyacrylamidlösung verwendet:

20 g Harnstoff
15,5 ml H₂O bidest.
4,0 ml 10x TBE
6,0 ml PAA (29:1 Acrylamid:Bisacrylamid)
120 µl 10%iges APS
60 µl TEMED

Nach Einwiegen des Harnstoffes wird das Wasser, TBE und PAA zugegeben und auf einem Rührer ca. 5 min bei 40°C gerührt. Ist der Harnstoff vollkommen gelöst, wird das Gemisch über eine Membran filtriert und für 5-10 min entgast. APS und TEMED werden hinzugegeben und die Lösung sofort luftblasenfrei zwischen die zusammengesetzten Glasplatten gegossen. Die Qualität des hergestellten Gels kann nach dem Aushärten im Applied Biosystems 373 DNA Sequencer überprüft werden. Hierbei sollten nach dem Starten des Programms Plate check alle vier Farblinien in einer geraden horizontalen Linie und parallel zueinander verlaufen. Sollte dies nicht zutreffen, sind entweder die Glasplatten nicht genug gesäubert worden und an den Außenflächen nachzureinigen oder das Gel muß verworfen werden.

3.2.6.2 Vorbereiten der Mikrosatellitenproben

Alle vier zu untersuchenden Mikrosatellitenmarker konnten aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe bzw. ihrer unterschiedlichen Markierung gemeinsam untersucht werden. Hierzu wurden die verschiedenen Amplifikate, nach Abschätzen ihrer jeweiligen Konzentration in einem Agarosegel, zu einem DNS-Pool gemischt, der einer Endkonzentration von ca. 2 ng/µl pro Marker entsprach. Ein µl des DNS-Pools, 0,5 µl Größenstandard, 2,5 µl Formamid sowie 0,5 µl Dextran blue werden gemischt und bei 90°C für 5 min denaturiert und dann auf Eis gestellt. Hiervon wurden wiederum 2 µl in die Geltaschen pipettiert. Man läßt das Gel 10 min einlaufen und spült danach noch einmal die Taschen um das verbliebene Formamid zu entfernen. Anschließend erfolgt die Auswertung über den an einem Rechner angeschlossenen Applied Biosystems 373 Sequencer. Die Laufdauer ist abhängig von der Größe der Proben und der eingestellten Spannung und belief sich auf ca. 3 Stunden.

3.2.6.3 Auswertung des Gellaufes

Die Auswertung erfolgte mittels des Applied Biosystems 373 Sequencer sowie mit Hilfe der Computerprogramme GS Analysis, GS Collection, Genescan 672 und Genotyper (Vers.1.1.1). Während der Elektrophorese mißt ein Detektor im Sequencer die Fluoreszenzsignale der vorbeiwandernden DNS an einem bestimmten Punkt im Gel und gibt die Daten an den angeschlossenen Computer zur Auswertung weiter. Bei dem verwendeten Filter fluoreszieren 6-FAM in blau, HEX in grün, TAMRA in gelb und der ROX-markierte Größenstandard in rot. Aus den übermittelten Daten wie Farbe, Intensität und Zeitpunkt der Reflexion errechnet der Computer ein Gelbild auf dem die verschiedenen Mikrosatelliten und der Marker abgebildet werden. Dieses Bild kann nun mit Hilfe spezieller Software weiterbearbeitet werden. Die Größe der Amplifikate wird aus der relativen Lage ihres Intensitätsmaximums zum Längensstandard automatisch berechnet. Der hier verwendete Marker liefert Banden der Länge 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300 und 350 nt. Um eventuelle Fehlberechnungen zu vermeiden, muß jede Spur einzeln auf die korrekten Markerlängen überprüft werden und diese gegebenenfalls manuell korrigiert und die Berechnung wiederholt werden. Die endgültige Auswertung erfolgte mit dem Programm Genotyper. Dieses Programm berechnet nach Definition der für jeden Mikrosatelliten erwarteten Größe seine Fluoreszenzmaxima und führt die Allelbenennung durch.

3.3 Statistische Auswertung

Die gesammelten Ergebnisse wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 7.0 eingegeben. Diese Daten wurden unter Verwendung des Statistikprogramms SPSS 6.1 ausgewertet. Die Allelhäufigkeiten bei Patienten und Kontrollen wurden mit Hilfe des ChiQuadrat-Tests verglichen. Es wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ verwendet, wobei bei multiplen Tests dieses nach der Formel $\alpha_{\text{korr}} = \alpha/n$, wobei $n = \text{Anzahl der durchgeführten statistischen Tests}$, korrigiert wurde.

4. Ergebnisse

4.1 Kriterien der Markerauswahl

Die Gene für die beiden Tumornekrosefaktoren α und β (letzteres jetzt als LTA bezeichnet) liegen in der MHC-III-Region und mit ca. einem Centimorgan in enger Nachbarschaft zu den mit der Rheumatoiden Arthritis assoziierten HLA-DR-Allelen. Die hohen in Gelenkflüssigkeiten festgestellten Konzentrationen von vor allem TNF α und IL-1 und die führende Rolle, die ihnen in der Pathogenese von Entzündungsreaktionen zugeschrieben wird, verbunden mit Ergebnissen über Assoziationen von TNF-Polymorphismen beim Diabetes mellitus (37) gaben den Anlaß fünf Polymorphismen der TNF-Region und einen des Interleukin 1A Gens auf eine Assoziation zum Phänotyp der RA zu überprüfen.

Maria Gomolka (12, 36) stellte im Rahmen von Untersuchungen für ihre Dissertation Assoziationen mehrerer Mikrosatellitenloci zu RA, darunter TNF α und CD40L fest. Diese Ergebnisse sollten in dieser Studie in einem unabhängigen Patientenkollektiv von mir überprüft werden.

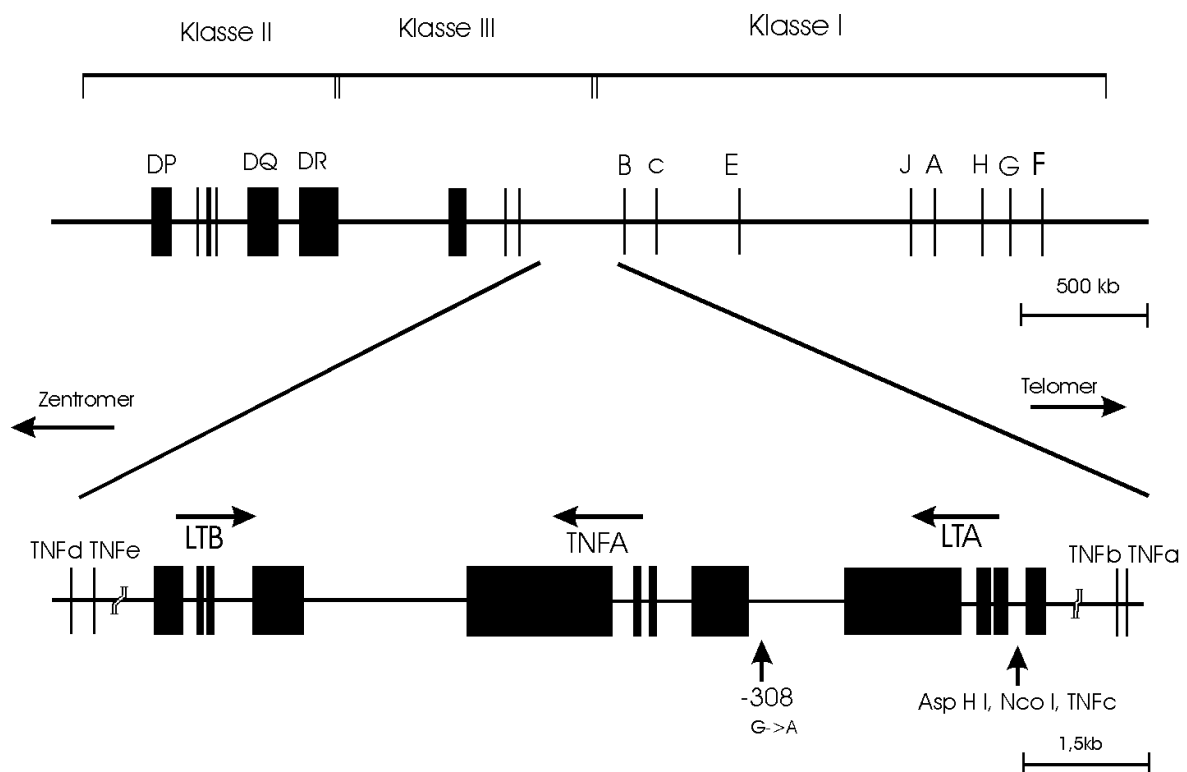


Abbildung 4.1 Übersicht über den HLA-Komplex (Chromosom 6)

Die Abbildung zeigt die MHC-Klassen I-III des Menschen auf dem Chromosom 6. HLA-DR, -DP, -DQ kodieren für die α - und β -Ketten der MHC-Klasse-II-Moleküle. HLA-A, HLA-B, HLA-C für die α -Kette der MHC-Klasse-I-Moleküle. Das Gen für die β -Kette liegt auf dem Chromosom 15 des Menschen. Die Gene HLA-E, -F, -G, -H, -J kodieren für Klasse-IB-Moleküle. Das ist eine Gruppe von Oberflächenmolekülen mit verschiedenen immunrelevanten Funktionen. Der TNF-Locus liegt innerhalb der MHC-Klasse-III und ist in dem Ausschnitt vergrößert dargestellt. Die schwarz ausgefüllten Kästen entsprechen den Exons, die freien Flächen dazwischen Introns. Des

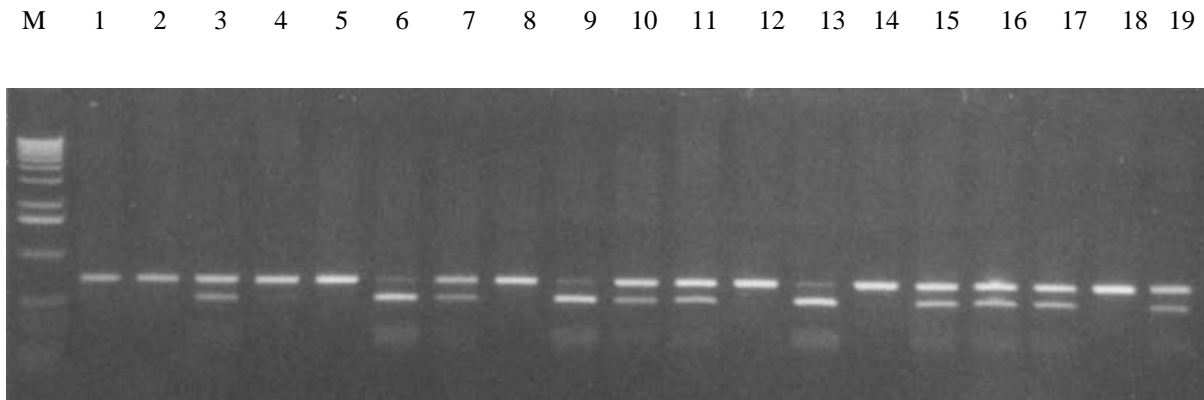


Abbildung 4.3: Typisierung des LTA NcoI-RFLP

Die Abbildung zeigt 19 der für den LTA NcoI-RFLP untersuchten Proben. Die obere Bande zeigt das 742-bp-Fragment, die untere das 546-bp-Fragment. Nr. 8 ist homozygot für das 742-bp-Fragment (TNFB*2), Nr. 9 homozygot für die Schnittstelle mit dem 546 bp und dem in der Abbildung nicht sichtbaren 196-bp-Fragment (TNFB*1), Nr. 10 ist heterozygot (TNFB*1/2).

Gemäß der Nomenklatur aus der Dissertationsarbeit von Dr. Messer werden homozygote Patienten für die Schnittstelle mit TNFB*1, homozygote ohne Schnittstelle TNFB*2 und heterozygote TNFB*1/2 bezeichnet.

Die Untersuchung aller Proben ergab folgende Verteilung:

N=139	TNFB*1	TNFB*2	TNFB*1/2
Gesamtzahl	17	62	60
Frauen	13	44	42
Männer	4	17	15
Geschlecht unbekannt		1	3

Der statistische Vergleich mittels Chi-Quadrat-Test mit der Kontrollgruppe ergab keine Assoziation eines der beiden möglichen Allele des LTA NcoI RFLP mit der Rheumatoiden Arthritis. Die Kontrollgruppe war bereits früher am Institut typisiert worden und wurde der Dissertation von Dr. Messer entnommen (34).

Allel	Häufigkeit und (Anzahl)		p-Wert
	Fälle	Kontrollen	
TNFB*1	0,34 (94)	0,33 (118)	0,82112
TNFB*2	0,66 (184)	0,67 (240)	

4.3 AspHI-RFLP im ersten Intron des LT α -Gens

Dieser RFLP befindet sich ebenfalls im ersten Intron des LT α -Gens, 120 bp stromabwärts des LTA NcoI Polymorphismus. Erstmals beschrieben wurde er von Ferencik et al. (39). Es wurde erneut das gleiche PCR-Amplifikat, wie beim Nachweis des NcoI Polymorphismus hergestellt. Das AspHI Restriktionsenzym erkennt folgende Sequenz G(A,T)GC(T,A)|C. Die genaue Lage der Schnittstelle ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Die Typisierung erfolgte nach dem unter 3.1.10 genannten Verfahren.

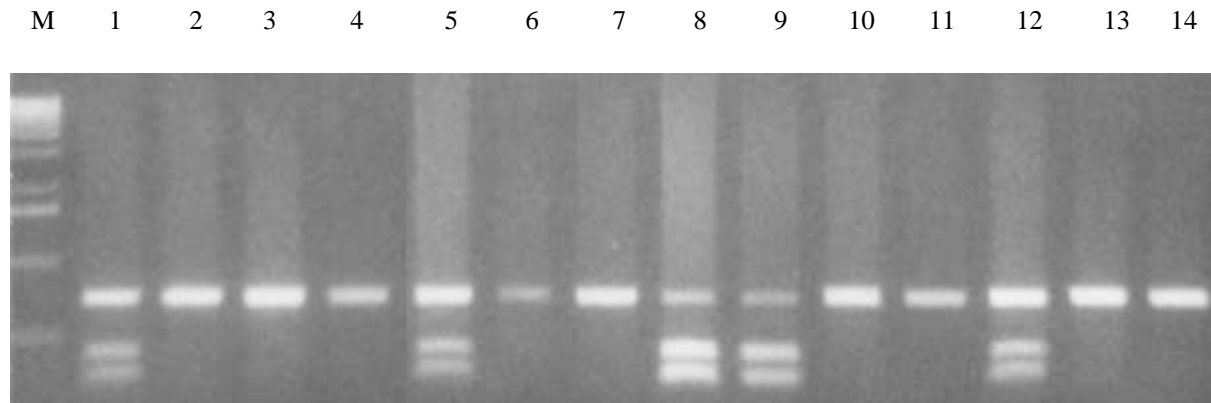


Abbildung 4.4: Typisierung des AspHI-RFLP im Intron 1 von TNFB/LTA

Abgebildet ist ein Agarosegel mit 14 Proben des auf den LTA AspHI untersuchten RFLP. Zu erkennen sind insgesamt drei Banden. Die obere Bande entspricht dem ungeschnittenen Amplifikat von 742 bp, die beiden unteren Banden kennzeichnen die vom Restriktionsenzym in die Fragmente von 426 bp und 316 bp geschnittene DNS. Die Nummer 8 repräsentiert die DNS eines für die Schnittstelle homozygoten Patienten, Nr. 12 ist heterozygot, Nr. 2 ist homozygot für das 742 bp Fragment, besitzt also auf keinem seiner beiden Chromosomen diese AspHI Schnittstelle.

Es war gezeigt worden, dass nur das Amplifikat des TNFB*2-Allels die AspHI-Schnittstelle aufweisen kann (40). In meinen Untersuchungen wurde dies bestätigt. Die Schnittstelle für AspHI korrelierte immer mit der Anwesenheit der TNFB*2-Sequenz.

Die Untersuchung aller Proben ergab folgendes Ergebnis:

N=139	AspHI +	AspHI -	AspHI +/-
Gesamtzahl	26	57	56
Frauen	17	40	41
Männer	8	16	13
Geschlecht unbekannt	1	1	2

AspHI + steht für alle für die Schnittstelle homozygoten Patienten, AspHI - für die homozygoten ohne Schnittstelle, AspHI +/- für die heterozygoten.

Die statistische Auswertung mittels Chi-Quadrat-Test zeigte keine Assoziation eines der beiden möglichen Allele dieses Polymorphismus zur RA. Die Kontrollgruppe stammt aus einer früheren Typisierung des Instituts.

Allel	<u>Häufigkeit und (Anzahl)</u>		p-Wert
	Fälle	Kontrollen	
AspHI +	0,39 (108)	0,34 (88)	0,283
AspHI -	0,61 (170)	0,66 (168)	

4.4 –308 Promotorpolymorphismus des TNF α -Gens

Es handelt sich hier um eine Punktmutation von G nach A an der Stelle –308 in der Promotorregion des TNF α -Gens. Wilson et al. (41) führte diesen Nachweis 1992 durch und entwickelte eine Methode der indirekten RFLP-Typisierung. Über den 5'-Primer wird in das Amplifikat des Allels –308 G eine Schnittstelle für das Enzym NcoI eingeführt. Ist die Punktmutation nicht vorhanden, entspricht die Sequenz bis auf eine Base (Position –313) der Erkennungssequenz des NcoI Restriktionsenzym C|CATGG. Wilson benützte zum Nachweis einen Primer, der an dieser Stelle zu einen Mismatch und im Amplifikat zu dem gewünschten Basenaustausch mit der NcoI Erkennungssequenz führt. Besteht eine Mutation von G nach A ist die Erkennungssequenz trotzdem unvollständig und das Enzym kann nicht schneiden.

-334 5'-
 GGAGGCAATAGGTTTTGAGGGCCATGGGGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTCTACACACAAATCAGTCAGTGGCCCAGAAGA
 CCCCCCTCGGAATCGGAGCAGGGAGGATGGGGAGTGTGAGGGGTATCCTTGATGCTTGTGTGCCCAACTTTCCAAATCCCC
 GCCCCGCGATGGAGAAGAAACCGAGACAGAAGGTGCAGGGCCCACTACCGCTTCTCCAGATGAGCTCATGGGTTTCTCCA
 CCAAGGAAGTTTTCCGCTGGTTGAATGATTCTTTCCCCGCCCTCTCTCGCCCCAGGGACATATAAAGGCAGTTGTTGGACA
 CCCA-Transkriptionsstart -3'

Abbildung 4.5 Sequenz des TNF α -Promotors

Abgebildet ist ein Ausschnitt der Sequenz der Promotorregion des TNF α -Gens. Die Positionen der Primeroligonukleotide sind unterstrichen. Die Region des Mismatch ist rot (das 5' Oligonukleotid enthält hier ein C), die Stelle der Punktmutation blau markiert.

Die Amplifikation erfolgte mit den unter 2.6.2 beschriebenen Primern von Wilson, sowie bei den unter 3.1.8 aufgeführten Bedingungen. Der Nachweis erfolgte wie unter 3.1.11 beschrieben. Das ungeschnittene Amplifikat besitzt eine Größe von 107 bp. Ist die Schnittstelle vorhanden erhält man Fragmente der Größe 87 bp und 20 bp. Die Kontrollgruppe für die statistische Auswertung wurde der Publikation von Brinkmann et al. (37) 1997 entnommen.

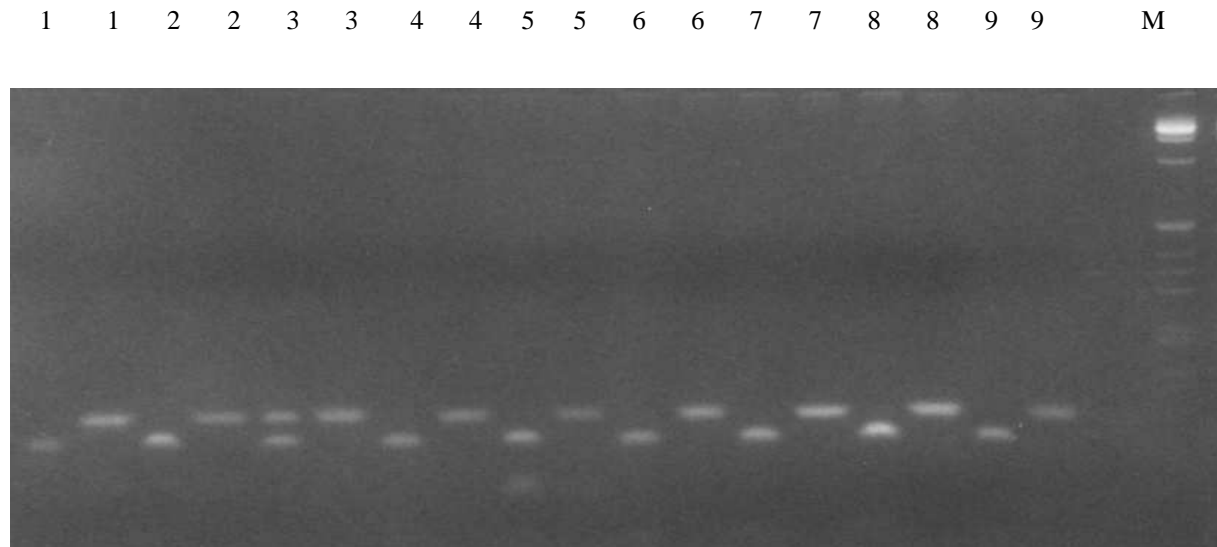


Abbildung 4.6: Typisierung des -308-Polymorphismus von TNFA

Die Abbildung zeigt die Proben von 9 der auf die Punktmutation untersuchten Patienten. Da sich ungeschnittenes Amplifikat und geschnittenes nur um 20 bp unterscheiden, wurde um eine erfolgte Restriktion sichtbar zu machen, der verdauten Reaktionsansatz (links) neben dem unverdauten PCR-Produkt (rechts) aufgetragen. Zu sehen sind 2-3 Banden. Oben die ungeschnittene Sequenz von 107 bp, unten das größere Fragment der geschnittenen DNS von 87 bp Größe. Das Fragment von 20 bp ist in der Regel nicht sichtbar, bei Nr. 5 jedoch schwach zu erkennen. DNS 1,2,4,5,6,7,8 und 9 kodieren das -308G-Allel. DNS 3 ist heterozygot -308G/A.

Die Untersuchung der Patienten zeigte folgende Verteilung:

N=139	TNF1 (-308G)	TNF2 (-308A)	TNF1/2 (-308A/G)
Gesamtzahl	97	10	32
Frauen	70	8	20
Männer	26	2	9
Geschlecht unbekannt	1		3

Gemäß der Nomenklatur Wilsons kennzeichnet TNF1 das Allel mit G in Position -308, TNF2 das Allel mit A in dieser Position.

Die statistische Auswertung zeigte keine Assoziation der Punktmutation mit der RA.

Allel	Häufigkeit und (Anzahl)		p-Wert
	Fälle	Kontrollen	
TNF1	0,81 (226)	0,76 (177)	0,16714
TNF2	0,19 (52)	0,24 (55)	

Da die einzelnen Blutproben in der Ambulanz der Rheuma-Einheit der LMU gesammelt wurden und die Kontrolle über bereits vorhandenes Material erst durch mich erfolgte, erhielt ich

zum Teil mehrfach Blutproben von denselben Patienten. Einige dieser Proben wurden zur Kontrolle von mir mituntersucht. Bei den dabei untersuchten RFLP zeigten sich keine Abweichungen zu den Voruntersuchungen.

4.5 Mikrosatelliten

Untersucht wurden die vier Mikrosatellitenmarker TNFa, TNFc, IL-1A und CD40L. Bei allen vier Polymorphismen handelt es sich um Dinukleotidwiederholungen. Zuerst wurden die Bedingungen für die Amplifikation der verschiedenen Marker ausgetestet, dabei wurde bei zwei ausgewählten DNS-Proben jeweils die MgCl₂-Konzentration und die Anlagerungstemperatur variiert und das Ergebnis der Amplifikation auf einem 2,5%igen Agarosegel überprüft. Die letztlich gewählten Bedingungen sind unter 3.2.2–3.2.5 aufgeführt. Um alle vier Mikrosatellitenmarker gleichzeitig auf einer Spur untersuchen zu können, sind verschiedenfarbige fluoreszenzmarkierte Primer verwendet worden. Nachdem die Qualität und Quantität der PCR-Produkte im Agarosegel überprüft und die ungefähre Konzentration im Vergleich zum Größenstandard abgeschätzt worden war, wurde für jede der zu untersuchenden DNS-Proben ein Pool der vier Marker zusammenpipetiert, der einer geschätzten Endkonzentration von 2 ng/μl entsprechen sollte. Die DNS aus diesem Pool wurde dann auf das denaturierende Gel aufgetragen, vom Applied Biosystem 373 DNA Sequencer gemessen und an einen angeschlossenen Rechner übermittelt (siehe auch 3.2.6.2 und 3.2.6.3). Als nächstes wurden die gespeicherten Daten am Computer mit Hilfe des Programms Genescan weiterverarbeitet, wie z.B. Überprüfung der vom Rechner zugewiesenen Größe des ROX-markierten Größenstandards, auf dem die Berechnung der Allele beruht, Zuordnung der Patienten zu den verschiedenen Gelbahnen für die Auswertung etc. Im nächsten Arbeitsschritt wurden diese Daten in das Programm Genotyper importiert. In diesem Programm werden die einzelnen Reflexionsspitzen nach manueller Definition der Mikrosatellitengröße und markierender Farbe zugeordnet. Bei der PCR von Mikrosatelliten kann es aufgrund ungenauer Amplifikation der repetitiven Sequenz manchmal zur Bildung von „Stotterbanden“ kommen, d.h. es entstehen in geringerer Menge als die Hauptbanden kürzere und/oder längere Nachbarbanden. Vom Programm sollen deshalb bei der Auswertung immer die beiden höchsten Reflexionsspitzen pro Marker berechnet werden und in die Auswertung eingehen. Das Ergebnis der Berechnung wird schließlich in Form eines Linienverlaufs mit den identischen oder beiden verschiedenen Allelen als Spitze(n) dargestellt. Da mehrere Gele gefahren wurden und um eventuelle Unterschiede in den Laufeigenschaften der Gele zu erkennen, wurde in einer Spur immer dieselbe DNS als Kontrolle mitgeführt. Auch mußten einige Probe wiederholt untersucht werden, weil sie kein oder kein eindeutiges Ergebnis zeigten oder die Konzentration der eingesetzten DNS zu hoch war, so dass der berechnete Peak zu breitgipflig erschien und eine genaue Zuordnung nicht möglich war. Letztlich ließen sich einige Proben für bestimmte Marker trotzdem nicht auswerten, so dass sie aus der Auswertung genommen werden mußten. Bei der Kontroll-DNS kam es zu Abweichungen um bis zu einem Nukleotid, dreimal um zwei Nukleotide. Die vom Computer ermittelten Werte werden bis auf zwei Stellen hinter dem Komma genau angegeben und wurden wie folgt gerundet. Handelte es sich bei den gesuchten Allelen um geradzählige Nukleotidfolgen und ergab die Berechnung einen ungeraden Wert wurde er auf den mathematisch nächstgelegenen geraden Wert auf- oder abgerundet und umgekehrt. Wurde in einigen Fällen die Fragmentgröße vom Rechner nicht zugeordnet, wurde sie mittels der Linealeiste am Bildschirmrand ermittelt.

4.5.1 Der Mikrosatellit TNFc

Nedospasov et al. (42) beschrieben 1991 einen Mikrosatellitenpolymorphismus im ersten Intron des $LT\alpha$ -Gens. Es handelt sich hierbei um TC/GA Dinukleotidfolgen mit insgesamt zwei Allelen von 9 und 10 Wiederholungen. Die verwendeten Primer entsprechen denen von Nedospasov et al., nur dass die verwendeten Primer IR 6 und IR 7 um 1 bzw. 3 Basen im Vergleich zu denen von Nedospasov et al. kürzer sind. Oligonukleotidsequenz und PCR-Bedingungen sind unter 2.6.4 und 3.2.4 aufgeführt. Untersucht wurden alle 139 Patienten, die DNS eines Patienten konnte nicht typisiert werden.

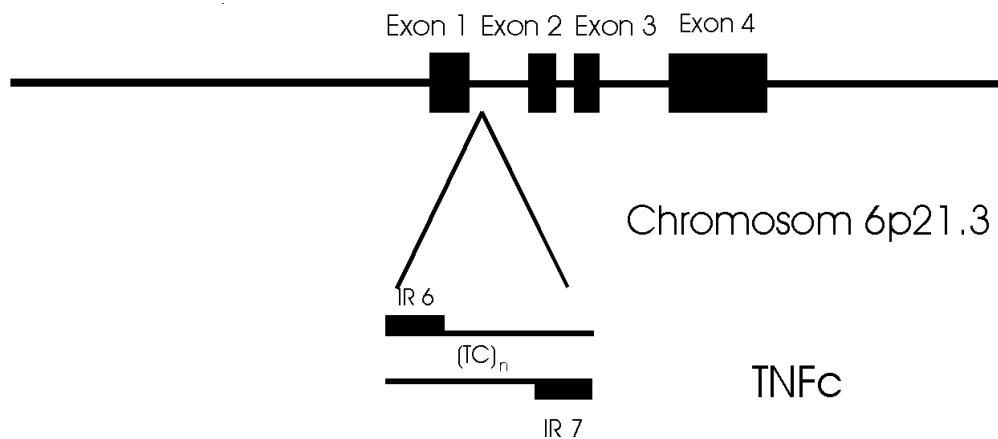


Abbildung 4.7: Lokalisation des TNFc-Mikrosatelliten im LTA

Die Abbildung zeigt die Lokalisation des untersuchten TNFc Mikrosatelliten im ersten Intron des $LT\alpha$ -Gens. Exons sind als schwarze Kästchen dargestellt und beschriftet.

```

...(+ 305) 5'
GTTTCTCTGACTGCATCTTGTCCCCTTCTCTGTCGATCTCTCTCTCGGGGGTCGGGGGGTGCTGTC
IR 6

TCCCAGGGCGGGAGGTCTGTCTTCCGCCGCGTGCCCCGCCCCGCTCACTGTCTCTCTCTCTCTCTC

TCTTTCTCTGCAGGTTCTCCCCATGACA 3' ... (2. Exon)
IR 7
  
```

Abbildung 4.8: Sequenzausschnitt aus dem ersten Intron des LTA

Ausschnitt der Sequenz zwischen dem ersten und zweiten Exon des $LT\alpha$ -Gens. Gezeigt ist das Allel TC_9 . Die Positionen der Primerbindungsstellen sind unterstrichen, die repetitive Sequenz TNFc ist grün und der Beginn des zweiten Exons kursiv dargestellt.

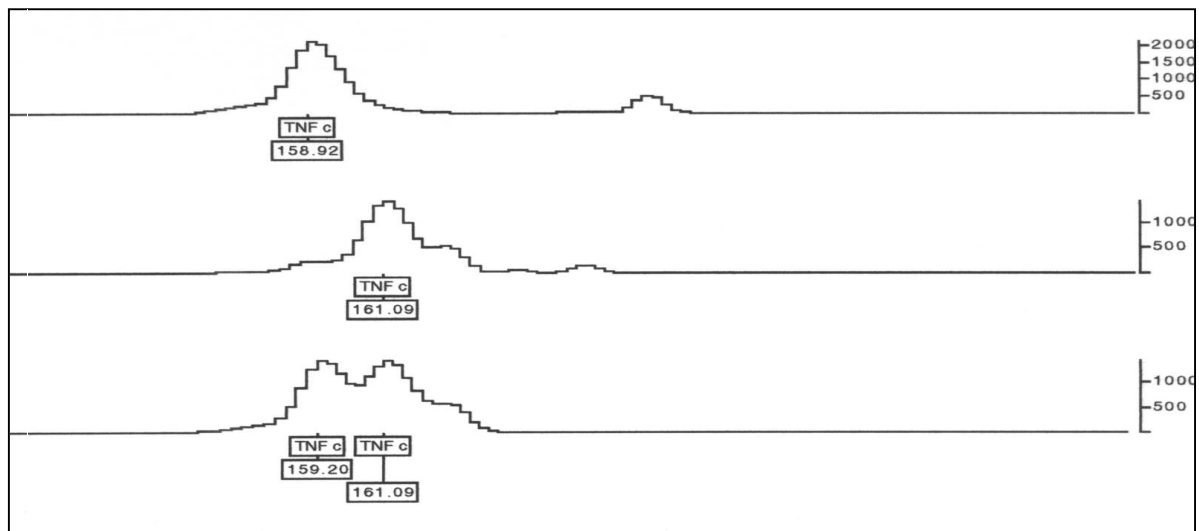


Abbildung 4.9: Ausdruck eines Elektropherogramms für den TNFc Mikrosatelliten

Elektropherogramm dreier Proben für den untersuchten TNFc Mikrosatelliten. Dargestellt sind die beiden möglichen Allele. Die beiden oberen Patienten sind jeweils für die verschiedenen Allele homozygot, der unterste besitzt beide Allele und ist damit heterozygot.

Das untersuchte Kollektiv zeigte folgende Verteilung:

Allel TNFc TC/GA _n	Länge (bp)	Allelanzahl	Häufigkeit
1 TC/GA ₉	159	200	0,72
2 TC/GA ₁₀	161	76	0,28

Die statistische Auswertung ergab keine Assoziation eines TNFc-Allels zur Rheumatoiden Arthritis. Die Daten der Kontrollgruppe wurden von Prof. Dr. med. E. D. Albert, Labor für Immunogenetik, LMU München zur Verfügung gestellt.

Allel TNFc TC/GA _n	Häufigkeit und (Anzahl)		p-Wert
	Fälle	Kontrollen	
1 TC/GA ₉	0,72 (202)	0,72 (251)	0,707
2 TC/GA ₁₀	0,28 (74)	0,28 (99)	

4.5.2 Der Mikrosatellit CD40L

Im 3' untranslatierten Bereich des CD40L-Gens auf den langen Arm des X-Chromosoms beschrieb Allen et al. (43) 1993 einen Mikrosatellitenlocus mit einer Folge von CA/GT Dinukleotidwiederholungen. In den untersuchten Kollektiv fanden sich 12 verschiedene Allele, bei 7 von 139 Patienten konnte keine Auswertung erfolgen. Die verwendeten Primer wurden aus der Dissertation von Dr. rer. nat. M. Gomolka (36) übernommen. Primer und PCR-Bedingungen sind den Angaben unter 2.6.4 und 3.2.3 zu entnehmen.

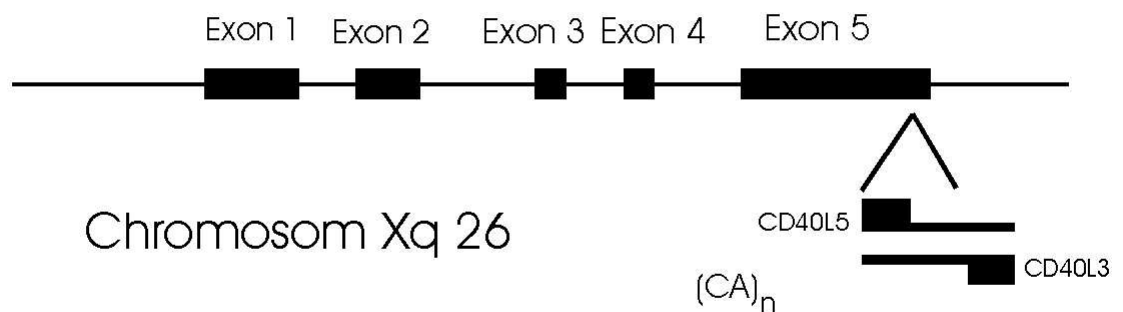


Abbildung 4.10: Lokalisation des Mikrosatelliten CD40L auf dem CD40L-Gen

Genomische Struktur des CD40L-Gens mit eingezeichnetem untersuchten Mikrosatelliten. Die Exons sind als schwarze Kästchen dargestellt und bezeichnet.

...5' (1480)

CTCTTCCCTCCCCAGTCTCTTCTCAATCCCCCTTTCTAACACACACACACACACACACACAC
CD40L5

ACACACACACACACACACACACACACAGAGTCAGGCCGTTGCTAGTCAGTTCTTCTTTCCACCCTGT
CD40L3

CCCTAT 3' (1620)...

Abbildung 4.11: Sequenzausschnitt aus dem CD40L-Gen

Dargestellt ist ein Ausschnitt der 3' untranslatierten Region des CD40L-Gens. Die Primerbindungsstellen sind unterstrichen, der Mikrosatellit (Allel CA₂₅) ist blau dargestellt.

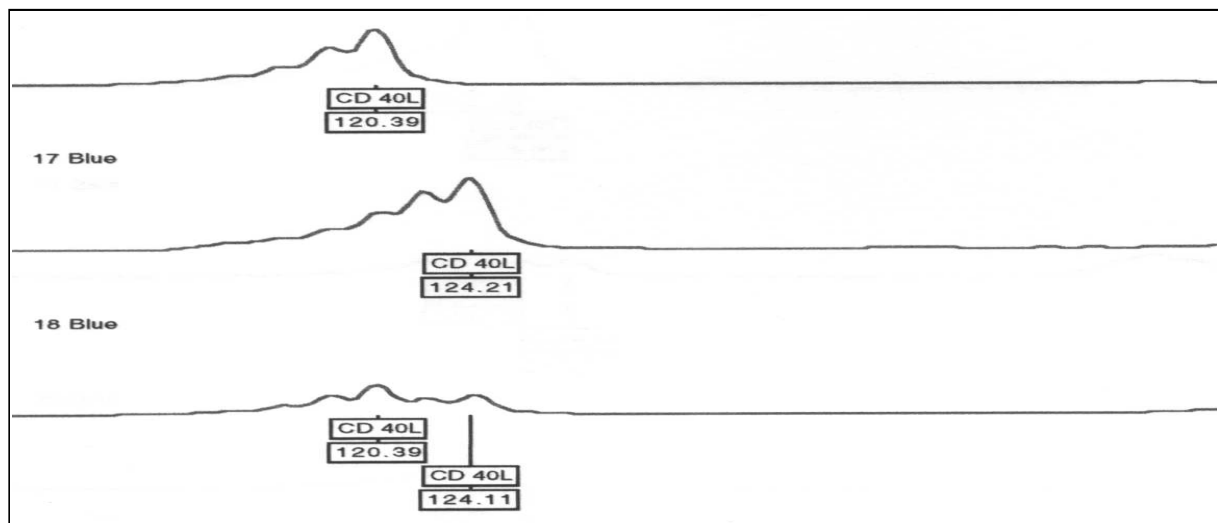


Abbildung 4.12: Elektropherogrammausdruck

Elektropherogramm dreier Proben aus dem untersuchten Kollektiv. Dargestellt ist der Mikrosatellit CD40L. Die oberen beiden Kurven zeigen die Proben zweier Patienten, die an diesem Locus jeweils homozygot sind. Der der unteren Kurve zugehörige Patient besitzt zwei verschiedene Allele an dieser Stelle mit einer Länge von 120 bp und 124 bp.

Die einzelnen Allele wurden gemäß den Vorgaben bei M. Gomolka vom höchsten Wert absteigend durchnummeriert.

Allel	Länge (bp) CA/GT _N	Häufigkeit und (Anzahl)	
		Fälle	Kontrollen
1	138 CA/GT ₃₂	0 (1)	0 (0)
2	136 CA/GT ₃₁	0 (1)	0 (0)
3	134 CA/GT ₃₀	0 (1)	0 (0)
4	132 CA/GT ₂₉	0,03 (7)	0,01 (2)
5	130 CA/GT ₂₈	0,09 (20)	0,09 (13)
6	128 CA/GT ₂₇	0,05 (11)	0,07 (10)
7	126 CA/GT ₂₆	0,18 (41)	0,1 (15)
8	124 CA/GT ₂₅	0,44 (98)	0,44 (65)
9	122 CA/GT ₂₄	0,07 (16)	0,11 (17)
10	120 CA/GT ₂₃	0,07 (15)	0,1 (15)
11	118 CA/GT ₂₂	0,045 (10)	0,06 (9)
12	116 CA/GT ₂₁	0 (0)	0 (0)
13	114 CA/GT ₂₀	0 (0)	0,01 (2)
14	110 CA/GT ₁₈	0 (1)	0 (1)

Für die statistische Auswertung wurden die Allele mit einer Häufigkeit < 10 % zu einer Gruppe zusammengefaßt, um die statistische Aussagekraft nicht durch zu hohe Anzahl durchzuführender Tests zu verringern. Es ergaben sich hierbei vier Gruppen, wobei die Allele 7, 8 und 9 je eine Gruppe bildeten und die übrigen Allele zu einer Gruppe zusammengefaßt wur-

den. Die Häufigkeiten dieser Gruppen bei Erkrankten und Gesunden wurden mit Hilfe eines Mehrfelder Chi-Quadrat Tests verglichen. Im statistischen Vergleich zeigten sich keine signifikanten Verteilungsunterschiede ($p = 0,08718$). Die Typisierung der Kontrollgruppe erfolgte im Rahmen dieser Arbeit.

4.5.3 Der Mikrosatellit IL-1A

Das Interleukin 1A Gen befindet sich auf den kurzen Arm von Chromosom 2 des Menschen. Es besteht aus 7 Exons und kodiert für eine Isoform des Interleukin 1. Der untersuchte Mikrosatellit befindet sich im fünften Intron des Gens. Es handelt sich hierbei um GT/CA Wiederholungen (44). Die verwendeten Primer wurden aus der Dissertation von Dr. rer. nat. Maria Gomolka (36) übernommen. Oligonukleotidsequenz und PCR-Bedingungen sind unter 2.6.4 und 3.2.5 beschrieben. In dem untersuchten Kollektiv fanden sich insgesamt 9 verschiedene Allele, es gab keine Ausfälle.

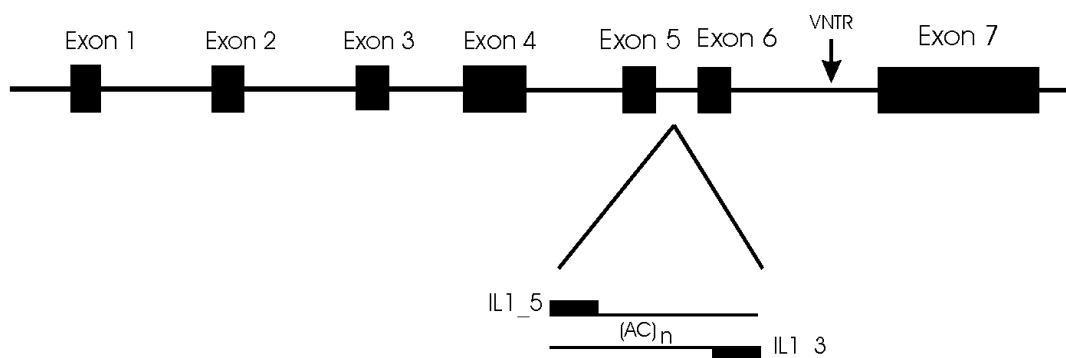


Abbildung 4.13: Genomische Struktur des IL-1A-Gens

Die Abbildung zeigt die genomische Struktur des IL-1A-Gens. Die schwarz ausgefüllten Kästen entsprechen wieder den Exons. Im fünften Intron ist der untersuchte Mikrosatellit mit Primer eingezeichnet. VNTR bezeichnet den „variable number of tandem repeats“ Polymorphismus in Intron 6.

...5' (7590)

TATTTACCTGCCTAGTGAGTGTGGAAGACATTGTGAAGGACACAAAGATGTATAGAATTCCATTCC
IL1.5

TGACTTCCAGGTATTTACACCATAGGTGGGGACCTAACTACACACACACACACACACACACACA

CACACACACACCATGCACACACAATCTACATCAACACTT 3' (7760)...
IL1.3

Abbildung 4.14: Sequenz eines Allels des untersuchten Mikrosatelliten IL-1A

Sequenz aus dem fünften Intron des IL-1A Gens. Die Primerbindungsstellen sind unterstrichen, der untersuchte Mikrosatellit (Allel CA₁₈) ist blau dargestellt.

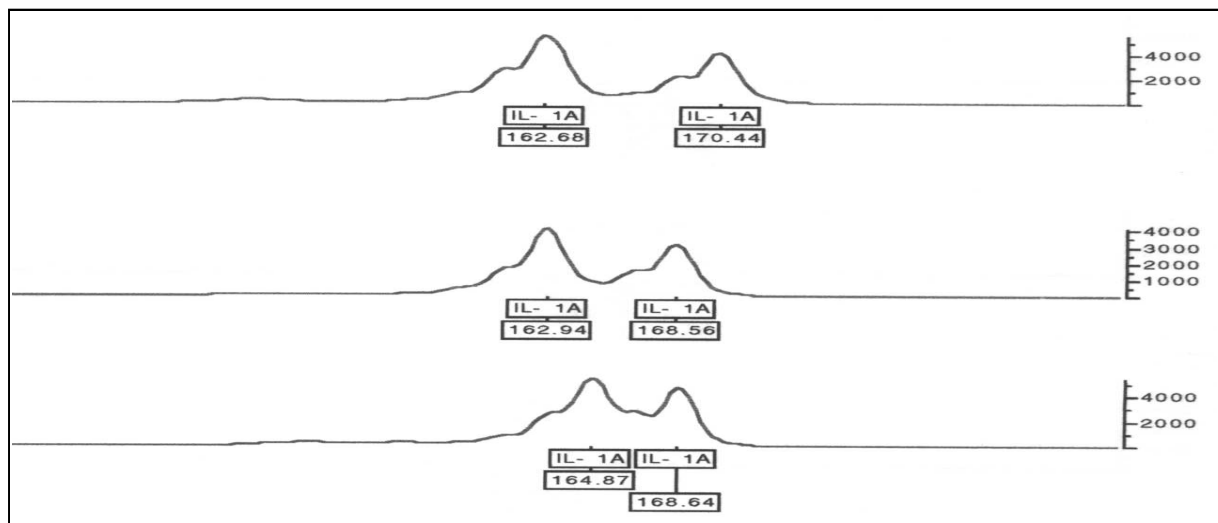


Abbildung 4.15: Elektropherogrammausdruck

Elektropherogramm dreier für den Mikrosatellit IL-1A heterozygoter Patienten aus dem untersuchten Kollektiv.

Allel	Länge (bp) GT/CA _n	Häufigkeit und (Anzahl)	
		Fälle	Kontrollen
1	179 GT/CA ₂₆	0 (0)	0 (1)
2	175 GT/CA ₂₄	0 (3)	0 (2)
3	173 GT/CA ₂₃	0 (1)	0,018 (7)
4	171 GT/CA ₂₂	0,025 (7)	0,038 (15)
5	169 GT/CA ₂₂	0,24 (68)	0,21 (84)
6	167 GT/CA ₂₀	0,057 (16)	0,04 (17)
7	165 GT/CA ₁₉	0,24 (68)	0,30 (119)
8	163 GT/CA ₁₈	0,36 (100)	0,36 (141)
9	161 GT/CA ₁₇	0,04 (13)	0 (2)
10	159 GT/CA ₁₆	0 (2)	0 (0)

In der statistischen Auswertung mittels Chi-Quadrat Test wurden wiederum die Allele <10% zu einer Gruppe zusammengefaßt. Die Allele 5, 7 und 8 bildeten jeweils eine Gruppe, die restlichen Allele bildeten zusammen eine Gruppe. Die Häufigkeiten dieser Gruppen bei Erkrankten und Gesunden wurden mit Hilfe eines Mehrfelder Chi-Quadrat Tests verglichen. Eine Assoziation dieser Allelgruppen des IL-1A-Mikrosatelliten zur Rheumatoiden Arthritis (p-Wert = 0,206) war nicht feststellbar. Die Typisierung der Kontrollgruppe war bereits in einer früheren Dissertation des Instituts erfolgt (36).

4.5.4 Der Mikrosatellit TNFa

Zwei weitere Mikrosatellitenloci in der Nähe des $LT\alpha$ -Gens wurden 1991 von Nedospasov et al. (42) beschrieben. Sie sind engstens benachbart und befinden sich ca. 3,5 kb stromaufwärts in Richtung Telomer. Bezeichnet werden sie als TNFa und TNFb. Der polymorphe von beiden, TNFa, eine Folge von GT/CA Wiederholungen, wurde in diese Studie mit einbezogen. Die verwendeten Primer sind unter 2.6.4 aufgeführt und sind wieder etwas kürzer als die von Nedospasov et al. benutzten. Die zur Amplifikation gewählten Bedingungen finden sich bei Punkt 3.2.2. In dem von mir untersuchten Kollektiv fanden sich insgesamt 14 verschiedene Allele, bei vier der 139 Patienten war eine Auswertung nicht möglich.

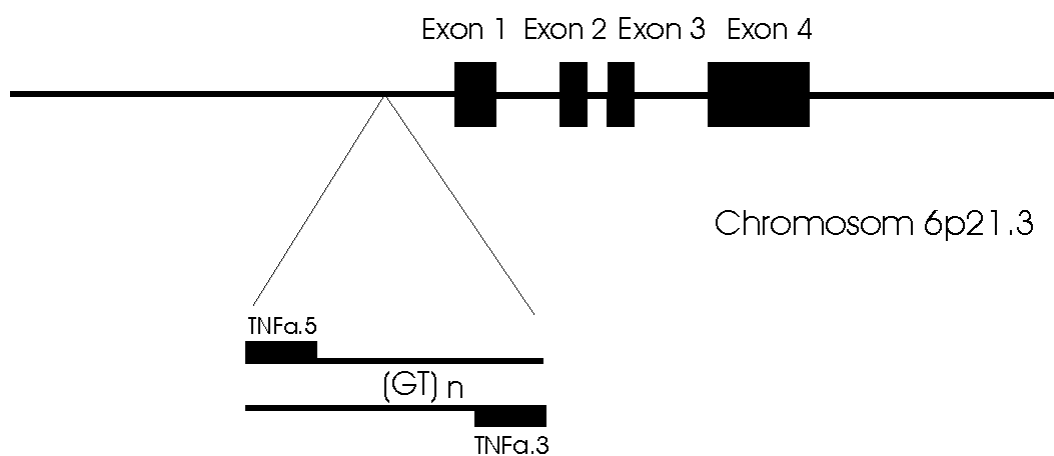


Abbildung 4.16: Lage des TNFa-Mikrosatelliten

Die Abbildung zeigt die Lokalisation des TNFa-Mikrosatelliten vor dem ersten Exon des $LT\alpha$ -Gens

LTA-Locus...5'

CCTCTAGATTTTCATCCAGCCACAGGAAGCCTTTAAAGGTCGTCAGAGTGTGTGGTGCATGCG
IR 2

TGCGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCAGGGGAGAGAGGNNAGGGAGAGAGAGAGAGAG
IR 4

AGAGAAAGAGGGAGGTGAGCAGAAGGTGATTGGATTTTTTTTTTCTTTTGACATGGTGTCTTGCTCT

GTGGCCTAGGCTGGAGTGC 3' ...Telomer

Abbildung 4.17: Sequenz eines Allels des untersuchten Mikrosatelliten TNFa

Ausschnitt der Sequenz ca. 3,5 kb in Richtung Telomer des LTA-Locus. Die Primerbindungsstellen sind unterstrichen, der TNFa-Mikrosatellit (Allel GT_{13}) ist grün, der eng benachbarte TNFb-Mikrosatellit (Allel GA_{10}) blau dargestellt.

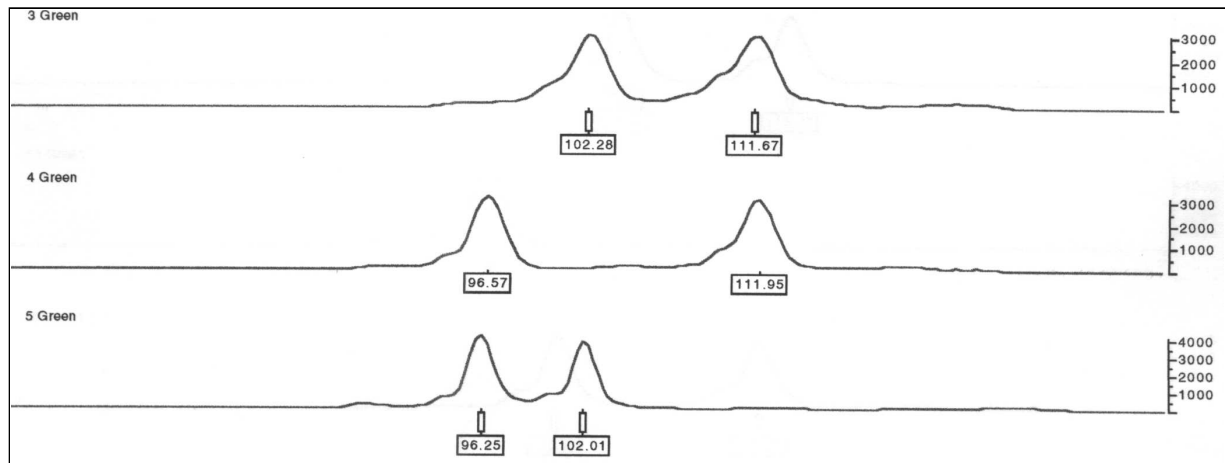


Abbildung 4.18: Elektropherogrammausdruck

Elektropherogramm dreier Proben aus dem untersuchten Kollektiv. In den Kästchen ist die für die einzelnen Allele berechnete Länge in nt angegeben. Am rechten Rand wird die Fluoreszenzintensität in willkürlicher Einheit dargestellt.

Allel	Länge (bp) GT/CA _n	Häufigkeit und (Anzahl)	
		Fälle	Kontrollen
1	119 GT/CA ₁₈	0,01 (2)	0,04 (17)
2	117 GT/CA ₁₇	0,018 (5)	0,01 (2)
3	115 GT/CA ₁₆	0,096 (26)	0,16 (66)
4	113 GT/CA ₁₅	0,14 (39)	0,12 (51)
5	111 GT/CA ₁₄	0,08 (24)	0,02 (11)
6	109 GT/CA ₁₃	0,01 (3)	0 (1)
7	107 GT/CA ₁₂	0,04 (11)	0,1 (41)
8	105 GT/CA ₁₁	0,1 (28)	0,11 (48)
9	103 GT/CA ₁₀	0,085 (23)	0,07 (29)
10	101 GT/CA ₉	0,1 (27)	0,05 (21)
11	99 GT/CA ₈	0,01 (2)	0,02 (10)
12	97 GT/CA ₇	0,22 (61)	0,26 (109)
13	95 GT/CA ₆	0,062 (17)	0,02 (9)
14	93 GT/CA ₅	0 (0)	0 (1)
15	91 GT/CA ₄	0 (0)	0 (0)
16	89 GT/CA ₃	0,01 (2)	0 (0)

Wiederum wurden Allele mit einer Häufigkeit < 10% zu einer Gruppe zusammengefaßt. Es ergaben sich insgesamt fünf Gruppen. Die Allele 3 und 12 bildeten je eine Gruppe, die Allele 4 und 9 und 8 und 10 zusammen zwei weitere. Die restlichen Allele wurden zur letzten Gruppe zusammengefaßt. Die Häufigkeiten dieser Gruppen bei Erkrankten und Gesunden wurden mit Hilfe eines Mehrfelder Chi-Quadrat Tests verglichen. Es zeigte sich keine Assoziation dieser Allelgruppen dieses Mikrosatelliten zur RA (p-Wert = 0,09029). Die Typisierung der Kontrollgruppe war bereits in einer früheren Dissertation des Instituts erfolgt (36).

5. Diskussion

5.1 TNF: Pathomechanismen und neue Therapieansätze

Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist die Beteiligung mehrerer Gene bei der Entstehung oder Veranlagung zur RA wahrscheinlich. Grundsätzlich kommen hierfür natürlich viele Gene in Frage. Aus diversen Gründen gehörte und gehört aber besonders der TNF-Locus immer wieder zu den ersten der in Frage kommenden Kandidaten. So aus Gründen seiner Lokalisation im menschlichem Genom, der Bedeutung seiner Produkte im Immunsystem generell und deren nachgewiesener führender Rolle in der Pathogenese der RA, sowie aus Assoziationen bestimmter Allele dieser Region mit anderen Autoimmun- oder Infektionskrankheiten.

TNF α und LT α zeigen in ihrer Aminosäuresequenz eine Homologie von 36% und binden an die gleichen Rezeptoren, was auf ähnliche biologische Wirkungen hinweist, werden aber von verschiedenen Zellen exprimiert. Beide Zytokine wurden bei RA-Patienten nachgewiesen, TNF α jedoch öfter und in wesentlich höheren Konzentrationen, so dass ihm die größere Bedeutung zugeschrieben wird. Von aktivierten Makrophagen und Monozyten gebildet, wird es zu einem frühen Zeitpunkt der Entzündungsreaktion ausgeschüttet und löst zusammen mit anderen proinflammatorischen Zytokinen vor allem IL-1 eine Kaskade von Immunreaktionen aus. So bewirkt es bei Neutrophilen und Makrophagen die Steigerung der Phagozytose, eine verstärkte Expression von MHC-Molekülen auf Fibroblasten und Endothelzellen, eine verstärkte Antikörperproduktion, sowie eine verstärkte Präsentation von Adhäsionsmolekülen auf Granulozyten und Endothelzellen. Hierdurch wird die Anlagerung der Granulozyten an die Gefäßwand und ihr erleichterter Durchtritt in das synoviale System erreicht (45). Des Weiteren bewirken TNF α und IL-1 die verstärkte Genexpression der knorpelschädigenden Metalloproteinasen (Kollagenase und Stromelysin) (46-48), die als die Hauptmediatoren der Knorpel- und Knochenschädigung gelten, sowie der Phospholipasen und hyperalgesischen Prostaglandinen und Leukotrienen. Sie sind an der Induktion der Proliferation der Synovialzellen (49) und an der Einleitung der notwendigen Neoangiogenese (50) beteiligt. Ebenso verhindern sie die Proteoglykansynthese (51) und führen zur vermehrten Osteoklastenaktivierung an der Knorpel-Pannus-Grenze (52). Dass TNF α in der Lage ist die IL-1-Ausschüttung zu bewirken, ist seit langem bekannt (47). Versuche mit TNF α neutralisierenden Antikörpern aber zeigten, dass es die Hauptrolle unter den proinflammatorischen Zytokinen bei der RA einzunehmen scheint. So wurde durch die TNF α -Neutralisierung, der IL-1 Spiegel in Synovialzellkulturen von RA-Patienten in vitro innerhalb weniger Tage unter die Nachweisgrenze gesenkt (13). Ebenso kommt es zum Abfall weiterer proinflammatorischer Zytokine wie dem GM-CSF (53), von IL-6 und von IL-8 (54). Für GM-CSF haben Untersuchungen gezeigt, dass es die Neutrophilen vermittelte Knorpeldegradation verstärken kann (55) und dass IL-6 mit einer verstärkten Osteoklastenaktivierung und damit Knochenresorption einhergeht. Es wird auch mit der Inhibierung der Knochenneubildung in Verbindung gebracht (56). Kürzlich wurde publiziert, dass aktivierte T-Lymphozyten die Aktivität von Osteoklasten regulieren und den Knochenabbau induzieren können (57). Tierversuche unterstreichen die herausragende Bedeutung, die den TNF α und IL-1 bei der RA zugewiesen werden. Auf das transgene Tiermodell von Keffer et al. (24) wurde schon in der Einleitung hingewiesen. Viele andere Untersuchungen mit verschiedenen TNF- und IL-1 Antagonisten führten bei einer Kollagen induzierten Arthritis zu einer Verzögerung des Krankheitsbeginns und/oder Verminderung des Schweregrades der Entzündung (58-64). Angespornt von den beeindruckenden in vitro Er-

gebnissen und Tiermodellen, wurden klinische Studien mit verschiedenen TNF inhibierenden Molekülen angestrengt, wie z.B. monoklonale TNF spezifische Antikörper und TNF-Rezeptor-Immunglobulin-Fusionsproteinen. Sie führten zu einer drastischen Besserung klinischer Symptome wie Morgensteife, Schmerzen, Zahl der geschwollenen und druckempfindlichen Gelenke, Abgeschlagenheit, Müdigkeit und Kraftlosigkeit. Mit Enbrel® (Etanercept) und Remicade® (Infliximab) ist die erste Generation dieser Medikamente seit 2000 für den deutschen Markt zugelassen und die klinische Erfahrung bestätigt die Ergebnisse klinischer Studien mit einer Ansprechrate von ca. 70% und einer geringen Anzahl von beobachteten Nebenwirkungen. Fest steht aber auch, dass mit diesen Medikamenten in erster Linie nur die bestehende Dysbalanz zwischen den protektiven körpereigenen Stoffen, wie den löslichen TNF-Rezeptoren und der Überproduktion an proinflammatorischen Zytokinen wie den TNF α und IL-1 beeinflusst wird. Die Ursache für die vermehrte Produktion bzw. die Umstände, die die vermehrte Expression des TNF bedingen bleiben jedoch weiter ungeklärt, ebenso die genauen molekularen Wirkmechanismen.

5.2 Der TNF-Locus, ein unabhängiges Suszeptibilitäts-gen bei der RA?

Wie bereits unter 1.4 erwähnt, besitzen 80% der deutschen RA-Patienten das HLA-DRB1*04 oder 01 Allel. Studien mit künstlich stimulierten Lymphozyten- und Monozyten-Zellkulturen wiesen Assoziationen zwischen bestimmten HLA-Typen und der TNF-Sekretion nach. Es wurde ein starkes Kopplungsungleichgewicht zwischen TNF-Polymorphismen (37, 65) und Allelen der MHC-II-Klasse gefunden. Bendtzen et al. (66) und Jacob et al. (67) beschrieben unabhängig von einander niedrigere Sekretionsspiegel von TNF α bei Personen, die das HLA-DR2 Allel besitzen. Jacob beschreibt zusätzlich eine erhöhte Sekretion bei DR4 positiven Probanden. Pociot et al. (65) untersuchten die Zellkulturen von 87 Dänen mit einer anderen möglichen Autoimmunkrankheit, nämlich den insulinabhängigen Diabetes mellitus und fanden eine Assoziation zu bestimmten HLA-Typen, dem LTA NcoI RFLP und dem TNF α Mikrosatelliten zur TNF α -Sekretion. Zwei dieser Haplotypen waren DR4 positiv. Unter diesen wiederum zeigten diejenigen mit dem TNF α_2 - und dem TNFB*2-Allel die höchste TNF α -Sekretion. Außerdem bemerkten sie eine vermehrte Stimulierbarkeit bei Probanden, welche das TNF α_2 -Allel trugen. Pociot et al. (65) schlossen hieraus auf eine zweite, vom HLA-Typ unabhängige Beeinflussung der TNF α -Sekretion. Schon in einer früheren Studie beschreibt Pociot et al. (37) eine Assoziation des TNFB*2-Allel mit einer erhöhten IL-1 β -Produktion bei Diabetikern. McManus et al. (68) wiesen bei der Untersuchung von 56 Patienten mit Zöliakie eine Assoziation dieser Krankheit mit dem TNF α_2 Allel nach, unabhängig von den damit assoziierten HLA-Typ. Hajeer et al. (69) und Perdriger (71) fanden in getrennten Studien erhöhte TNF α -Allele gekoppelt mit bestimmten HLA-Typen bei RA-Patienten. So zeigte sich das in der gesamten Patientengruppe erhöhte 107 bp (TNF α_6) lange Amplifikat gekoppelt zum HLA-DRB1*0401-Allel, das 99 bp (TNF α_2) lange gekoppelt zum HLA-DRB1*0301-Allel. In einer zweiten Studie von Hajeer et al. (70) in der 181 RA-Patienten aus dem Nordwesten Englands typisiert wurden, ergab sich unter der Gesamtzahl der weiblichen Probanden erneut eine signifikant erhöhte TNF α_6 Häufigkeit, wohingegen die betroffenen jungen männlichen Patienten das TNF α_2 und zusätzlich das TNF α_2 -Allel bevorzugt besaßen. M. Gomolka (36) beschreibt in ihrer Dissertation eine signifikante Erhöhung des 97 bp langen Amplifikats (Allel 13) in ihrem RA-Kollektiv. In den von mir untersuchten, nicht HLA-typisierten Kollektiv zeigten sich keine der oben genannten Assoziationen. Dies stimmt mit Ergebnissen von Field et al. (72) überein, der in seinem Kollektiv von 98 britischen RA-Patienten zwar eine Erhöhung des TNF α_2 -Allels feststellte, diese Erhöhung ließ sich jedoch nur bei den mit diesen

Allel im Kopplungsungleichgewicht stehenden HLA-DR4-Trägern nachweisen. Eine signifikante Erhöhung des 107 bp langen Amplifikats (Allel TNF α_6) und/oder eines bestimmten TNF α -Allels war nicht zu beobachten. Letzteres und die unterschiedlichen gefundenen Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass eine vom HLA-Typ unabhängige Suszeptibilität dieser Allele eher nicht vorliegt.

Wie bereits dargestellt fand Pociot (65) bei seiner Untersuchung an IDDM-Patienten eine erhöhte TNF α -Sekretion, wenn unter anderem das TNFB*2 Allel vorlag. Messer et al. (34) ermittelte bei Stimulation peripherer Blutmonozyten (PBMC) mit Phythaemagglutinin (PHA) eine erhöhte sekretorische Aktivität bei TNFB*1-Homozygoten, stellte aber keinen Zusammenhang zur TNF α -Expression fest. Wichelow et al. (73) hingegen erhielten bei ihren Untersuchungen mit durch PHA stimulierten PBMC erhöhte LT α -Titer bei TNFB*2 homozygoten und heterozygoten Gesunden. Cabrera et al. (74) beschreiben bei an mukokutaner Leishmaniose Erkrankten eine signifikante Erhöhung des TNFB*1 Allels, eine Infektionserkrankung bei der zuvor stark erhöhte TNF α -Serumtiter festgestellt worden waren (75). Fugger et al. (76) berichteten von einer verminderten Frequenz des TNFB*2 Allels in vier verschiedenen Autoimmunerkrankungen, darunter auch die RA, welche jedoch nur im Fall des Lupus erythematoses (LE) signifikant waren. Bettinotti et al. (77) bestätigten dieses Ergebnis für den LE, allerdings nur in Zusammenhang mit einem erweiterten Haplotyp, so dass nicht ersichtlich war, welches Allel für die Assoziation zum LE hauptverantwortlich ist. Ein möglicher Zusammenhang von LTA-RFLP im besonderen des NcoI-RFLP schien somit zu mindestens denkbar. In dem von mir untersuchten Kollektiv fand sich keine direkte Assoziation des NcoI-RFLP und des ebenfalls meiner Kenntnis nach zu Beginn dieser Studie noch nicht untersuchten AspHI-RFLP des LT α -Gens zur RA. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen von Campbell et al. (78) und den zu meinen Untersuchungen ca. zeitgleichen Studien von Field et al. (72) und Vinasco et al. (79), die ebenfalls in ihren RA-Kollektiven keine Assoziationen dieser RFLP im LT α -Gen feststellen konnten.

McGuire et al. (80) berichteten 1994 in einer groß angelegten Studie mit 376 Malaria-Patienten mit zerebraler Beteiligung über ein 7fach erhöhtes Risiko der homozygoten TNF2-Allel-Träger schwere neurologische Folgeschäden oder gar den Tod davonzutragen. In klinischen Studien war zuvor ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Malaria und der TNF α -Produktion festgestellt worden (81-83). Aus einem Bericht über einen Zusammenhang dieses Polymorphismus mit der Induzierbarkeit der TNF α -Produktion, rückfolgerten sie dessen direkte Beteiligung an dem Krankheitsgeschehen (84). Eine erhöhte Prävalenz des TNF2-Allels in Verbindung mit HLA-DR3 bei LE wurde ebenfalls festgestellt (85). Bei der Untersuchung einer relativ kleinen Anzahl von RA-Patienten berichteten Danis et al. (86) von einer signifikanten Erhöhung des seltenen TNF2-Alles im Vergleich zur Kontrollgruppe, sowie einer damit verbundenen erhöhten Produktion von IL-1 α bei in vitro stimulierten Monozyten. Diese Feststellung konnte bei der Untersuchung meines Kollektiv, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen mehrerer weiterer Studien nicht bestätigt werden (35, 79, 87).

5.3 Der CD40 Ligand, Fehlermöglichkeiten bei der Zuordnung von Mikrosatellitenallelen

Bei den Ergebnissen des von mir untersuchten Kollektivs fiel zunächst eine statistisch signifikante Häufung der Allele 7 (126 bp) und 8 (124 bp) bei den Erkrankten und eine signifikante Verminderung des Allels 9 (122 bp) des CD40L-Mikrosatelliten im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe von M. Gomolka auf. Wie schon unter 4.5 erwähnt, kann es bei der Amplifikation von Mikrosatelliten auf Grund ungenauer DNS-Kettenverlängerung zur Bildung sogenannter Stotterbanden kommen, die die Auswertung der Ergebnisse erschweren können. Außerdem kann es, da auf Grund der größeren Anzahl der Patienten mehrere Gele gefahren werden mußten bzw. manche Proben wiederholt werden mußten, durch verschiedene Laufeigenschaften des jeweiligen Gels zu Verschiebungen bei der Zuordnung kommen, die umso schwerwiegender sein können, da es sich bei den untersuchten Mikrosatelliten um Dinukleotidwiederholungen also Wiederholungen von nur zwei Basen handelt. Um solche Verschiebungen zu erkennen, wurde bei jedem Gel eine identische DNS-Probe als Kontrolle aufgetragen. Nach der statistischen Auswertung bestand nun das Problem, dass bei Betrachtung der Häufigkeiten zwischen meinem RA-Kollektiv und der Kontrollgruppe von M. Gomolka eine Verschiebung von einem Dinukleotid bei der jeweiligen Allelzuordnung auffiel. Ein Umstand der umso schwerer wog, da in diesem statistischen Vergleich ein signifikant erhöhtes Allel direkt neben einem signifikant erniedrigten Allel lag und dadurch die Möglichkeit bestand, dass das Ergebnis durch eine falsche Zuordnung der Rohdaten zu dem einem oder anderem Allel verfälscht wurde. Es wurde deshalb beschlossen, ein Kontrollkollektiv aus dem Labor für diesen Mikrosatelliten zu typisieren. Es wurde hier dieselbe Allelverteilung wie in der Gruppe der RA-Patienten gefunden.

5.4 Der CD40-Ligand, seine Bedeutung bei Immunreaktionen und Hinweise auf eine Beteiligung bei der RA

Der CD40-Ligand (CD40L) ist ein Mitglied der TNF-Superfamilie bestehend aus unter anderem TNF α , Lymphotoxin α und β , dem Fas-Liganden und dem CD27-Liganden. Er ist ein Polypeptid aus 261 Aminosäuren mit extrazellulären, transmembranen und zytoplasmatischen Domänen kodiert auf dem X-Chromosom. Exprimiert wird CD40L vor allem auf aktivierten T_H-Zellen, des Weiteren auf T-Gedächtniszellen, Basophilen und Mastzellen, sowie auf Epithelzellen des Thymus (88). Sein Gegenstück, das CD40, wird auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen wie B-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert.

Durie et al. (89) zeigte in einem 1993 veröffentlichten in vivo Versuch an Mäusen, dass durch die Gabe hemmender CD40 Antikörper die Induktion einer Kollageninduzierten Arthritis verhindert werden konnte. Eine Korrelation zwischen dem klinischen Schweregrad und der Häufigkeit der CD40-CD40L Interaktion wurde in einer erst kürzlich veröffentlichten klinischen Studie postuliert (90).

Trifft eine infizierte antigenpräsentierende Zelle auf eine T_H-Helferzelle und kommt es zu einer Bindung über CD40 und CD40L so löst dies die verstärkte Expression von CD80 (B7.1) oder CD81 (B7.2) auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zelle aus. Beide Moleküle bewirken eine Kostimulation, die neben der MHC- und T-Zell-Rezeptorbindung für die Induktion der adaptiven Immunantwort notwendig ist. Diese Kostimulation ist ein Schutz vor dem Auslösen einer Autoimmunreaktion, da nur professionelle antigenbindende Zellen und

nur bestimmte Antigene in der Lage sind eine Kostimulation auszulösen und ihr Fehlen sogar zur Anergie oder Apoptose der gebundenen T-Zelle führt.

Des Weiteren spielt CD40L eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung von Makrophagen durch T_{H1} -Lymphozyten und B-Lymphozyten durch T_{H2} -Lymphozyten. Makrophagen benötigen neben der Stimulierung durch $IFN\gamma$ noch ein zusätzliches Signal zu ihrer Aktivierung. CD40L welches an CD40 auf der Oberfläche von Makrophagen bindet, liefert dieses zweite zusätzliche Signal, hinsichtlich der großen Schäden, die aktivierte Makrophagen mittels ihrer aggressiven Mediatoren anrichten können, ein sinnvoller Sicherheitsmechanismus. Membran-gebundenes $TNF\alpha$ und $LT\alpha$ können unter gewissen Umständen CD40L ersetzen. Versuche an Mäusen, bei denen das Gen für $IFN\gamma$ oder CD40L zerstört wurde, starben an sonst subletalen Dosen von Mykobakterien, weil die Aktivierung der zur Bekämpfung dieser intrazellulären Erreger notwendigen Makrophagen nicht gelang. In *in vitro* Studien wurde die CD40-CD40L vermittelte Freisetzung von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen u.a. $TNF\alpha$, Metalloproteinasen und Stickstoffmonoxid durch Makrophagen und Synovialfibroblasten bei Rheumatoider Arthritis nachgewiesen (91-93). Ebenso wurden kürzlich Hinweise auf eine über CD40L gesteuerte Beteiligung bei der Neovaskularisation entdeckt (94, 95).

Unerlässlich ist CD40L auf der Oberfläche von T_{H2} -Zellen zur Aktivierung von B-Lymphozyten. Nachdem eine bewaffnete T-Helferzelle mit einer antigentragenden B-Zelle in Kontakt getreten ist, führt dies zur Expression des CD40L auf der T-Zelle und zur Sekretion der B-Zellen stimulierenden Zytokine IL-4, IL-5 und IL-6, welche die klonale Expansion der B-Zelle einleiten. Mäuse und Menschen mit Mutationen, die CD40L betreffen, zeigen nur sehr schwache Antikörperantworten. Im Verlauf der klonalen Expansion werden diejenigen B-Zellen selektiert, die besonders spezifische antigenbindende Antikörper bilden. Während die niedrigaffinen B-Zellen absterben, proliferieren die hochaffinen und entwickeln sich entweder zu Plasmazellen oder zu B-Gedächtniszellen. Wie Experimente zeigten, scheint die CD40-CD40L-Bindung bei der Bildung von B-Gedächtniszellen notwendig zu sein. Kommt es nun zu einer Reinfektion mit dem gleichen Antigen, sind bereits hochaffine B-Zellen vorhanden, wodurch der Körper den Erreger besser und schneller bekämpfen kann. Diese und weitere B-Zellen unterliegen nun einer weiteren Selektion zu immer mehr spezialisierten B-Zellen, wobei der CD40-CD40L-Kontakt zwischen spezifischer B-Zelle und T-Zelle für die weitere Proliferation erforderlich ist. Kyburz et al (96) zeigten 1999 in einem Tiermodell die wichtige Bedeutung des CD40 bei der Bildung von Rheumafaktoren. Antagonisierende CD40-Antikörper unterbrachen die Rheumafaktorbildung, wohingegen aktivierende Antikörper (in zum Ausschluß anderer T-Zell vermittelter Faktoren) in T-Zell-geschwächten Mäusen zusammen mit dem Antigen die Rheumafaktorbildung auslösten.

Eine zusätzliche Funktion des CD40L entdeckte man beim X-gekoppelten lymphoproliferativen Immunschwächesyndrom, bei dem die Patienten hohe IGM-Spiegel jedoch kaum andere Antikörper-Isotypen aufweisen und vermehrt anfällig für Erreger wie *Pneumocystis carinii* sind. Diese Patienten sind nicht in der Lage Keimzentren zu bilden und die B-Zellen können keinen Isotypwechsel durchführen. Verantwortlich hierfür ist der defekte CD40L auf der T-Zelle. Die vermehrte Anfälligkeit für intrazelluläre Erreger läßt sich durch die bereits beschriebene fehlerhafte Aktivierung von Makrophagen durch T_{H1} -Zellen erklären. Auf Epithelzellen und antigenpräsentierenden Zellen des Thymus konnte CD40 nachgewiesen werden, was zu Spekulationen führte, dass es eventuell bei der negativen Selektion (Eliminierung) selbstreaktiver T-Zellen im Thymus eine Rolle spielen könnte (97). Während ihrer Reifung im Thymus unterliegen die T-Zellen einer positiven und einer negativen Selektion. Während bei der positiven Selektion alle Zellen überleben, die mit den exprimierten MHC im Thymus eine Bindung eingehen können (ca. 5% aller T-Zellen), werden bei der negativen Selektion alle überlebenden T-Zellen getötet, die eine Reaktion gegen endogene Antigene zeigen. Für die positive Selektion zeigen sich die kortikalen Thymusepithelzellen verantwortlich. Die negative Selektion kann unter Mithilfe verschiedener Zelltypen erfolgen, unter anderem dendriti-

schen Zellen und Makrophagen (97). Um die negative Selektion zu untersuchen, bediente man sich endogener viraler Superantigene, die z.B. von Zellen der Maus exprimiert werden, die mit dem Mammatumorvirus (MMTV) infiziert sind und in deren DNS die virale DNS integriert wurde. Diese Superantigene binden direkt außerhalb der eigentlichen Bindungsstellen an bestimmte $\nu\beta$ -Domänen des T-Zell-Rezeptors und einem MHC-Molekül der Klasse II der antigenpräsentierenden Zelle und sind in der Lage, injiziert in nicht befallene Mäuse, dort starke Immunreaktionen auszulösen. Die integrierte virale DNS wird von Mäusegeneration zu Mäusegeneration weitervererbt. Die bereits befallenen Mäuse zeigen keine Immunreaktion, da während der negativen Selektion alle T-Zellen eliminiert wurden, die die $\nu\beta$ -Domänen besaßen, an welche das jeweilige Superantigen binden kann. Es gibt Hinweise, dass der CD40L bei der negativen Selektion eine Rolle spielt. So konnte die Deletion von normalerweise eliminierten superantigenbindenden $\nu\beta$ -Domänen unter Gabe von antagonisierenden CD40L-Antikörpern verhindert werden (88). Es zeigt sich somit, dass es viele Möglichkeiten und Hinweise für eine Beteiligung des CD40-CD40L Komplex bei der Entstehung und Aufrechterhaltung autoreaktiver Reaktionen bei der rheumatoiden Arthritis gibt. Ein monoklonaler CD40L Antikörper zur Behandlung einer anderen Autoimmunerkrankung, des systemischen Lupus erythematodes, befindet sich bereits in der Erprobung (98).

5.5 Interleukin 1, neben TNF α herausragendes Zytokin bei der RA

Neben TNF α rückt zunehmend auch Interleukin 1 als pathogenetisch relevantes Zytokin ins Interesse der Forschung und neuer therapeutischer Entwicklungen. Interleukin 1 liegt beim Menschen in zwei Isoformen dem Interleukin 1 α und 1 β vor. Beide Formen unterscheiden sich beträchtlich in ihrer Aminosäuresequenz binden jedoch an die gleichen Rezeptoren, wenn gleich mit unterschiedlicher Affinität. Interleukin 1 wird von Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten und anderen gebildet. Während das IL-1 β hauptsächlich als löslicher Mediator vorliegt, kommt IL-1 α vor allem membrangebunden vor. Im Thymus ist IL-1 an der Reifung von T-Zellen beteiligt. Reife T-Zellen werden vom IL-1 zur Bildung weiterer Zytokine angeregt. IL-1 und TNF α induzieren die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, sowie die Freisetzung weiterer proinflammatorischer Zytokine aus Makrophagen und Monozyten. In der Leber bewirkt IL-1 die Bildung der Akut-Phase-Proteine. Bisher sind zwei IL-1-Rezeptoren bekannt, genannt IL-1 Rezeptor Typ I und II. Da über den IL-1 II-Rezeptor keine Signalweiterleitung zu erfolgen scheint, wird ihm durch kompetitive Hemmung eine schützende Funktion zugeschrieben, er wird deshalb auch als decoy (Lockvogel) Rezeptor bezeichnet (99). Exprimiert werden sie in einer Zahl von 500–5000 auf sehr vielen Zellen, hauptsächlich auf T-Zellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen und Chondrozyten. Ihre Expression auf Synovialzellen bei RA-Patienten wurde nachgewiesen (100). Die Wirkungen von Interleukin 1 und TNF α wurden in den letzten Jahren in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* sowie verschiedenen Tiermodellen untersucht, mit zum Teil auch widersprüchlichen Interpretationen. Übereinstimmung herrscht insofern, dass sowohl TNF α als auch IL-1 als die wesentlichen inflammatorischen Zytokine bei der RA gelten. Hohe Konzentrationen beider Zytokine konnten in der Synovia bei RA-Patienten festgestellt werden (101). Bei klinischen Studien am Menschen mit verschiedenen TNF α -Inhibitoren wurden übereinstimmend gute Ergebnisse erzielt. Über den Nutzen in Hinblick auf die voranschreitenden gelenkerstörenden Prozesse herrschen jedoch diverse Meinungen. TNF α wird eine Funktion bei der Kontrolle anderer inflammatorischer Zytokine hierunter auch IL-1 zugeschrieben, Ergebnisse die von anderer Seite zumindest in Frage

gestellt werden, ebenso die protektive Wirkung seiner Inhibitoren auf die Knorpelschädigung (102).

Als wesentlicher Faktor bei der Knorpelschädigung erscheint das Interleukin 1. Erhöhte Zytokinspiegel beider Isoformen konnten in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten nachgewiesen werden (103), wie auch ihre mRNS in Makrophagen an der Knorpel-Pannus Grenze (104). Erhöhte Spiegel des Zytokins schienen mit dem radiologisch und athroskopisch bestimmten Ausmaß der Knorpelschädigung zu korrelieren (102). In vivo Studien, bei denen TNF α und IL-1 in die Kniegelenke von Mäusen injiziert wurden, zeigten eine 100fache stärkere Proteoglykansynthesehemmung durch IL-1 im Vergleich zu TNF α , ohne wesentlichem Unterschied zwischen den beiden Isoformen (102). Transgene Mäusen mit erhöhter IL-1 α -Ausschüttung zeigten alle Zeichen einer destruierenden Arthritis (105). Bei transgenen Mäusen mit erhöhter TNF α -Aktivität konnte der destruktive Gelenkprozeß nach Gabe von Antikörpern gegen IL-1 zum Stillstand gebracht werden, ohne die TNF α -Spiegel zu senken (102). Bei Antigen-induzierter Arthritis konnte durch Gabe von IL-1 spezifischen Antikörpern oder durch Gentransfer des Interleukin-Rezeptorantagonisten (IL-1Ra) die Proteoglykansynthesehemmung der Chondrozyten aufgehoben werden (102), wobei die besten Ergebnisse durch Gabe von Antikörper gegen beide Isoformen erreicht wurden. Ähnliche Ergebnisse erhielt man auch bei Gabe von IL-1-Antikörpern bei Kollageninduzierter Arthritis, wobei wiederum die besten Ergebnisse durch Blockierung beider Isoformen erreicht wurden. Die Hemmung des IL-1 β zeigte sich jedoch bedeutend effizienter. Auch ließen sich deutliche Verbesserungen hinsichtlich des Knorpelschadens erreichen. IL-1 α scheint vor allem in der Anfangsphase eine Rolle zu spielen (102). In Versuchen mit durch Bakterien und Hefebestandteilen induzierten Gelenkentzündungen zeigten sich die destruktiven Eigenschaften des IL-1 durch Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt. NO hemmt in Versuchen die Entstehung von Knorpelmatrixmolekülen und verstärkte die Aktivität der Metalloproteinasen (106, 107). Darüber hinaus wurde die Synthese von IL-1Ra durch Chondrozyten vermindert (108). Ebenso konnte in diesem Modell die Proteoglykansynthesehemmung im frühem Stadium bei IL-1 β „knock out“ Mäusen durch zusätzl iche Gabe von IL-1 α -Antikörper vermindert werden. (102). Von anderer Seite wird eine Beteiligung von Onkogenen und die verminderte Expression Apoptose-induzierender Oberflächenmolekülen bei den Pathomechanismen der RA gemutmaßt. So finden sich an der Knorpel-Pannus-Grenze pleomorphe, transformiert erscheinende Zellen mit großen Zellkernen, abstammend von Fibroblasten (109). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Fibroblasten an der Knorpel-Pannus-Grenze fanden sich auffallend wenige Apoptose induzierende Oberflächenmoleküle (110, 111). Ihre Expression konnte in vitro Studien dosisabhängig durch IL-1 β gehemmt werden (112).

In klinischen Studie wurden kürzlich RA Patienten mit IL-1Ra behandelt. Hier war eine deutliche Linderung in Hinsicht der Gelenkschwellung, der Schmerzen, des Plasmaspiegels von C reaktiven Protein, der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit und des subjektiven Beschwerdebildes des Patienten nachweisbar (113). Außerdem zeigte es sich gut verträglich. In einer weiteren Studie konnten mittels radiologischer Methoden eine statistisch signifikante Verlangsamung der Gelenkzerstörung im Vergleich zu einer Placebogruppe festgestellt werden (114). Über eine Assoziation eines IL-1 α Promotorpolymorphismus bei der juvenilen rheumatoiden Arthritis (JRA) wurde berichtet (115). Ein Ergebnis, welches in einer weiteren Studie nicht bestätigt werden konnte (116). Eine Assoziation eines IL-1A-Polymorphismus zur RA konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden, wenn es auch Hinweise in erst kürzlich veröffentlichten Studien für eine Beziehung zum Schweregrad der RA gibt (117, 118). Auch der bisher kaum untersuchte Mikrosatellitenlocus im 5 Intron des IL-1A Gens zeigte in meinem Kollektiv keine Assoziation zur RA, eine Verbindung zum Schweregrad bliebe noch zu untersuchen.

6. Zusammenfassung

Eine polygene Ursache neben anderen Faktoren bei der Entstehung der Rheumatoiden Arthritis (RA) ist evident. In dieser Arbeit wurden polymorphe DNS-Marker in Kandidatengenen auf eine Assoziation mit der RA untersucht. Viele Studien haben eine Assoziation verschiedener Marker des HLA-Komplexes u.a. in der TNF-Region mit Suszeptibilität für RA und anderen Autoimmunerkrankungen nachgewiesen. $\text{TNF}\alpha$ und $\text{LT}\alpha$ (TNFB) sind wichtige proinflammatorische Zytokine. $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 wirken synergistisch beim Entzündungsprozess in RA. Verschiedene Allele wurden für $\text{TNF}\alpha$ und $\text{LT}\alpha$ nachgewiesen und individuelle Punktmutationen mit Unterschieden in der Genexpression korreliert. Es wurde postuliert, dass sie unabhängig von der „shared epitope“-Hypothese die Ausprägung des Krankheitsbildes der RA beeinflussen. Fünf DNS-Marker aus dieser Kandidatengenregion, der -308-TNF-Promotorpolymorphismus, zwei RFLP aus Intron 1 des $\text{LT}\alpha$ -Gens und zwei Mikrosatellitenmarker $\text{TNF}\alpha$ und $\text{TNF}\epsilon$, wurden in dieser Studie auf eine Assoziation mit RA bei 139 Patienten untersucht. Es wurde keine Assoziation mit Allelen der eng gekoppelten Marker gefunden. Daher ist es unwahrscheinlich, dass Allele von TNF und LTA zur Ausprägung der Erkrankung in der untersuchten Patientengruppe beitragen. Ein Einfluß auf den Schweregrad des Krankheitsbildes wurde nicht analysiert. Die Untersuchung des Mikrosatellitenmarkers im IL-1A-Gen ergab ebenfalls keine Auffälligkeiten in der Patientenkohorte.

Wechselwirkungen von antigenpräsentierenden Zellen und T-Lymphozyten in Synovialgewebe sollen bei dem chronischen Entzündungsprozeß eine Rolle spielen, dabei sind Interaktionen von kostimulatorischen Molekülen, z.B. CD40-CD40L essentiell für die optimale Zellaktivierung. Daher können auch kostimulatorische Signale bei der Auslösung und Verstärkung der Entzündungsreaktionen in der Synovia beteiligt sein. CD40L ist X-chromosomal kodiert. Eine Studie fand eine Häufung eines Allels des CD40L-Mikrosatelliten bei RA-Patienten. In der hier untersuchten Patientengruppe wurden keine Unterschiede in der Allelverteilung gefunden.

Die Untersuchung der Kandidatengene in Bezug auf ihren Beitrag zur Suszeptibilität für RA zeigte keine erhöhten Risiken für bestimmte Allelträger auf. Möglicherweise sind sie nur im Zusammenhang mit gewissen Umweltfaktoren an der Ätiopathogenese der RA beteiligt.

- (1) Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Cathy D, Farhan A, Ollier WE. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 1993; **32**: 903-7
- (2) Wordsworth P, Bell J. Polygenic susceptibility in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1991; **50**: 343-346
- (3) Stastny P. Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1976; **57**: 1148-57
- (4) Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. *Arthritis Rheum* 1987; **30**: 1205-13
- (5) Boki KA, Panayi GS, Vaugahn RW, Drosos AA, Moutsopoulos HM, Lanchbury JS. HLA class II sequence polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis in Greeks. The HLA-DR beta shared epitope hypothesis accounts for the disease only in a minority of Greek patients. *Arthritis Rheum* 1992; **35**: 746-55
- (6) Yelamos J, Garcia-Lozano JR, Moreno I, Aguilera I, Gonzalez MF, Garcia A, Nunez-Roldan A, Sanchez B. Association of HLA-DR4-Dw15 (DRB1*0405) and DR10 with rheumatoid arthritis in Spanish population. *Arthritis Rheum* 1993; **36**: 811-4
- (7) De Vries N, Ronningen KS, Tilanus MG, Bouwens- Rombouts A, Segal R, Egeland T, Thorsby E, van de Putte LB, Brantbar C. HLA-DR1 and rheumatoid arthritis in Israeli Jews: sequencing reveals that DRB1*0102 is the predominant HLA-DR1 subtype. *Tissue Antigens* 1993; **41**: 26-30
- (8) De Juan MD, Belmonte I, Barado J, Martinez Laso J, Figueroa M, Arnaiz-Villena A, Cuadrado E. Differential associations of HLA-DR antigens with rheumatoid arthritis (RA) in Basques: high frequency of DR1 and DR10 and lack of association with HLA-DR4 or any of its subtypes. *Tissue Antigens* 1994; **43**: 320-3
- (9) Wilkens RF, Nepom GT, Marks CR, Nettles JW, Nepom BS. Association of HLA -Dw16 with rheumatoid arthritis in Yakima Indians. Further evidence for the shared epitope hypothesis. *Arthritis Rheum* 1991; **34**: 43-7
- (10) Castro F, Angulo J, Acevedo E, Quispe E, Perich R, de San Marcos UM. [Fenotipo clase II del complejo mayor de histocompatibilidad en artritis reumatoide: primer reporte en pacientes peruanos] Type II major histocompatibility complex phenotypes in rheumatoid arthritis: first report in Peruvian patients. *Bol Asoc Peruana Rheum* 1994; **13**: 14
- (11) Watanabe Y, Tokunaga K, Matsuki K, Takeuchi F, Matsuta K, Maeda H, Omoto K, Juji T. Putative amino acid sequence of HLA-DRB chain contributing to rheumatoid arthritis susceptibility. *J Exp Med* 1989; **169**: 2263-8
- (12) Gomolka M, Menninger H, Sall JE, Lemmel EM, Albert ED, Niwa O, Epplen JT, Epplen C. Immunoprinting: various genes are associated with increased risk to develop rheumatoid arthritis in different groups of adult patients. *J Mol Med* 1995; **73**: 19-29
- (13) Feldmann M, Brennan FB, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 1996; **14**: 397-440
- (14) Mc Daniel O, Alarcon GS, Pratt PW, Reveille JD. Most African-American patients with rheumatoid arthritis do not have the rheumatic antigenic determinant (epitope). *Ann Intern Med* 1995; **123**: 181-187
- (15) Wolpe SD, Sherry B, Juers D, Davatelis G, Yurt RW, Cerami A. Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 612-16
- (16) Vincenti MP, Clark IM, Brinckerhoff CE. Using inhibitors of metalloproteinases to treat arthritis. *Arthritis Rheum* 1994; **37**: 115-26
- (17) Saklatavala J, Sarsfield SJ, Townsend Y. Purification of two immunologically different leukocyte proteins that cause cartilage resorption, lymphocyte activation and fever. *J Exp Med* 1985; **162**: 1208-15
- (18) Dayer JM, Beutler B, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 1985; **162**: 2163-68
- (19) Dayer JM, de Rochemonteix B, Burrus B, Semczuk S, Dinarello CA. Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 1986; **77**: 645-48
- (20) Thomas BM, Mundy GR, Chambers TJ. Tumor necrosis factor α and β induce osteoblastic cells to stimulate osteoclast bone resorption. *J Immunol* 1987; **138**: 775-80
- (21) Quayle AJ, Chomarar P, Miossec P, Kjeldsen-Kragh J, Forre O, Natvig JB. Rheumatoid inflammatory T-cell clones express mostly TH1 but also TH2 and mixed (TH0-like) cytokine patterns. *J Immunol* 1993; **38**: 75-82
- (22) Arend WP & Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; **38**: 151-160

- (23) Lacraz S, Isler P, Vey E, Welgus HG, Dayer JM. Direct contact between T lymphocytes and monocytes is a major pathway for induction of metalloproteinase expression. *J Biol Chem* 1994; **269**: 22027-22033
- (24) Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Koulas G. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 1991; **10**: 4025-31
- (25) Peacock DJ, Banquerigo ML, Brahn E. Angiogenesis inhibition suppresses collagen arthritis. *J Exp Med* 1992; **175**: 1135-38
- (26) Oliver SJ, Banquerigo ML, Brahn E. Suppression of collagen-induced arthritis using an angiogenesis inhibitor, AGM-1470, and a microtubule stabilizer, taxol. *Cell Immunol* 1994; **157**: 291-99
- (27) Allen JB, Manthey CL, Hand AR, Ohura K, Ellingsworth L, Wahl SM. Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor β . *J Exp Med* 1990; **171**: 231-47
- (28) Fava RA, Olsen NJ, Postlethwaite AE, Broadley KN, Davidson JM, Nanney LB, Lucas C, Townes AS. Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF- β driven synovial inflammation and hyperplasia. *J Exp Med* 1991; **173**: 1121-32
- (29) Brandes ME, Allen JB, Ogawa Y, Wahl SM. Transforming growth factor β 1 suppresses acute and chronic arthritis in experimental animals. *J Clin Invest* 1991; **87**: 1108-13
- (30) Kuruvilla AP, Shah R, Hochwald GM, Liggit HD, Palladino MA, Thorbecke GJ. Protective effect of transforming growth factor β 1 on experimental autoimmune diseases in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 2918-21
- (31) Wahl SM, Hunt DA, Wakefield IM, McCartney, Francis N, Wahl IM, Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor- β (TGF β) induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 5788-92
- (32) Lafyatis R, Thomson NL, Remmers ER, Flanders KC, Roche NS, Kim SJ. Transforming growth factor- β production by synovial tissues from rheumatoid patients and streptococcal cell wall arthritis rats. Studies on secretion by synovial fibroblast-like cells and immunohistological localisation. *J Immunol* 1989; **143**: 1142-48
- (33) Arnett F, Edworthy S, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS et al. The American rheumatism association 1987 revised classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; **31**: 315-324
- (34) Messer G. Allelische Unterschiede des Tumornekrosefaktorlocus: Untersuchungen über Regulation der Expression von TNF- β , Dissertation 1991, LMU München
- (35) Brinkmann BMN, Huizinga TWJ, Kurban SS, Van der Velde EA, Schreuder GMTH, Hazes JMW, Breedveld FC, Verweij CL. Tumour necrosis factor α gene polymorphisms in Rheumatoid Arthritis: Association with susceptibility to, or severity of, disease? *Br J Rheumatol* 1997; **36**: 516-21
- (36) Gomolka DM. "Immunoprints" Polymorphismen immunrelevanter Gene zur Identifizierung genetischer Prädispositionen bei der Rheumatoiden Arthritis. Dissertation 1994, LMU München
- (37) Pociot F, Mølviig J, Wogensen L, Worsaae H, Dalbøge H, Baek L, Nerup J. A tumour necrosis factor beta gene polymorphism in relation to monokine secretion and insulin -dependent diabetes mellitus. *Scand J Immunol* 1991; **33**: 37-49
- (38) Webb GC, Chaplin DD. Genetic variability at the human tumor necrosis factor loci. *J Immunol* 1990; **145**: 1278
- (39) Ferencik S, Lindemann M, Horsthemke B, Grosse-Wilde H. A new restriction fragment length polymorphism of the human TNF- β gene detected by AspHI digest. *Eur J Immunogenet* 1992; **19**: 425-430
- (40) Zipp F, Weber F, Huber S, Sotgiu S, Czlonkowska A, Holler E, Albert E, Weiss EH, Wekerle H, Hohlfeld R. Genetic control of multiple sclerosis: increased production of lymphotoxin and tumor necrosis factor-alpha by HLA-DR2+ T cells. *Ann Neurol* 1995; **38**: 723-30
- (41) Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AIF, Duff GW. Single base polymorphism in the human Tumour Necrosis Factor alpha (TNF α) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992; **1**: 353
- (42) Nedospasov SA, Udalova IA, Dmitry VK, Turetskaya RL. DNA sequence polymorphism at the human tumor necrosis factor (TNF) locus. *J Immunol* 1991; **147**: 1053-1059
- (43) Allen RC, Spriggs MK, Belmont JW. Dinucleotide repeat polymorphism in the human CD40 ligand gene. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 828
- (44) Epplen C, Frank G, Gomolka M, Albert M, Albert E, Nurnberg P, Epplen JT. Dinucleotide repeat polymorphism in the human IL1A gene. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 1710
- (45) Szekanecz Z, Koch AE, Kunkel SL, Strieter RM. Cytokines in rheumatoid arthritis. *Drugs Aging* 1998; **12**: 377-90

- (46) Saklatvala J, Sarsfield SJ, Townsend Y. Purification of two immunologically different leucocyte proteins that cause cartilage resorption, lymphocyte activation and fever. *J Exp Med* 1985; **162**: 1208-15
- (47) Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladino MA, O'Connor JV. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med* 1986; **163**: 1433-50
- (48) Dayer JM, de Rochemonteix B, Burrus B, Semczuk S, Dinarello CA. Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 1986; **77**: 645-48
- (49) Fenner H. TNF-Inhibitoren: Eine neue therapeutische Perspektive bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen in der Rheumatologie? *Z Rheumatol* 1995; **54**: 158-164
- (50) Paleolog EM, Young S, Stark AC, McCloskey RV, Feldmann M, Maini RN. Reduction of angiogenic vascular endothelial growth factor following treatment of rheumatoid arthritis with anti-TNF α antibody. *Arthritis Rheum* 1998; **41**: 1258-65
- (51) Saklatvala J. Tumor necrosis factor α stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature* 1986; **322**: 547-549
- (52) Goldring S, Gravallese EM. Pathogenesis of bone resorption in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2000; **12**: 195-199
- (53) Haworth C, Brennan FM, Chantry D, Turner M, Maini RN, Feldmann M. Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor- α . *Eur J Immunol* 1991; **21**: 2575-79
- (54) Butler DM, Maini RN, Feldmann M, Brennan FM. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF - α antibody with the interleukin-1 receptor antagonist. *Eur Cytokine Netw* 1995; **6**: 225-30
- (55) Kowanko IC, Ferrante AF. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor augments neutrophil-mediated cartilage degradation and neutrophil adherence. *Arthritis Rheum* 1991; **11**: 1452-60
- (56) Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; **28**: 315-23
- (57) Roodman GD. Interleukin-6: an osteotropic factor? *J Bone Miner Res* 1992; **7**: 475-78
- (58) Thorbecke GJ, Shah R, Leu CH, Kuruvilla AP, Hardison AM, Palladino MA. Involvement of endogenous tumour necrosis factor α and transforming growth factor β during induction of collagen type II in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 7375-79
- (59) Piguet PF, Grau GE, Vesin C, Loetscher H, Gentz R, Lesslauer W. Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumor necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor. *Immunology* 1992; **77**: 510-14
- (60) Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 9784-88
- (61) Wooley PH, Dutcher J, Widmer MB, Gillis S. Influence of a recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor FC fusion protein on type II collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol* 1993; **151**: 6602-7
- (62) Williams RO, Ghrayeb J, Feldmann M, Maini RN. Successful therapy of collagen-induced arthritis with TNF receptor-IgG fusion protein and combination with anti-CD4. *Immunology* 1995; **84**: 433-39
- (63) Wooley PH, Whalen JD, Chapman DL, Berger AE, Richard KA, Aspar DG, Staite ND. The effect of an interleukin-1 receptor antagonist protein on type II collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 1993; **36**: 1305-14
- (64) Van den Berg WB, Joosten LAB, Helsen M, Van den Loo FA. Amelioration of established murine collagen-induced arthritis with anti-IL-1 treatment. *Clin Exp Immunol* 1994; **95**: 237-43
- (65) Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, Mölvig J, Worsaae H, Abbal M, Thomsen M, Nerup J., Cambon-Thomsen A. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF- α and TNF- β by human mononuclear cells: a possible link to insulin-independent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 224-231
- (66) Bendtzen K, Morling N, Fomsgaard A, Svenson M, Jakobsen B, Ødum N, Svejgaard A. Association between HLA-DR2 and production of tumor necrosis factor α and Interleukin 1 by mononuclear cells activated by lipopolysaccharide. *Scand J Immunol* 1988; **28**: 599-606
- (67) Jacob CO, Fronck Z, Lewis GD, Koo M, Hansen JA, McDevitt HO. Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor α : Relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 1233-1237

- (68) McManus R, Moloney M, Borton M, Finch A, Chuan YT, Lawlor E, Weir DG, Kelleher D. Association of celiac disease with microsatellite polymorphisms close to the tumor necrosis factor genes. *Hum Immunol* 1996; **45**: 24-31
- (69) Hajeer AH, Worthington J, Silman AJ, Ollier WER. Association of tumor necrosis factor microsatellite polymorphisms with HLA-DRB1*04-bearing haplotypes in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 1996; **39**: 1109-1114
- (70) Hajeer A, John S, Ollier WER, Silman AJ, Dawes P, Hassell A, Matthey D, Fryer A, Strange R, Worthington J. Tumor necrosis factor microsatellite haplotypes are different in male and female patients with RA. *J Rheumatol* 1997; **24**: 217-9
- (71) Perdriger A, Chalès G, Alizadeh M, Semana G. Tumor necrosis factor a microsatellite polymorphism in rheumatoid arthritis: comment on the article by Hajeer et al. *Arthritis Rheum* 1997; **40**: 1368-69
- (72) Field M, Gallagher G, Eskdale J, McGarry F, Richards SD, Munro R, Oh HH, Campbell C. Tumor necrosis factor locus polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1997; **50**: 303-307
- (73) Whichelow CE, Hitman GA, Raafat I, Bottazzo GF, Sachs JA. The effect of TNF* β gene polymorphism on TNF-alpha and -beta secretion levels in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and healthy controls. *Eur J Immunogenet* 1996; **23**: 425-35
- (74) Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Cates M, Convit J, Blackwell JM. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 1995; **182**: 1259-1264
- (75) Castes M, Trujillo D, Rojas ME, Fernandez CT, Araya L, Cabrera M, Blackwell J, Convit J. Serum levels of tumor necrosis factor in patient with American cutaneous leishmaniasis. *Biol Res* 1993; **26**: 233-238
- (76) Fugger L, Morling N, Ryder LP, Georgesen J, Jakobsen BK, Svejgaard A, Andersen V, Oxholm P, Pedersen FK, Friis J, Halberg P. NcoI restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the tumor necrosis factor (TNF α) region in four autoimmune diseases. *Tissue Antigen* 1989; **34**: 17-22
- (77) Bettinotti MP, Hartung K, Deicher H, Messer G, Keller E, Weiss EH, Albert ED. Polymorphism of the tumor necrosis factor beta gene in systemic lupus erythematosus: TNF β -MHC haplotypes. *Immunogenetics* 1993; **37**: 449-454
- (78) Campell DA, Nelson S, Madhok R, Field M, Gallagher G. TNF Nco-I RFLP is not an independent risk factor in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunogenet* 1994; **21**: 461-467
- (79) Vinasco J, Beraun Y, Nieto A, Mataran L, Pareja E, Martin J. Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1997; **49**: 74-78
- (80) McGuire W, Hill AVS, Allsopp CEM, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF- α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994; **371**: 508-511
- (81) Kern P, Hemmer CJ, Van Damme J, Gruss HJ, Dietrich M. Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for complicated Plasmodium falciparum malaria. *Am J Med* 1989; **87**: 139-43
- (82) Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, Cerami A, Brewster DR, Greenwood BM. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. *Lancet* 1990; **336**: 1201-4
- (83) Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, Wirima JJ, Vassalli P, Hommel M, Lambert PH. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *N Eng J Med* 1989; **320**: 1586-91
- (84) Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, di Giovine FS, Duff GW. Effects of a tumor necrosis factor (TNF α) promoter base transition on transcriptional activity. *Br J Rheumatol* 1994; **33** (suppl.1): 89
- (85) Wilson AG, Gordon C, di Giovine FS, de Vries N, van de Putte LBA, Emery P, Duff GW. A genetic association between systemic lupus erythematosus and tumor necrosis factor alpha. *Eur J Immunol* 1994; **24**: 191-195
- (86) Danis VA, Millington M, Hyland V, Lawford R, Huang Q, Grennan D. Increased frequency of the uncommon allele of a tumour necrosis factor alpha gene polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Dis Markers* 1994; **12**: 127-33
- (87) Wilson AG, de Vries N, van de Putte LBA, Duff GW. A tumour necrosis factor α polymorphism is not associated with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1995; **54**: 601-603
- (88) Foy TM, Page DM, Waldschmidt TJ, Schoneveld A, Laman JD, Masters SR, Tygrett L, Ledbetter JA, Aruffo A, Claassen E, Xu JC, Flavell RA, Oehen S, Hedrick SM, Noelle RJ. An essential role for gp39, the ligand for CD40, in thymic selection. *J Exp Med* 1995; **182**: 1377-1388
- (89) Durie FH, Fava RA, Foy TM, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody gp39, the ligand for CD40. *Science* 1993; **261**: 1328-30
- (90) Tellander AC, Michaëlsson E, Brunmark C, Andersson M. Potent adjuvant effect by Anti-CD40 in collagen-induced arthritis. Enhanced disease is accompanied by increased production of collagen type-II reactive IgG2a and IFN- γ . *J Autoimmun* 2000; **14**: 295-302
- (91) Van Kooten, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 2000; **67**: 2-17

-
- (92) Kitagawa M, Mitsui H, Nakamura H, Yoshino S, Miyakawa S, Ochiai N, Onoburi M, Suzuki H, Sumida T. Differential regulation of rheumatoid synovial cell interleukin-12 production by tumor necrosis factor α and CD40 signals. *Arthritis Rheum* 1999; **42**: 1917-26
- (93) Harigai M, Hara M, Nakazawa S, Fukasawa C, Ohta S, Sugiura T, Inoue K, Kashiwazaki S. Ligation of CD40 induced tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a novel mechanism of activation of synoviocytes. *J Rheumatol* 1999; **26**: 1035-43
- (94) Cho CS, Cho ML, Min SY, Kim WU, Min DJ, Lee SS, Park SH, Choe J, Kim HY. CD40 engagement on synovial fibroblast up-regulates production of vascular endothelial growth factor. *J Immunol* 2000; **164**: 5055-61
- (95) Mach F, Schonbeck U, Fabunmi RP, Murphy C, Atkinson E, Bonnefoy JY, Graber P, Libby P. T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism: implications for tubule formation. *Ann J Pathol* 1999; **154**: 229-38
- (96) Kyburz P, Corr M, Brinson DC, Von Damm A, Tighe H, Carson DA. Human rheumatoid factor production is dependent on CD40 signalling and auto antigen. *J Immunol* 1999; **163**: 3116-3122
- (97) Galy AHM, Spits H. CD40 is functionally expressed on human thymic epithelium. *J Immunol* 1992; **149**: 775-782
- (98) Simon LS, Yocum D. New and future drug therapies for rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2000; **39 (suppl.1)**: 36-42
- (99) Bessis N, Guery L, Mantovani A, Vecchi A, Sims JE, Fradelizi D, Boissier MC. The type II decoy receptor of IL-1 inhibits murine collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol* 2000; **30**: 867-75
- (100) Chin J, Rupp E, Cameron PM, MacNaul KL, Lotke PA, Tocci MJ, Schmidt JA, Bayne EK. Identification of a high-affinity receptor for interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta on cultured human rheumatoid synovial cells. *J Clin Invest* 1988; **82**: 420-6
- (101) Feldmann M, Maini RN. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 1999; **38 (suppl.2)**: 3-7
- (102) Van den Berg WB, Bresnihan B. Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis: evidence of a dominant role for interleukin-1. *Baillieres Clin Rheumatol* 1999; **13**: 577-597
- (103) Hopkins SJ, Humphreys M, Jason MIV. Cytokines in synovial fluid I. The presence of biologically active and immunoreactive IL-1. *Clin Exp Immunol* 1988;**72**:422-427
- (104) Chu CQ, Field M, Allard S et al. Detection of cytokines at the cartilage/pannus junction in patients with rheumatoid arthritis: implications for the role of cytokines in cartilage destruction and repair. *Br J Rheumatol* 1992; **31**: 653-661
- (105) Probert L, Plows D, Kontogeorges G, Kollias G. The type I IL-1 receptor acts in series with tumor necrosis factor (TNF) to induce arthritis in a TNF-transgenic mice. *Eur J Immunol* 1995; **25**: 1794-1797
- (106) Taskiran D, Stefanovic-Racic M, Georgescu HI, Evans CH. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **200**: 142-8
- (107) Murrell GAC, Jang D, Williams RJ. Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **206**: 15-21
- (108) Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Tardif G, Martel-Pelletier J. The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1Ra synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation. *Osteoarthritis Cart* 1996; **4**: 77-84
- (109) Fassbender HG. Histomorphological basis of articular cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Coll Relat Res* 1983; **3**: 141-55
- (110) Matsumoto S, Müller-Ladner U, Gay RE, Nishioka K, Gay S. Ultra structural demonstration of apoptosis, Fas and Bcl-2 expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *J Rheumatol* 1996; **23**: 1345-52
- (111) Sugiyama M, Tsukazaki T, Yonekura A, Matsuzaki S, Yamashita S, Iwasaki K. Localisation of apoptosis related proteins in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1996; **55**: 442-9
- (112) Tsuboi M, Eguchi K, Kawakami A, Matsuoka N, Kawabe Y, Hoyagi T, Maeda K, Nagataki S. Fas antigen expression on synovial cells was down-regulated by interleukin-1 β . *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **218**: 280-5
- (113) Bresnihan B, Alvaro-Garcia JM, Cobby M, Doherty M, Domljan Z, Emery P, Nuki G, Pavelka K, Rau R, Rozman B, Watt I, Williams B, Aitchison R, Malabe P, Musirc P. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 1998; **41**: 2196-204
- (114) Jiang Y, Genant HK, Watt I, Cobby M, Bresnihan B, Aitchison R, McCabe D. A multicenter, double-blind, dose-ranging randomised, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis: radiologic progression and correlation of Genant and Larsen scores. *Arthritis Rheum* 2000; **43**: 1001-9

-
- (115) McDowell TL, Symons JA, Ploski R, Forre O, Duff GW. A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin-1 α polymorphism. *Arthritis Rheum* 1995; **38**: 221-8
- (116) Donn RP, Farhan AJ, Barrett JH, Thomson W, Worthington J, Ollier WER. Absence of association between interleukin 1 alpha and oligoarticular juvenile chronic arthritis in UK patients. *Rheumatology (Oxford)* 1999; **38**: 171-5
- (117) Jouvenne P, Chaudhary A, Buchs N, di Giovine FS, Duff GW, Miossec P. Possible genetic association between interleukin-1 α gene polymorphism and the severity of chronic polyarthritis. *Eur Cytokine Netw* 1999; **10**: 33-6
- (118) Cox A, Camp NJ, Cannings C, di Giovine FS, Dale M, Worthington J, John S, Ollier WER, Silman AJ, Duff GW. Combined sib-TDT and TDT provide evidence for linkage of the interleukin-1 gene cluster to erosive rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet* 1999; **8**: 1707-13

III. Anhang**Kontrollen Mikrosatelliten**

Allelfrequenzen			
Locus	Allellänge (bp)	Frauen	Männer
CD40L		N (126)	N (23)
	132	2	
	130	12	1
	128	7	3
	126	14	1
	124	51	14
	122	15	2
	120	13	2
	118	9	
	114	2	
	110	1	
TNFa		N (236)	N (180)
	119	6	11
	117		2
	115	41	25
	113	30	21
	111	6	5
	109	1	
	107	23	18
	105	25	23
	103	11	18
	101	16	5
	99	5	5
	97	69	40
	95	2	7
	93	1	
IL-1A		N (214)	N (174)
	179	1	
	175	2	
	173	5	2
	171	6	9
	169	42	42
	167	11	6
	165	68	51
	163	77	64
	161	2	
TNFc	Allellänge	N (350)	
	159	251	
	161	99	

Kontrollen Restriktionslängenpolymorphismen**Genotypfrequenzen**

NcoI RFLP LTA	N = 179
TNFB*1	20
TNFB*2	81
TNFB1/2	78
AspH I RFLP LTA	N = 128
AspHI+	16
AspHI-	56
AspHI+-	56
NcoI RFLP TNFA	N = 116
TNF 1	66
TNF2	5
TNF1/2	45

Patientenkollektiv (N = 139)

Haplotypen

Patient	Chromosom	Geschlecht	TNF α	CD40L	TNFC	IL1A	Nco I β	AspH I β	Nco I α
probe 1	1	1	113	118	159	163	2	1	1
probe 1	2	1	113	118	159	169	2	2	1
probe 2	1	2	97	120	159	161	1	2	1
probe 2	2	2	105		161	167	2	2	1
probe 3	1	1	97		159	163	1	2	1
probe 3	2	1	101		161	163	2	2	2
probe 4	1	1	97	130	159	165	2	1	1
probe 4	2	1	97	130	161	169	2	2	1
probe 5	1	1	107	124	159	163	1	1	1
probe 5	2	1	107	126	159	165	2	2	1
probe 6	1	1	97	126	159	171	1	1	1
probe 6	2	1	115	126	159	175	2	2	2
probe 7	1	1	97	124	159	171	1	1	1
probe 7	2	1	115	124	159	175	2	2	2
probe 8	1	1	115	124	159	163	2	1	1
probe 8	2	1	115	124	159	169	2	2	1
probe 9	1	1	97	124	159	163	1	2	2
probe 9	2	1	97	124	159	169	1	2	2
probe 10	1	1	97	122	161	161	2	2	1
probe 10	2	1	97	134	161	167	2	2	1
probe 11	1	1	97	124	159	163	2	2	1
probe 11	2	1	115	124	161	163	2	2	1
probe 12	1	2	89		159	163	2	1	1
probe 12	2	2	89		159	169	2	1	1
probe 13	1	1	97	124	159	163	1	1	2
probe 13	2	1	115	126	159	165	2	2	2
probe 14	1	1	97	126	159	165	2	1	1
probe 14	2	1	97	126	159	169	2	2	2
probe 15	1	1	97	122	159	165	2	1	1
probe 15	2	1	115	130	161	165	2	2	1
probe 16	1	1	101	118	159	163	1	2	1
probe 16	2	1	101	122	159	165	1	2	1
probe 17	1	2		126	159	165	1	1	1
probe 17	2	2			159	167	2	2	1
probe 18	1	1	113	124	159	163	2	1	1
probe 18	2	1	113	124	159	163	2	1	1
probe 19	1	1	101	124	159	165	1	2	1
probe 19	2	1	105	132	159	169	1	2	1
probe 20	1	1	97	124	159	163	1	1	2
probe 20	2	1	113	124	159	165	2	2	2
probe 21	1	2	113	124	159	165	2	1	1
probe 21	2	2	117		159	169	2	1	1
probe 22	1	2	97	124	159	163	1	2	2
probe 22	2	2	97		159	165	2	2	2
probe 23	1	1	97	124	159	163	1	1	2
probe 23	2	1	115	130	159	163	2	2	2

Patient	Chromosom	Geschlecht	TNF α	CD40L	TNF ϵ	IL1A	NcoI β	AspH I β	NcoI α
probe 24	1	1	97		161	169	2	2	1
probe 24	2	1	105		161	169	2	2	1
probe 25	1	1	97	126	159	169	1	2	1
probe 25	2	1	105	128	159	169	1	2	2
probe 26	1	1	113	118	159	163	2	1	1
probe 26	2	1	113	124	159	163	2	1	1
probe 27	1	1	107	124	159	165	1	1	1
probe 27	2	1	107	130	159	169	2	2	1
probe 28	1	1		126	159	165	1	2	2
probe 28	2	1		126	159	169	2	2	2
probe 29	1	2	97	126	159	165	1	1	1
probe 29	2	2	113		159	169	2	2	2
probe 30	1	1	115	124	159	163	2	1	1
probe 30	2	1	115	128	159	169	2	1	1
probe 31	1	1	103	124	159	163	1	2	1
probe 31	2	1	109	126	161	163	2	2	1
probe 32	1	1	103	124	159	163	1	2	1
probe 32	2	1	107	122	161	169	2	2	1
probe 33	1	1	101	126	159	163	1	2	1
probe 33	2	1	105	126	161	169	2	2	1
probe 34	1	1	97	126	159	163	2	1	1
probe 34	2	1	119	126	161	165	2	2	1
probe 35	1	2	97	130		159	1	2	1
probe 35	2	2	101			167	2	2	1
probe 36	1	1	101	118	159	163	1	2	1
probe 36	2	1	111	124	159	165	1	2	1
probe 37	1	1	101	124	159	165	1	1	1
probe 37	2	1	111	124	159	167	2	2	1
probe 38	1	1	95	120	159	165	1	1	1
probe 38	2	1	111	122	159	165	2	2	2
probe 39	1	1	97	130	159	163	2	1	1
probe 39	2	1	109	130	161	165	2	2	2
probe 40	1	1	103	120	159	163	1	2	1
probe 40	2	1	103	124	161	169	2	2	1
probe 41	1	2	105	124	159	163	1	1	1
probe 41	2	2	113		159	169	2	2	1
probe 42	1	2	101	124	161	165	2	2	1
probe 42	2	2	111		161	169	2	2	1
probe 43	1	1	97	120	159	163	2	1	1
probe 43	2	1	111	124	161	165	2	2	1
probe 44	1	1	95	126	159	165	1	2	1
probe 44	2	1	101	126	161	169	2	2	1
probe 45	1	1	103	118	159	165	1	2	1
probe 45	2	1	111	128	161	165	2	2	2
probe 46	1	2	101	118	159	163	1	1	1
probe 46	2	2	117		159	169	2	2	2
probe 47	1	1	101	120	159	165	1	1	1
probe 47	2	1	113	126	159	169	2	2	2
probe 48	1	1	103	124	159	163	2	1	1
probe 48	2	1	113	124	161	169	2	2	1

Patient	Chromosom	Geschlecht	TNF α	CD40L	TNF ϵ	IL1A	NcoI β	AspH I β	NcoI α
probe 49	1	1	97	128	161	163	2	2	1
probe 49	2	1	97	128	161	163	2	2	1
probe 50	1	2	101	124	159	167	1	2	1
probe 50	2	2	105		159	169	1	2	2
probe 51	1	1	95	120	159	163	1	2	1
probe 51	2	1	99	124	161	167	2	2	1
probe 52	1	1	95	124	161	163	2	2	1
probe 52	2	1	95	124	161	163	2	2	1
probe 53	1	1	103	118	159	165	1	1	1
probe 53	2	1	113	118	159	165	2	2	1
probe 54	1	1	95	118	161	169	2	2	1
probe 54	2	1	95	126	161	171	2	2	1
probe 55	1	2	99	120	159	165	1	1	1
probe 55	2	2	111		159	165	2	2	2
probe 56	1	2	111	124	159	169	2	2	1
probe 56	2	2	111		159	169	2	2	1
probe 57	1	2	95	120	161	167	2	2	1
probe 57	2	2	101		161	169	2	2	1
probe 58	1	1	103	124	159	169	1	1	1
probe 58	2	1	113	130	159	169	2	2	1
probe 59	1	1	95	124	159	163	1	2	1
probe 59	2	1	103	130	159	167	1	2	2
probe 60	1	1	97	128	159	165	2	1	1
probe 60	2	1	105	128	159	165	2	1	1
probe 61	1	2	95	122	159	165	1	2	1
probe 61	2	2	101		161	167	2	2	2
probe 62	1	2	111	122	159	163	2	1	1
probe 62	2	2	111		159	163	2	1	1
probe 63	1	1	113	124	159	169	2	1	1
probe 63	2	1	113	130	159	169	2	1	1
probe 64	1	1	95	130	161	163	2	2	1
probe 64	2	1	95	130	161	167	2	2	1
probe 65	1	2	95	124	159	163	1	2	1
probe 65	2	2	103		161	163	2	2	1
probe 66	1	1	95	124	159	163	1	1	1
probe 66	2	1	105	128	161	165	2	2	2
probe 67	1	1	95	124	159	163	1	2	1
probe 67	2	1	103	124	161	169	2	2	1
probe 68	1	1	95	122	159	163	1	2	1
probe 68	2	1	103	122	161	165	2	2	1
probe 69	1	2	97	136	161	163	2	2	1
probe 69	2	2	111		161	167	2	2	1
probe 70	1		97	120	159	165	1	1	1
probe 70	2		113	120	159	169	2	2	2
probe 71	1	1	103	120	159	165	1	1	1
probe 71	2	1	111	122	159	169	2	2	1
probe 72	1	1	107	120	159	163	2	1	1
probe 72	2	1	113	124	161	165	2	1	1
probe 73	1		97	120	159	161	1	2	1
probe 73	2		97	130	161	171	2	2	2

Patient	Chromosom	Geschlecht	TNF α	CD40L	TNF ϵ	IL1A	NcoI β	AspH I β	NcoI α
probe 74	1	2	101	124	159	165	1	1	1
probe 74	2	2	105		159	169	2	2	2
probe 75	1	1	105	124	159	165	1	1	1
probe 75	2	1	113	124	159	169	2	2	1
probe 76	1	1	103	124	159	163	1	1	1
probe 76	2	1	113	124	161	169	2	2	1
probe 77	1	1	97	124	159	167	1	1	1
probe 77	2	1	111	124	159	169	2	2	2
probe 78	1		105	124	159	163	2	1	1
probe 78	2		117	124	161	165	2	1	1
probe 79	1	1	97	124	159	165	2	1	1
probe 79	2	1	113	130	161	169	2	2	1
probe 80	1	2	101	124	159	163	1	2	1
probe 80	2	2	105		159	171	1	2	1
probe 81	1	1	103	120	159	165	1	1	1
probe 81	2	1	113	124	159	165	2	2	1
probe 82	1	1	105	122	159	165	2	1	1
probe 82	2	1	111	128	159	165	2	1	1
probe 83	1	1	97	124	161	163	2	2	1
probe 83	2	1	97	124	161	171	2	2	1
probe 84	1	2	97	124	159	165	1	1	1
probe 84	2	2	105		159	169	2	2	2
probe 85	1	1	97	124	159	161	2	1	1
probe 85	2	1	117	132	161	163	2	2	1
probe 86	1	1	105	110	159	169	2	1	1
probe 86	2	1	113	130	159	169	2	1	1
probe 87	1	2	97	124	159	163	2	1	1
probe 87	2	2	113		161	165	2	2	1
probe 88	1	1	97	122	159	163	1	1	1
probe 88	2	1	113	124	159	165	2	2	2
probe 89	1	1	97	124	161	161	1	2	1
probe 89	2	1	103	130	161	163	2	2	1
probe 90	1	1	103	120	159	167	1	1	1
probe 90	2	1	111	130	159	169	2	2	1
probe 91	1	2	111	126	159	163	2	1	1
probe 91	2	2	111		159	163	2	1	1
probe 92	1	1	111	124	159	161	2	1	1
probe 92	2	1	111	126	161	163	2	1	1
probe 93	1	2	105	124	159	163	2	1	1
probe 93	2	2	113		159	165	2	1	1
probe 94	1	2	97	126	159	165	2	1	1
probe 94	2	2	113		161	165	2	2	1
probe 95	1	1	97	126	159	169	1	2	1
probe 95	2	1	103	126	161	171	2	2	2
probe 96	1	1	111	126	159	161	2	1	1
probe 96	2	1	113	126	161	163	2	1	1
probe 97	1	2	107	126	159	163	2	1	1
probe 97	2	2	115		159	169	2	1	1
probe 98	1		101	124	159	163	1	1	1
probe 98	2		113	124	159	163	2	2	2

Patient	Chromosom	Geschlecht	TNF α	CD40L	TNF ϵ	IL1A	NcoI β	AspH I β	NcoI α
probe 99	1	1	97	124	159	165	1	2	2
probe 99	2	1	97	124	159	165	1	2	2
probe 100	1	2	105	126	159	163	2	1	1
probe 100	2	2	113		159	163	2	1	1
probe 101	1	1	109	124	159	163	2	1	1
probe 101	2	1	115	132	159	163	2	1	1
probe 102	1	1	101	122	159	163	1	2	2
probe 102	2	1	101	126	159	165	1	2	2
probe 103	1	1	103	126	159	163	1	1	1
probe 103	2	1	111	126	159	169	2	2	1
probe 104	1	1	113	120	159	163	2	1	1
probe 104	2	1	115	124	159	169	2	1	1
probe 105	1	1	105	124	159	163	1	1	1
probe 105	2	1	113	124	159	169	2	2	1
probe 106	1	2	101	130	159	169	1	1	1
probe 106	2	2	111		159	169	2	2	2
probe 107	1	2		124	159	163	2	1	1
probe 107	2	2			161	165	2	2	1
probe 108	1	2	97	124	159	163	1	2	1
probe 108	2	2	105		161	163	2	2	1
probe 109	1	1	97	122	159	163	1	2	2
probe 109	2	1	101	132	159	169	1	2	2
probe 110	1	1	97	124	159	165	1	2	1
probe 110	2	1	105	124	161	169	2	2	1
probe 111	1	2	97	130	161	161	2	2	1
probe 111	2	2	97		161	167	2	2	1
probe 112	1	1	105		159	161	1	2	1
probe 112	2	1	105		159	161	1	2	1
probe 113	1	2	101	124	159	163	1	2	1
probe 113	2	2	105		159	169	1	2	2
probe 114	1	1	101		159	163	1	1	1
probe 114	2	1	119		159	167	2	2	1
probe 115	1	2	95	124	159	163	1	2	2
probe 115	2	2	107		161	163	1	2	2
probe 116	1		97		159	163	2	1	1
probe 116	2		115		161	165	2	2	1
probe 117	1	1	97	124	159	169	2	1	1
probe 117	2	1	113	124	161	175	2	2	1
probe 118	1	1	97	124	159	163	2	2	1
probe 118	2	1	113	124	161	169	2	2	1
probe 119	1	2	115	124	159	163	2	1	1
probe 119	2	2	115		159	163	2	1	1
probe 120	1	1	115	124	159	163	2	1	1
probe 120	2	1	115	138	159	165	2	1	1
probe 121	1	1	97	120	159	163	2	1	1
probe 121	2	1	115	126	161	163	2	2	1
probe 122	1	1	97	126	159	163	2	1	1
probe 122	2	1	115	126	161	163	2	2	1
probe 123	1	2	115	124	159	159	2	1	1
probe 123	2	2	115		159	165	2	1	1

Patient	Chromosom	Geschlecht	TNF α	CD40L	TNF ϵ	IL1A	NcoI β	AspH I β	NcoI α
probe 124	1	1	105	124	159	165	1	2	1
probe 124	2	1	105	128	161	169	2	2	1
probe 125	1	2	107	124	159	165	2	2	1
probe 125	2	2	113		159	169	2	2	1
probe 126	1	1	103	124	159	163	2	1	1
probe 126	2	1	115	124	161	169	2	2	1
probe 127	1	1	97	124	161	163	2	2	1
probe 127	2	1	101	124	161	165	2	2	1
probe 128	1	1	97	132	159	169	1	2	1
probe 128	2	1	105	132	161	169	2	2	1
probe 129	1	2	101	132	159	169	1	1	1
probe 129	2	2	113		159	169	2	2	1
probe 130	1	1	101	124	159	165	1	1	1
probe 130	2	1	117	130	159	173	2	2	2
probe 131	1	1		122	159	163	1	2	1
probe 131	2	1		124	159	169	1	2	2
probe 132	1	1	111	124	159	163	2	1	1
probe 132	2	1	115	126	161	163	2	1	1
probe 133	1	1	113	124	159	163	2	1	1
probe 133	2	1	115	126	159	163	2	1	1
probe 134	1	1	97		159	165	1	2	1
probe 134	2	1	105		159	165	1	2	2
probe 135	1	1	113	120	159	165	2	1	1
probe 135	2	1	113	126	159	169	2	1	1
probe 136	1	2	97	124	159	161	2	1	1
probe 136	2	2	107		161	161	2	2	1
probe 137	1	1	97	122	161	161	1	2	1
probe 137	2	1	107	126	161	163	2	2	2
probe 138	1	1	103	126	159	163	1	1	1
probe 138	2	1	115	126	159	163	2	2	2
probe 139	1	1	103	124	159	163	1	2	1
probe 139	2	1	103	128	159	169	1	2	2

Legende:

Geschlecht: 1 = Frauen

2 = Männer

NcoI β : 1 = Allel TNFB*1

2 = Allel TNFB*2

AspH I β : 1 = Allel TNFB*2.1

2 = Allel TNFB*2.2

NcoI α : 1 = Allel TNF1

2 = Allel TNF2

Chromosomzuordnung willkürlich

Danksagung:

Mein herzlicher Dank gilt Frau Professor Elisabeth Weiß an deren Labor diese Arbeit durchgeführt wurde. Zum Einem war Sie die maßgebliche Kraft bei der Entstehung dieser Arbeit zum anderen möchte ich Ihr für die immerwährende Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei der Durchführung danken. Dies betrifft vor allem auch die Zeit nach Beendigung des experimentellen Abschnittes, in der ich durch wachsende berufliche Verpflichtungen als angehender Arzt zunehmend zeitlich anderweitig gebunden war. Ebenso gilt mein Dank Herrn Privat-Dozent Dr. Herbert Kellner, der den Kontakt durch seine Zusammenarbeit mit dem Institut für Humangenetik hergestellt hat, die Arbeit zusammen mit Frau Prof. Weiß mitbetreut hat und dessen Unterstützung ich mir während der gesamten Zeit immer Gewiss sein durfte.

Danken möchte ich außerdem allen Mitarbeitern des Labors im Institut für Humangenetik, namentlich erwähnt seien vor allem Dagmar und Armin die mir als molekularbiologischen Laien in der Anfangsphase der Arbeit wertvolle Hilfen bei der praktischen Durchführung waren und mir halfen unnötige Fehler zu vermeiden. Matthias, Markus und Eve bei der Arbeit mit den Mikrosatelliten. Matthias im besonderen nochmals für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Weiterhin möchte ich ausdrücklich Professor Eckehard Albert danken. Erstens für die Möglichkeit an seinem Labor die Typisierung der Mikrosatelliten durchzuführen. Zweitens für die unkomplizierte Bereitstellung der Daten der Kontrollgruppe des TNF α -Mikrosatelliten.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Jörg Günter Steiner
Geburtsort: München
Geburtsstag: 01.10.1969
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Religion: evangelisch

Schulbildung

1976 - 1980 Grundschole
1980 - 1989 Ludwigsgymnasium, humanistisch-neusprachliches
Gymnasium, München
05.1989 Abitur

Berufliche Ausbildung

05/1992-10/1998 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-
Maximilians-Universität München
08/1996 Beginn der Doktorarbeit an der medizinischen Poliklinik,
Klinikum Innenstadt und dem Institut für Humangenetik
und Anthropologie der LMU München
03/1999-08/2000 AiP I/II Chirurg. Abteilung Krankenhaus Freising GmbH
zur Zeit Assistenzarzt Abt. für Innere Medizin KH Penzberg

München, den 10.10.2001