

**Immungenetische Untersuchungen zur Assoziation des
Einzelnukleotidpolymorphismus -670 A/G im Promotor des Rezeptorgens
Fas/CD95 und Lupus erythematodes**

vorgelegt von
Sonja Christine Molin
aus
München
2007

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Ruzicka

**Immungenetische Untersuchungen zur Assoziation des
Einzelnukleotidpolymorphismus -670 A/G im Promotor des Rezeptorgens
Fas/CD95 und Lupus erythematodes**

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

vorgelegt von
Sonja Christine Molin
aus
München
2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. med. G. Messer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Rupp

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 2007

	Seite
1 Einleitung	3
1.1 Lupus erythematodes	3
1.1.1 Kutaner Lupus erythematodes (CLE)	4
1.1.2 Subakut kutaner Lupus erythematodes (SCLE)	5
1.1.3 Systemischer Lupus erythematodes (SLE)	6
1.2 Multifaktorielle Ätiopathogenese des Lupus erythematodes	7
1.3 Photosensitivität	9
1.4 Fas-vermittelte Apoptose (programmierter Zelltod)	11
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit	13
2 Material	14
2.1 Enzyme	14
2.2 Nukleinsäuren	14
2.3 Allgemeine Puffer und Ausgangslösungen	15
2.4 Spezielle Reagenzien	15
2.5 Weitere Verbrauchsmaterialien	15
2.6 Geräte	15
2.7 Patienten	17
2.7.1 Patientenuntergruppen	17
2.7.2 Kontrollen	17
3 Methoden	18
3.1 Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren	18
3.1.1 Messung der DNA-Menge	18
3.1.2 Restriktionsendonukleaseverdau von doppelsträngiger DNA	18
3.1.3 Polymerasekettenreaktion	18
3.1.4 Agarosegelelektrophorese	21
3.1.5 Horizontale Polyacrylamidgelelektrophorese	22

3.1.6	Visualisierung der DNA in Polyacrylamidgelen mit Ethidiumbromid	23
3.1.7	Visualisierung der DNA in Polyacrylamidgelen durch Silberfärbung	23
3.2	Statistische Methoden	24
4	Ergebnisse	25
4.1	Typisierung des Fas-Gen-Promotor-Polymorphismus -670 A/G	25
4.2	Lichttestung	27
4.3	Autoantikörpermuster	29
4.3.1	Ro-/La-Autoantikörper	29
4.3.2	Antinukleäre Antikörper (ANA)	31
4.4	Fas-Gen-Promotor-Polymorphismus	33
4.4.1	Allelfrequenzen und Verteilung der Genotypen AA, AG und GG bei LE-Patienten und Kontrollen	33
4.4.2	Verteilung der Genotypen AA, AG und GG auf die einzelnen Lupusformen	36
4.4.3	Assoziation der Genotypen AA, AG und GG mit den Ergebnissen der Photoprovokation	38
4.4.4	Zusammenhang der Genotypen AA, AG und GG mit dem serologischen Autoantikörpermuster	40
4.4.4.1	Ro-/La-Autoantikörper	40
4.4.4.2	Antinukleäre Antikörper (ANA)	43
5	Diskussion	45
6	Zusammenfassung	53
7	Literaturverzeichnis	55

1 Einleitung

1.1 Lupus erythematoses

Der so genannte „Lupus erythematoses“ (LE) ist eine nicht-organspezifische Autoimmunerkrankung und gehört zur großen Krankheitsgruppe der Kollagenosen.

Den unter diesem Begriff zusammengefassten Krankheitsbildern ist gemeinsam, dass sie sich in generalisierter Form vor allem am Bindegewebe abspielen und morphologisch ähnliche Veränderungen zeigen (22). Weitere Beispiele sind die Poly- und Dermatomyositis, die systemische Sklerodermie, das Sjögren-Syndrom sowie deren Überlappungsformen.

Der Terminus „Kollagenose“ wird heute zunehmend von dem Begriff „rheumatologisch-immunologische Systemerkrankungen“ abgelöst.

Definitionsgemäß ist der Lupus erythematoses eine Systemerkrankung der Haut und des Gefäßbindegewebes mit Vaskulitis/Perivaskulitis der kleinen Arterien und Arteriolen, verbunden mit Bildung bestimmter Autoantikörper und Ablagerungen von Immunkomplexen (22).

Die Haut ist in der Regel immer betroffen, doch theoretisch gesehen kann darüber hinaus auch jedes weitere Organ an den Folgen der Vaskulitis beteiligt sein.

Je nach Muster des Organbefalls unterscheidet man verschiedene Verlaufsformen des Lupus erythematoses hinsichtlich ihrer Klinik und Prognose (18, 21):

- *Kutaner Lupus erythematoses (CLE)* mit meist ausschließlichem Befall der Haut, in akuter, chronischer und intermittierender Verlaufsform, mit allenfalls geringer Einschränkung der Lebenserwartung,
- *Subakut kutaner Lupus erythematoses (SCLE)* mit Hautsymptomatik und in der Regel milder Organbeteiligung bei ausgeprägter Photosensibilität,
- *Systemischer Lupus erythematoses (SLE)* mit ausgeprägter Organbeteiligung und infauster Prognose.

1.1.1 Kutaner Lupus erythematoses (CLE)

Bei dem *kutanen Lupus erythematoses (CLE)*, dessen Befall betont die Haut betrifft, unterscheidet man akute, subakute, chronische und intermittierende Verlaufsformen (21, 38). Der *subakut kutane Lupus erythematoses (SCLE)* wird in einem eigenen Unterkapitel beschrieben.

Die akute Form (*akut kutaner Lupus erythematoses ACLE*) kann sowohl lokal begrenzt als auch generalisiert auftreten. Sie kann eine eigene Krankheitsentität sein oder im Gefolge jeder anderen Lupusverlaufsform in Erscheinung treten. Meist handelt es sich dabei um vorübergehende, ödematöse, zum Teil polsterartig infiltrierte Erytheme, die meist ohne Narbenbildung oder bleibende Hyperpigmentierungen abheilen.

Bei der chronischen Verlaufsform ist es nötig, eine weitere Differenzierung in Untergruppen vorzunehmen.

Am häufigsten findet sich hier der so genannte *diskoide Lupus erythematosus (DLE)*, gekennzeichnet durch scharf begrenzte, elevierte Plaques, die zu Ulzeration neigen und ausgesprochen berührungssensibel sind. Sie bestehen meist lange Zeit und heilen unschön vernarbend mit zentraler Atrophie ab.

Ist vor allem die Haut oberhalb des Halses betroffen, spricht man von einer lokalisierten Ausprägung, ist zusätzlich auch die Haut von Stamm und Extremitäten beteiligt, gilt sie als generalisiert.

Sonderformen sind der *follikuläre DLE*, der mit weniger als 1 Zentimeter großen, erythematösen, follikelgebundenen Papeln vor allem unter Betonung der Ellenbögen in Erscheinung tritt und der *verruköse DLE*.

Patienten mit DLE sind meist im Alter zwischen zwanzig und vierzig Jahren, mit einer Geschlechtsverteilung weiblich:männlich wie 3:2. Nachweise systemischer Antikörper im Serum lassen sich in der Regel nicht erbringen.

In etwa fünf bis zehn Prozent jedoch geht ein rein auf die Haut beschränkter DLE in einen systemischen LE mit Organbeteiligung und Autoantikörperbildung über.

Weitere Ausprägungsformen des chronischen kutanen LEs sind die *Lupus-Pannikulitis* und der *Lupus profundus (LEP)* (Pannikulitis plus DLE). Hier finden sich vor allem bei weiblichen Patienten schmerzhafte, derbe, blaurote subkutane Knoten von ein bis drei Zentimeter Durchmesser an Oberarmen, Oberschenkeln, Brust, Hals oder im Kopfbereich.

Lässt die damit einhergehende Entzündung in der Subkutis nach, bilden sich wurstförmige Einziehungen, die einer Fettgewebsatrophie ähneln.

Druckschmerzhafte blaurote Plaques an akralen Stellen wie Nase, Ohren, Fingern, Zehen, Knien und Ellenbögen, die zu Fissurbildung und Ulzeration neigen, sind das Kennzeichen des *Chilblain Lupus (CHLE)* („Frostbeulen“).

Durch massiv ausgeprägte dermale Muzinablagerung kommt es bei der intermittierenden Verlaufsform des kutanen LEs, dem *Lupus tumidus (LET)*, vor allem bei männlichen Patienten im Alter von dreißig bis vierzig Jahren zu urtikariellen Hauterscheinungen, die bevorzugt an lichtexponierten Stellen auftreten.

Gelegentlich sind die Schleimhäute von Mundhöhle, Nase, Augen, Anus und Genitale von DLE-ähnlichen Hautveränderungen betroffen. Man spricht dann von einem *mukösen Lupus*. Dieser ist oft nur schwer von den oralen Ulzerationen im Gefolge eines systemischen LEs abzugrenzen (25).

1.1.2 Subakut kutaner Lupus erythematoses (SCLE)

Der *subakut kutane Lupus erythematoses (SCLE)* nimmt hinsichtlich Klinik und Prognose eine Mittelstellung zwischen dem auf die Haut beschränkten CLE und dem organmanifesten SLE ein. Betroffen sind meist Frauen in mittlerem Lebensalter.

Im Vordergrund stehen auch hier die Hauterscheinungen. Typisch für den SCLE sind nicht-vernarbende papulosquamöse (psoriasiforme) und/oder ringförmige Plaques in symmetrischer Verteilung vor allem auf lichtexponierter Haut.

Prädilektionsstellen sind dementsprechend die Schultern, der obere Rücken, die Streckseiten der Arme, das Dekolletee und der Nacken. Die Gesichtshaut ist zumeist frei.

Allgemeines Krankheitsgefühl, Myalgien und Arthralgien imponieren klinisch als Systembeteiligung. Selten finden sich begleitend ein Sjögren-Syndrom oder eine Nierenbeteiligung.

Bei einer Mehrzahl der Patienten ist im Serum der Titer für Anti-Ro/SSA-Antikörper deutlich erhöht und es lässt sich das HLA-Antigen DR3 nachweisen (25).

1.1.3 Systemischer Lupus erythematoses (SLE)

Der *systemische Lupus erythematoses (SLE)* betrifft mit einer Geschlechtsverteilung von 10:1 vor allem Frauen im gebärfähigen Alter.

Die meist ausgeprägte Multiorganbeteiligung geht mit einer ernsten Prognose einher, die Lebenserwartung wird besonders durch eine manifeste Nierenschädigung stark verkürzt. Hilfreich zur Diagnosestellung sind die vom American College of Rheumatology (ACR) definierten Kriterien, von denen mindestens vier erfüllt sein müssen (71).

Sie spiegeln in Verbindung mit Allgemeinbeschwerden wie Fieber, Schwäche, Gewichtsverlust und Lymphknotenschwellungen das weite Spektrum der durch die Vaskulitis induzierten Organbeteiligung wieder.

Neben charakteristischen Hautveränderungen wie dem zentrofazial lokalisierten „Schmetterlingserythem“, DLE-ähnlichen Plaques, oralen oder nasalen Schleimhautulzerationen sowie einer ausgeprägten Photosensibilität sind vor allem serologische Parameter wegweisend.

Antikörper gegen Bestandteile aus dem Zellkern, so genannte antinukleäre Antikörper (ANA), sind in 95% der Fälle stark erhöht. In weiterer Differenzierung lässt sich meist feststellen, dass diese Antikörper sich vor allem gegen Doppelstrang-DNA, Smith-Antigen, Histone und Phospholipide richten. Hämatologische Befunde wie Thrombopenie, Leukopenie, Lymphopenie oder eine Coombs-positive hämolytische Anämie sind zumeist autoantikörperinduziert.

Bei 60% der SLE- Patienten äußert sich eine Beteiligung des zentralen Nervensystems durch Vigilanzdefizite, epileptische Anfälle, Apoplexe, Depressionen oder neuropsychiatrischen Symptomen (22).

Prognosebestimmend sind in der Regel die vielfältigen Ausprägungen der Nierenbeteiligung, charakterisiert durch variable klinische und labormedizinische Zeichen. Zugrundeliegend ist eine Immunkomplex-Nephritis, die mit vielfältigen glomerulären Veränderungen einhergeht.

Nicht unbedeutend sind auch die Folgen der Gefäßentzündung an den Gelenken in Form einer nicht-erosiven Arthritis, häufig verbunden mit ausgeprägten Myalgien, sowie an den serösen Häuten von Lunge und Herz (Pleuritis/ Perikarditis) mit Pleura- und Perikarderguss.

Die häufigsten Todesursachen sind bei einer 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von bis zu 90% Urämie, Herzversagen, neurologische oder septische Komplikationen (22, 25).

1.2 Multifaktorielle Ätiopathogenese des Lupus erythematoses

Der Lupus erythematoses ist eine nicht-organspezifische Autoimmunerkrankung bislang unbekannter Ätiologie.

Bestimmte Umweltfaktoren wie Viren, Medikamente, Chemikalien, UV-Strahlung oder Ernährung bewirken im Zusammenspiel mit einer gleichzeitig vorhandenen genetischen Disposition eine Veränderung in der Regulation der Immunantwort (25).

Die daraus resultierende Störung der Selbst- und Fremderkennung äußert sich in einer überschießenden Produktion von Autoantikörpern, nicht-organspezifischen Komplementbindungsreaktionen und einer verminderten zellulären Immunität.

Die Autoantikörper bei Lupus erythematoses sind im Gegensatz zu anderen Autoimmunerkrankungen nicht gegen definierte organspezifische Antigene gerichtet, sondern gegen allgemeine Zellkernbestandteile wie Doppelstrang-DNA, Histone oder Ribonukleoproteine.

Neben einer Veränderung der T-Zell-Funktion scheint auch ein Defekt der humoralen Immunantwort mit gestörter Monozyten-/ Makrophagen-Phagozytose zur Genese der Autoimmunreaktion bei Lupus erythematoses beizutragen (23).

Experimentelle Ergebnisse eines Mausmodells für Lupus erythematoses *in vivo* (MRL/lpr-Mäuse) zeigten, dass ein genetischer Defekt im Fas/CD95-Gen in einer verminderten Apoptoserate von Lymphozyten resultiert (53, 37, 66). Das führte zu der Annahme, dass Autoimmunphänomene durch die gestörte Elimination von autoreaktiven Lymphozyten hervorgerufen werden können.

Ausschlaggebend für die Bildung von Autoantikörpern beim Lupus erythematoses scheint ein vermehrter Anfall von zirkulierenden Zellkernantigenen zu sein (23).

Diese Hypothese beruht auf der Beobachtung, dass in der Endphase der Apoptose Bestandteile aus dem Zellkern in so genannten *blebs* auf der Zelloberfläche den immunkompetenten Zellen als potentielle Autoantigene präsentiert werden (9).

Als mögliche Entstehungsmechanismen für den vermehrten Anfall zirkulierender, antigenen Zellbestandteile werden diskutiert:

1. eine allgemein gesteigerte Apoptoserate mit vermehrtem Zellzerfall,

2. eine verminderte Beseitigung von apoptotischem Zellmaterial bei insgesamt normaler Apoptoserate durch einen Defekt der Phagozytose (23).

In Folge werden aktivierte B-Lymphozyten über Vermittlung durch autoreaktive T-Lymphozyten mit spezifischen Zytokinen (Interleukine, Tumornekrosefaktor, Interferone), dazu angeregt, gegen die akkumulierenden apoptotischen Zellbestandteile Autoantikörper (Ak) zu produzieren (lymphocyte dependent reaction). Besonders häufig richten sich diese Autoantikörper gegen Doppelstrang-DNA (Anti-dsDNA-Ak), Histone (Anti-Histon-Ak), Phospholipide (AP-Ak) oder Ribonukleoproteine (Anti-Ro/-La-Ak) (38).

Durch Bindung der Autoantikörper an die zirkulierenden Autoantigene aus den apoptotischen Zellen entstehen Antigen-Antikörperkomplexe. Im Organismus lagern sich diese entlang der Basalmembranen und Gefäßwände bevorzugt von Haut und Bindegewebe ab, und verursachen über eine komplementvermittelte Entzündungsreaktion deren Zerstörung. An der Haut wird dies histologisch als hydropische Degeneration der dermoepithelialen Übergangszone mit apoptotischen Keratinozyten (Civatte bodies) und lymphozytenreichem Infiltrat sichtbar. Die bandförmigen Immunkomplexablagerungen lassen sich immunfluoreszenzmikroskopisch nachweisen („Lupusbandtest“) (25, 38).

1.3 Photosensitivität

Bei einem grossen Teil der Patienten mit Lupus erythematoses bedingt ein enges Zusammenspiel zwischen UV-Licht-Exposition und einem bestimmten genetischen Hintergrund die Entstehung einer gesteigerten Lichtempfindlichkeit mit Ausbildung einer chronischen Entzündung der Haut als Antwort. In letzter Konsequenz ist die Ätiologie dieser Photosensibilität jedoch bisher noch nicht zufriedenstellend aufgeklärt.

Als mögliche Entstehungsmechanismen dafür werden unter anderem diskutiert: erhöhte Perzeption von Photonen, variable Lokalisation von Autoantikörpern, zytotoxische Effekte, Induktion von Apoptose mit Präsentation von Autoantigenen auf der Zelloberfläche, gesteigerte Produktion von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen sowie die Bildung von antigener DNA durch UV-Strahlung (2).

Definiert wird die Photosensibilität bei Lupus erythematoses als Bestandteil der ACR-Kriterien vom American College of Rheumatology als „Schmerz oder Hautrötung als Ergebnis einer ungewöhnlichen Reaktion auf Sonnenlicht“ (71).

Sie kann sich sowohl durch sonnenbrandähnliche Hautveränderungen bei einer sehr niedrigen UV-Licht-Dosis als auch durch ein ungewöhnliches Brennen auf der Haut ohne sichtbare Rötung äussern.

Neben einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes mit Schwäche, Müdigkeit, Gelenk- und Muskelschmerzen oder einer anderen Organbeteiligung findet sich darüber hinaus in den Sonnenmonaten bei vielen Patienten ein Spektrum an Lupus-typischen Hautveränderungen.

Patienten mit bestimmten Unterformen des Lupus erythematoses sind besonders lichtempfindlich, wie mehrere, unabhängige Studien belegen: 50-100 % Photosensibilität bei Patienten mit SCLE, 70-81 % bei Patienten mit LET, 25-85 % bei Patienten mit SLE (59, 76).

Autoantikörper gegen die Ribonukleoproteine SSA/Ro und/oder SSB/La wurden gehäuft im Serum lichtempfindlicher Lupus-Patienten beschrieben, können jedoch nicht als sine qua non-Merkmal für Photosensibilität verallgemeinert werden (63).

Durch gezielte Bestrahlung abgegrenzter Hautareale mit UV-A und/oder UV-B-Strahlung nach definiertem Protokollschema ist es möglich, die gesteigerte Lichtempfindlichkeit eines Patienten via Photoprovokation zu objektivieren (39, 40, 45, 46, 63, 64).

Als klinisch eindeutiges Diagnosekriterium der Photosensibilität gilt dabei die langsame, mehrere Tage dauernde Entwicklung von Papeln oder Plaques, mit und ohne Schuppung, die klinisch und histopathologisch einem kutanen Lupus erythematodes gleichen und über einen Zeitraum von bis zu einigen Wochen bestehen bleiben (63).

Histopathologische Untersuchungen der lichtprovozierten Hautläsionen zeigen oberflächlich, vor allem in der Nähe von Gefäßen, ein lymphozytenreiches Infiltrat, ferner eine hydropische Degeneration der dermoepithelialen Übergangszone sowie basal nekrotische Keratinozyten (20, 63).

Entstehung und Verlauf der Autoimmunantwort auf UV-Strahlung sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Mediatorvermittelte Zytokinausschüttung, Keratinozytenapoptose mit Präsentation von Zellkernbestandteilen an der Zelloberfläche, Aktivierung von Adhäsionsmolekülen entweder konsekutiv durch Zytokine oder direkt durch Transkriptionsfaktoren, oxidativer Stress und freie Sauerstoffradikale, sowie die Bildung von antigener DNA sind daran beteiligt (2, 38).

Alle diskutierten pathophysiologischen Entstehungsmechanismen der Photosensibilität münden in die gleiche Endstrecke: UV-Strahlung induziert in den verschiedenen Zellen der Haut und des Bindegewebes Moleküle, die Entzündungsprozesse fördern [Prostaglandin E₂, TNF- α , IL-1, ICAM-1(intercellular adhesion molecule)] oder hemmen können (IL-10, IL-1-Rezeptorantagonist). Das Ausmaß der Aktivierung dieser Moleküle scheint genetisch determiniert zu sein, wie immungenetische Untersuchungen der Photosensibilität belegen (38).

1.4 Fas-vermittelte Apoptose (programmierter Zelltod)

Die Apoptose ist ein physiologischer Prozess, der die normale Gewebemöostase durch Kontrolle von Wachstum und Zellüberleben reguliert (29).

Sie ist ein wichtiges Bindeglied im Rahmen von Embryogenese, Metamorphose, Gewebshomöostase, Gewebsatrophie sowie Tumorregression.

Einer der ersten beschriebenen Signalübertragungswege der Apoptose ist der Fas/Fas-Ligand-vermittelte programmierte Zelltod (7).

Fas/ CD95 ist ein Mitglied der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor-Familie. Er wird von zahlreichen Gewebearten verstärkt exprimiert, darunter die Haut, der Thymus, die Leber und der Intestinaltrakt (29, 30).

Seine Expression auf aktivierten B- und T-Lymphozyten ist maßgeblich am „activation-induced cell death“ beteiligt und spielt eine tragende Rolle bei der Lymphozytenselektion im Thymus sowie bei der Bildung von peripherer Toleranz (7, 18).

Im Rahmen eines Entzündungsprozesses kann das Ausmaß der Fas-Expression durch proinflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel Interferon γ oder TNF α gesteigert werden.

Der Fas-Ligand FasL (CD178) gehört der TNF-Familie an und wird vor allem von aktivierten T-Lymphozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert.

Von der Zellmembran kann er durch Metalloproteasen abgelöst werden, behält in gelöster Form jedoch seine apoptoseinduzierenden Fähigkeiten bei (35).

Die Fas-vermittelte Apoptose beginnt mit der Bindung eines FasL-Trimers auf einer Effektorzelle (T-Lymphozyt, Makrophage oder neutrophilem Granulozyt) an ein Fas-Trimer auf der Membranoberfläche der Zielzelle. Daran schließt sich die Formation eines „death-inducing signalling“-Komplexes (DISC) um die zytoplasmatische Kette des Fas an.

In Folge interagiert Fas mit dem Adaptionsprotein „Fas-associated death-domain protein“ (FADD) durch homologe Anlagerung ihrer jeweiligen Todesdomänen, an die sich die Pro-Caspase-8 anfügt.

Durch Autokatalyse wird diese in ihre aktive proteolytische Form überführt, welches die Aktivierung weiterer Caspasenkaskaden bewirkt.

An ihrem Ende steht der programmierte Zelltod mit Kondensation der Zelle, Schrumpfung und Zerfall des Zellkerns und die Zerteilung der chromosomalen DNA in einzelne Fragmente (7).

An der Nukleotidstelle -670bp (Basenpaare), ausgehend von der Startposition der Translation, liegt in der Enhancerregion im Promotor des Rezeptors Fas/CD95 ein Einzelnukleotid-polymorphismus (30, 31, 32).

Er beruht auf einem Austausch der Basen A und G. Seine beschriebenen Basen sind homozygot A oder G sowie heterozygot AG an dieser Nukleotidposition.

Die physiologische Bedeutung dieses -670A/G Polymorphismus ist nicht vollständig aufgeklärt, doch scheint seine Lage in der Konsensussequenz des Zellkern-Transkriptions-elements *nuclear transcription element GAS* (*gamma interferon activated sequence*) die Fas-Gen-Transkription modulierend zu beeinflussen (29, 35).

Durch Veränderung der Bindungsstelle des **GAS** erfolgt eine Anlagerung des Nuklearfaktors **STAT1** (signal transducer and activator of transcription) mit variabler Intensität, die besonders stark bei Vorhandensein des A-Allels an Stelle -670 ausgeprägt zu sein scheint.

Über die daraus resultierende Variation der Transkriptionsrate des Fas-Gens wird möglicherweise die Apoptoserate der Fas-exprimierenden Zellen in zahlreichen Gewebearten wie der Haut oder dem Intestinum gesteuert (43).

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Ätiopathogenese des Lupus erythematoses ist ein multifaktorielles Zusammenspiel aus genetischem Hintergrund, Umwelteinflüssen, hormonellen Regelkreisen und Immunmodulation. Sie ist in ihrer Komplexität bisher nicht vollständig aufgeklärt.

Für die genetische Prädisposition zur Entwicklung einer Autoimmunreaktion scheinen verschiedene Kandidatengene von besonderer Bedeutung zu sein (29, 35, 49, 80).

Sie kodieren zum Beispiel für bestimmte Entzündungsmediatoren/ Zytokine, für Proteine des Haupthistokompatibilitätskomplexes oder für Adhäsionsmoleküle.

Eine Fehlfunktion der Apoptose scheint maßgeblich an der Entstehung von nicht-organspezifischen Autoimmunerkrankungen wie auch dem Lupus erythematoses beteiligt zu sein.

Besonderes Augenmerk der aktuellen Forschung gilt derzeit den Apoptose-induzierenden Genen, darunter Fas, FasL, bcl-2 und DNase1 (35, 80).

Ziel dieser Arbeit ist es, zu klären, ob immungenetische Variationen auf Einzelnukleotidebene die unterschiedlichen Ausprägungsformen einer Autoimmunreaktion beeinflussen können und sich im klinischen Bild einer Erkrankung widerspiegeln.

Ausgangspunkt der Untersuchungen ist ein Kollektiv von 107 Patienten, bei denen zu einem früheren Zeitpunkt bereits die Diagnose „Lupus“ nach klinischem Typ, systemischer Beteiligung, Autoantikörperprofil und Phototestung diagnostisch unterteilt worden war.

Ob eine Assoziation zwischen dem programmierten Zelltod und der Krankheitsentität Lupus erythematoses in ihren Subtypen besteht, soll aus der Untersuchung eines Einzelnukleotidpolymorphismus in der Promotorregion eines Apoptosegens abgeleitet werden. Hinweise auf einen Zusammenhang mit einer gesteigerten Lichtempfindlichkeit und einem bestimmten Autoantikörperprofil im Serum sollen dabei ebenso untersucht werden.

2 Material

2.1 Enzyme

Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	10 x Reaktionspuffer	Temperatur	Schnittstelle	Hersteller
<i>EcoR</i> I (10 U/μl)	H	37°C	G/AATTC	Promega, Mannheim, Deutschland

Weitere verwendete Enzyme

Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl) Amersham Life Sciences, Braunschweig, Deutschland

2.2 Nukleinsäuren

Oligonukleotide

Alle hier aufgelisteten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland synthetisiert. Da sie lyophilisiert geliefert werden, müssen sie entsprechend Herstellerangabe durch Zugabe einer definierten Menge von autoklaviertem Wasser zunächst gelöst werden. Die Endkonzentration beträgt bei allen Primern 100 pmol/μl bzw. 100 μM. Ausgehend von diesen Lösungen werden jeweils Arbeitsverdünnungen mit einer Konzentration von 5 oder 7 pmol/μl bzw. 5 oder 7 μM hergestellt. Alle Oligonukleotide werden bei -20°C gelagert.

Primer für Allel-spezifische PCR (35):

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
CD95-AS-P1	GGT TAA CTG TCC ATT CCA CA
CD95-AS-P2	GGT TAA CTG TCC ATT CCA CG
CD95-AS-P3	TGC ACA AAT GGG CAT TCC TG

Primer für SSCP-Analyse (35):

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
CD95-SSCP-P7	TCC CTT TTC AGA GCC CTA TG
CD95-SSCP-P8	CTG GAG TCA CTC AGA GAA AG

2.3 Allgemeine Puffer und Ausgangslösungen

Zum Ansetzen aller Lösungen wurde mit Ausnahme von bestimmten biochemischen Reaktionsansätzen, die mit bidestilliertem Wasser angesetzt wurden, autoklaviertes und deionisiertes Wasser verwendet.

Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)	29 g Acrylamid und 1 g Bisacrylamid ad 100 ml mit H ₂ O
PBS	139,9 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 einstellen
10 x TBE-Puffer	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA

2.4 Spezielle Reagenzien

Produkt	Bezugsquelle
Nucleotrap [®] Extraction Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland

2.5 Weitere Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle
Medical X-Ray Screen Film, green sensitive	HS Medizintechnik, Gauting, Deutschland

2.6 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Bezugsquelle
Elektrophoresekammer für horizontale PAGE	2117 Multiphor Electrophoresis Unit	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg, Deutschland
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Deutschland
Thermocycler	GeneAmp9600	Perkin Elmer, USA
	Omn-E Hybaid	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland

	Thermalreactor TR1 Hybaid	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
	Techne Progene	Thermo-Dux, Wertheim, Deutschland
Transilluminator	UV-Transilluminator (Wellenlänge: 312 nm)	Bachofer, Reutlingen, Deutschland
Zentrifugen	Biofuge fresco Megafuge 1.0 Megafuge 1.0 R Suprafuge 20	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland

2.7 Patienten

Für diese Arbeit wurde ein Kollektiv von 107 Patienten untersucht, bei denen zu einem früheren Zeitpunkt bereits die Diagnose „Lupus“ in ihre Unterformen diagnostisch unterteilt worden war.

Alle Patienten waren an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München sowohl stationär als auch über eine Spezialsprechstunde für Autoimmundermatosen betreut. Zur Diagnosefindung dienten die Kriterien des American College of Rheumatology (ACR), sowie die histologische und immunchemische Untersuchung von Probebiopsien der Haut.

Von diesen 107 Patienten waren Proben isolierter genomischer DNA aus Blutzellen vorhanden. Zusätzlich waren die klinischen Daten sowie das spezifische Autoantikörperprofil und Systembeteiligung bestimmt worden.

Entsprechend dem Protokoll nach Lehmann und Kind von 1990 lagen von 60 Patienten die Ergebnisse einer Photoprovokation mit UV-A- und UV-B-Licht vor. Als positive Reaktion wurde dabei die langsame, mehrere Tage dauernde Entwicklung von Hautveränderungen gewertet, die klinisch und histopathologisch einem kutanen Lupus erythematoses glichen und über einen Zeitraum von bis zu einigen Wochen persistierten (50).

2.7.1 Patientenuntergruppen

Schlüsselt man das Patientenkollektiv nach Lupussubtypen auf, so ergibt sich folgende Verteilung:

Gesamt: 107

davon 46 SLE, 22 SCLE, 14 CDLE, 9 LET, 2 LEP, 14 DLE

2.7.2 Kontrollen

Die Kontrollgruppe setzt sich aus 96 zufällig ausgewählten, nicht verwandten, gesunden Studenten zusammen. Die entsprechenden DNA-Proben entstammten der Biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

3 Methoden

3.1 Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren

3.1.1 Messung der DNA-Menge

Die Menge an enthaltener dsDNA in den Patienten-Proben wurde am Photometer bestimmt. Dazu wurde 1 μl der gelösten dsDNA mit 99 μl bidestilliertem Wasser verdünnt und in eine Plastikkuvette gefüllt. Die Messung erfolgte mit Hilfe des *BioPhotometers* von *Eppendorf* bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum), wobei sowohl die Menge in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ als auch das Verhältnis der Extension bei 260 nm zur Extension bei 280 nm angegeben wurde. Aus diesem Verhältnis, das idealerweise zwischen 1,8 und 2 liegen sollte, ließ sich auf die Reinheit der isolierten dsDNA schließen. Der Nullwert wurde mit Wasser bestimmt. Anschließend wurden die Patienten-DNA-Proben mit bidestilliertem Wasser bis zu einer Konzentration von 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ verdünnt.

3.1.2 Restriktionsendonukleaseverdau von doppelsträngiger DNA

Für einen Restriktionsverdau wird in der Regel 1 μg DNA eingesetzt. Bei einem Endvolumen von 30 μl gibt man 3 μl 10x Puffer, je nach verwendetem Enzym, sowie 1 U Enzym zu. Inkubationszeit und Inkubationstemperatur sind für jedes Enzym unterschiedlich. Im Anschluss daran kann das Ergebnis durch Auftrag auf ein Agarosegel analysiert werden.

3.1.3 Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) kann man *in vitro* gezielt diejenigen DNA-Abschnitte amplifizieren, die besonders von Interesse sind. Für diese Selektion benötigt man sequenzspezifische Primer-Paare, die beidseitig flankierend von der Zielsequenz 5' („upstream“) und 3' („downstream“) binden.

Die Methode beruht darauf, dass das aus einem thermophilen Bakterium (*Thermus aquaticus*) stammende hitzestabile Enzym Taq-Polymerase in der Lage ist, bei einem bestimmten Temperatur- und pH-Optimum aus einem DNA-Einzelstrang einen Doppelstrang zu synthetisieren, sofern bereits ein kurzes Stück doppelsträngige DNA vorliegt.

Jede PCR-Reaktion lässt sich in fünf Grundschritte einteilen:

Anfangsdenaturierung:

Zu Beginn werden die Proben durch Erhitzen auf 94-96°C für 10 Minuten denaturiert, d.h. Sekundärstrukturen der DNA werden aufgelöst, die Doppelstränge in zwei Einzelstränge getrennt. Zusätzlich werden dadurch eventuell in der Lösung enthaltene DNAsen irreversibel gehemmt.

Denaturierung:

Jetzt noch doppelsträngige Amplifikate müssen hier erneut denaturiert werden, da die Primer nur an einzelsträngige DNA binden.

Anlagerung („Annealing“):

Die Temperatur wird nun auf die zuvor ermittelte, optimale Anlagerungstemperatur der verwendeten Oligonukleotide gesenkt. Diese können so mit den Einzelsträngen hybridisieren, und einen Ansatzpunkt für das Enzym DNA-Polymerase bilden.

Verlängerung („Elongation“):

Die DNA-Polymerase synthetisiert ausgehend von den freien 3'-Primerenden den komplementären Strang. Dieser Schritt läuft immer bei 72°C, dem Temperatur-Optimum der Taq-Polymerase ab.

Denaturierung, Annealing und Elongation werden in dieser Reihenfolge laufend wiederholt und so die DNA-Stränge exponentiell um das 2ⁿ-fache vermehrt. Die nötige Zyklenzahl n kann experimentell ermittelt werden.

Endverlängerung:

Als letzter Schritt erfolgt anschließend eine einmalige Verlängerung bei 72°C für 10 Minuten.

Allel-spezifische PCR:

Zum Nachweis der Allele eines Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) bietet sich die Durchführung einer Allel-spezifischen PCR an. Hierbei wird für jedes Allel (hier A/G) ein spezifischer Primer (CD95-AS-P1/2) mit einem gemeinsamen Primer (CD95-AS-P3) in der Polymerasekettenreaktion kombiniert. Dadurch stellt sich bei anschließendem Auftrag der

PCR-Produkte auf ein Agarosegel je eine Allel-spezifische Bande dar.

SSCP-PCR:

Zur Bestätigung der Ergebnisse einer Allel-spezifischen PCR bietet sich die Durchführung einer Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP) an. Mit dieser Methode ist eine Unterscheidung der Allele eines SNP's durch ihre verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten abhängig von ihren sequenzspezifischen Konformationen möglich. Hierzu müssen die SSCP-PCR Produkte abschließend noch mit der gleichen Menge Formamid versetzt, bei 95° für 5 Minuten zu Einzelsträngen denaturiert und sofort in Eiswasser gekühlt werden, bevor sie dann auf nativen Polyacrylamidgelen mit Silberfärbung dargestellt werden können.

Für die verschiedenen Polymerasekettenreaktionen wurde, wenn nicht anders angegeben, die gleiche PCR-Lösung mit folgender Zusammensetzung verwendet:

Reagenz	Stock-Konzentration	End-Konzentration	Menge [μ l]
10x PCR-Puffer	15 mM MgCl ₂	1,5 mM	2
dNTP	jeweils 2 mM	jeweils 200 μ M	2
Taq-Polymerase	5 U/ μ l	0,5 U/20 μ l	0,1
MgCl ₂	25 mM	3 mM	1,6
H ₂ O	-	-	10,3
5'-Primer	100 μ M	0,25- 0,35 μ M/ μ l	1
3'-Primer	100 μ M	0,25- 0,35 μ M/ μ l	1
DNA	50- 100 ng/ μ l	2,5- 5 ng/ μ l	2
Gesamtvolumen			20

Die PCR-Lösung wurde für jeden Versuch neu in der jeweils benötigten Menge angesetzt und gleichmäßig auf die entsprechende Anzahl von PCR-Gefäßen verteilt. Die spezifischen Primer und die DNA wurden separat dazu pipettiert.

Die Bedingungen für die PCR waren in der Regel:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Anfangsdenaturierung	96°C	10 min	1
Denaturierung	94°C	30 s	} 35
Annealing	x°C	30 s	
Extension	72°C	30 s	
Endextension	72°C	10 min	1

Die Annealing-Temperatur für die A-spezifische PCR war 55°C, für die G-spezifische PCR 58°C, für die SSCP-PCR 60°C.

3.1.4 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können DNA-Moleküle der Größe nach aufgetrennt werden, es können Aussagen über ihre Konzentration und ihren Reinheitsgrad getroffen werden. Darüber hinaus ist es zum Beispiel möglich, die spezifischen Allele eines SNP's darzustellen. Für die Auftrennung kleiner Fragmente (unter 1000 bp) werden bevorzugt Gele mit hohen Konzentrationen (bis 2,5%) verwendet, während große Fragmente besser in niederprozentigen Gelen (0,7%) aufgetrennt werden. Für diese Arbeit wurden in der Regel 1,5-%ige Agarosegele verwendet.

Zunächst wird die gewünschte Agarosemenge abgewogen und mit 1xTBE (10xTBE, deionisiertes Wasser, 0,15 µg/ml Ethidiumbromid) bis zum benötigten Volumen aufgefüllt. Die Suspension wird in einem Mikrowellenherd so lange gekocht, bis die Agarose vollständig geschmolzen bzw. gelöst ist. Während diese Lösung auf etwa 60°C abkühlt, wird ein Gelträger mit bidestilliertem Wasser gereinigt, seine Ränder mit Tesakrepp abgeklebt und ein Kamm eingesetzt. Die abgekühlte Agaroselösung wird anschließend in den so vorbereiteten Gelträger gegossen. Bis zur vollständigen Erstarrung des Gels vergehen einige Minuten.

Eine Elektrophoresekammer wird mit 1xTBE-Puffer befüllt, das erstarrte Gel wird eingesetzt und der Kamm vorsichtig herausgezogen. Je nach verwendetem Kamm variiert die Taschengröße des Gels, so dass 10 bis maximal 100 µl der Probe hinein pipettiert werden können. Das PCR-Amplifikat wurde zuvor mit 1/6 seines Volumens Auftragspuffer versetzt.

Die Elektrophorese erfolgt je nach Fragmentgröße, gewünschter Bandenschärfe und Agarosekonzentration bei einer Spannung von 50 – 110 Volt.

Das im Laufpuffer enthaltene Ethidiumbromid (150 µg/l) interkaliert in die DNA, so dass diese unter UV-Licht sichtbar wird und fotografiert werden kann. Durch Vergleich der DNA-Banden mit dem Längenstandard (Marker; in dieser Arbeit wurde immer die 1 kb+ Leiter verwendet) können Größe und Menge der vorhandenen DNA bestimmt werden.

10 x TBE Puffer: 0,89 M Tris
 0,89 M Borsäure
 0,02 M EDTA
 pH 8,0

<u>6 x Auftragspuffer:</u>	30 % (v/v) Ficoll in TE, pH 8,0 0,4 % (w/v) Bromphenolblau/ Xylencyanol FF oder Orange G
<u>Längenstandard:</u>	15 µl Molekulargewichtsstandard-Stammlösung (Gibco, 1 µg/µl) 200 µl 6 x Auftragspuffer 535 µl bidestilliertes Wasser = 750 µl; Endkonzentration Längenstandard 0,02 µg/µl

3.1.5 Horizontale Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung von kleinen Mengen DNA bzw. um geringe Unterschiede der Wanderungsgeschwindigkeiten z.B. bei SSCP-Analysen exakt darzustellen, können auch Polyacrylamid-(PA)-Gele verwendet werden.

Ein 8 %iges, horizontales PA-Gel wird nach seiner Polymerisation möglichst luftblasenfrei auf die Kühlplatte einer Elektrophoresekammer (2117 Multiphor Electrophoresis Unit) gelegt. Anschließend werden 1 cm breite Agarosestreifen am unteren und oberen Gelende platziert. Auf diese müssen beim Gellauf die Elektroden positioniert werden. Die Proben werden auf kleine Fließpapierplättchen ca. 1 cm vom Kathoden-Ende des Gels entfernt aufgetragen.

Der Gellauf erfolgt bei der Einstellung 1.000 V, 15 mA, 15 W und 12°C. Die DNA kann anschließend nach Inkubation mit Ethidiumbromid unter UV-Licht-Bestrahlung dargestellt oder mittels einer Silberfärbung detektiert werden.

Gel:	8 ml H ₂ O 3 ml Tris-Sulfat-Puffer (9 g Tris, 0,43 ml 96 % H ₂ SO ₄ , ad 200 ml mit H ₂ O; pH 9) 4 ml 30 % Acrylamid-PDA (29,1 % Acrylamid, 0,9 % Piperazindiacrylamid) 5,5 µl TEMED 105 µl 10 % APS
Tris-Borat-Puffer:	60,57 g Tris 8,66 g Borsäure ad 1 l mit H ₂ O
Agarosestreifen:	5 g Agarose werden in 250 ml Tris-Borat-Puffer gelöst und in eine 5 cm hohe Kunststoffschale gegossen. Nach dem Erkalten wird die Agarose in 1 cm breite Streifen geschnitten. Zur Aufbewahrung werden diese in 0,01 % Bromphenolblaulösung (1 mg Bromphenolblau in 100 ml Tris-Borat-Puffer) bei 2-8°C gelagert.

3.1.6 Visualisierung der DNA in Polyacrylamidgelen mit Ethidiumbromid

Ethidiumbromid ist ein interkalierender Farbstoff, welcher sich in die DNA einlagert, wodurch diese unter UV-Licht-Bestrahlung sichtbar wird. Polyacrylamidgele können nach der Elektrophorese für 30–45 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) inkubiert und anschließend unter UV-Licht fotografiert werden.

3.1.7 Visualisierung der DNA in Polyacrylamidgelen durch Silberfärbung

Die Silberfärbung stellt eine vereinfachte und kostengünstige Methode zur Färbung von DNA in Polyacrylamidgelen dar. Silber bindet sich an Sulfhydryl- und Carbonylgruppen, wodurch die DNA-Banden nachgewiesen werden können. Die Färbung mit Silbernitrat ist 2–5-mal sensitiver als eine Färbung mit Ethidiumbromid, und ist auch zum Nachweis einzelstängiger DNA-Moleküle geeignet. Mit dieser Methode können kleinste Mengen (weniger als 1 ng) DNA detektiert werden.

Bei der Silberfärbung werden alle Arbeitsschritte auf dem Schüttler durchgeführt.

Nach Elektrophorese wird das Gel zur besseren Handhabung auf einer der beiden Glasplatten belassen und für 2–3 Minuten in einer Fixierlösung inkubiert (10% Ethanol, 0,5% Essigsäure, bidestilliertes Wasser). Nach einem kurzen Waschschrift mit bidestilliertem Wasser wird es für 10 Minuten in eine frisch angesetzte Silbernitratlösung gelegt (0,1% AgNO₃, H₂O bidest). Diese Behandlung sollte tatsächlich nicht länger als 10 Minuten dauern, da sonst der Hintergrund auf dem Gel relativ verstärkt wird. Bevor das Gel nun in die ebenfalls frische Entwicklerflüssigkeit (1,5% NaOH, 0,01% NaBH₄, 0,4% Formaldehyd, bidestilliertes Wasser) gegeben werden kann, muss das überschüssige Silbernitrat durch 2–3maliges Spülen mit bidestilliertem Wasser entfernt werden. Der Entwicklungsvorgang benötigt maximal 20 Minuten und sollte schnell gestoppt werden, sobald sich ein gelblicher Hintergrund auf dem Gel entwickelt. Zum Abstoppen der Reaktion wird das Gel 5–15 Minuten in NaCO₃-Lösung (0,75% NaCO₃, bidestilliertes Wasser) geschwenkt. Dieser Reaktionsschritt bewirkt zusätzlich, dass das Gel geschmeidig bleibt. Das Ergebnis wird fotografisch festgehalten, indem das Gel auf einen Leuchtkasten gelegt, und bei Blende 11 und 60s Belichtungszeit abgelichtet wird. Zur Aufbewahrung kann das Gel anschließend getrocknet werden.

3.2 Statistische Methoden

Für die statistischen Berechnungen wurde SPSS (Statistical Package for Social Sciences) in der Version 12.0.1 verwendet.

Die einzelnen Merkmale wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests auf statistisch signifikante Assoziationen untersucht. Dabei wurde die jeweilige Fragestellung auf dem Signifikanzniveau 0,05 zweiseitig getestet. Ein Ergebnis mit $p \leq 0,10$ wurde als Trend gewertet.

Waren die erwarteten Häufigkeiten zu klein (weniger als fünf Beobachtungseinheiten in einem oder mehreren Feldern) und somit die Voraussetzungen der Vierfeldertafel nicht erfüllt, wurde der Exakte Test nach Fisher verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Typisierung des Fas-Gen-Promotor-Polymorphismus -670 A/G

Der in dieser Arbeit untersuchte Polymorphismus im Promotor des Apoptosegens Fas liegt in der Enhancerregion an der Nukleotidstelle -670bp, ausgehend von der Startposition der Translation.

Er beruht auf einem Einzelnukleotidaustausch der Basen A und G. Seine möglichen Ausprägungsgrade sind homozygot A oder G sowie heterozygot AG.

Je nachdem, welches Allel vorliegt, ergibt die Allel-spezifische Polymerasekettenreaktion (PCR) eine sichtbare Bande nur für A beziehungsweise G oder bei beiden Reaktionen. Das Amplifikat ist in allen Fällen 305 Basenpaare lang.

Zur Überprüfung und Verifizierung der für die statistische Auswertung herangezogenen Ergebnisse der Allel-spezifischen PCR wurde mit einzelnen, stichprobenartig ausgewählten DNA-Proben zusätzlich eine Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP) durchgeführt. Bei dieser Methode konnten die verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten der Allele des Einzelnukleotidpolymorphismus abhängig von ihrer jeweiligen sequenzspezifischen Konformation beobachtet werden. Die SSCP-Analyse diente, analog zu den in der Literatur beschriebenen Vorarbeiten (35), allein zur Validierung der als Hauptmethode durchgeführten Allel-spezifischen PCR.

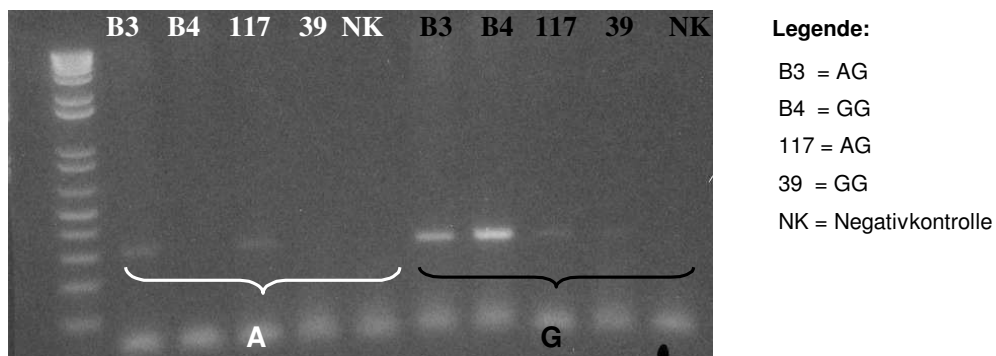


Abb.1: Typisierung des Fas-Gen-Promotor-Polymorphismus -670 A/G mit Agarosegelelektrophorese nach Allel-spezifischer PCR.

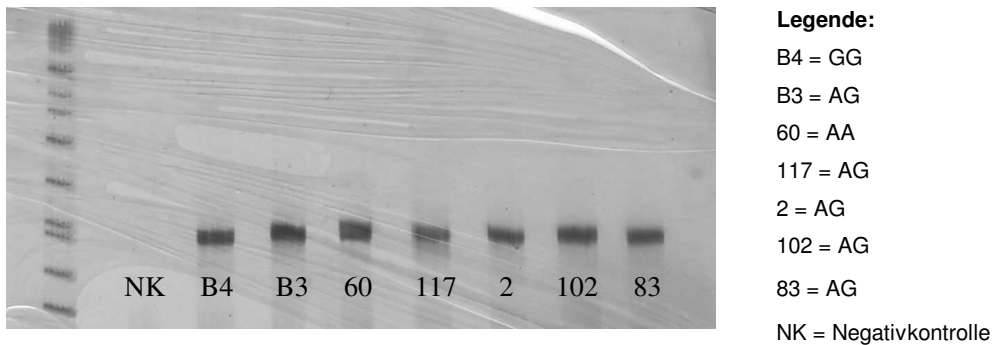


Abb.2: Unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten der Allele des Einzelnukleotidpolymorphismus bei der Polyacrylamidgelelektrophorese nach SSCP-Analyse.

Die Resultate der SSCP-Analyse sollten die Ergebnisse der Allel-spezifischen PCR bestätigen, eine eigene statistische Auswertung der Stichproben war nicht vorgesehen.

	B4	B3	60	117	2	102	83
Allel-spezifische PCR	GG	AG	AA	AG	AG	AG	AG
SSCP - Analyse	GG	AG	AA	AG	AG	AG	AG

Tabelle 1: Vergleichende Gegenüberstellung der Typisierungsergebnisse der Allel-spezifischen PCR mit den Ergebnissen der SSCP-Analyse bei stichprobenartig ausgewählten DNA-Proben

Tabelle 1 zeigt auf, dass bei der vergleichenden Gegenüberstellung der Typisierungsergebnisse die Daten der Hauptmethode der Allel-spezifischen PCR mit den Daten der SSCP-Analyse übereinstimmen.

Die physiologische Bedeutung des -670A/G Polymorphismus ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt, doch scheint seine Lage in der Konsensussequenz des Zellkern-Transkriptionselements *nuclear transcription element GAS* (*gamma interferon activated site*) die Fas-Gen-Transkription modulierend zu beeinflussen (29, 35).

Durch Veränderung der Bindungsstelle des *GAS* erfolgt eine Anlagerung des Nuklearfaktors *STAT1* (signal transducer and activator of transcription) mit variabler Intensität, die besonders stark bei Vorhandensein des A-Allels an Stelle -670 ausgeprägt zu sein scheint. Über die daraus resultierende Variation der Transkriptionsrate des Fas-Gens wird möglicherweise die Apoptoserate der Fas-exprimierenden Zellen in zahlreichen Gewebearten wie der Haut oder dem Intestinum gesteuert (43).

4.2 Lichttestung

Von 60 der 107 Patienten, deren DNA für diese Arbeit untersucht wurde, existieren Ergebnisse der Lichttestung nach dem Protokoll von Kind und Lehmann (1990). Als positives Resultat wurde hierbei gewertet, wenn die induzierten Hautveränderungen sowohl klinisch als auch histopathologisch einem LE entsprachen, und nach langsamer Entwicklung über mehrere Tage bis Wochen persistierten (63).

Anzahl		UV-A-Empfindlichkeit		Gesamt
		Negativ	Positiv	
Diagnose	DLE	5	3	8
	SCLE	9	5	14
	SLE	17	5	22
	LET	5	4	9
	CDLE	7	0	7
Gesamt		43	17	60

Tabelle 2: Ergebnisse der Photoprovokation mit UV-A-Licht im LE-Patientenkollektiv (Lupussubtypen)

Anzahl		UV-B-Empfindlichkeit		Gesamt
		Negativ	Positiv	
Diagnose	DLE	4	4	8
	SCLE	6	8	14
	SLE	14	7	21
	LET	2	7	9
	CDLE	6	1	7
Gesamt		32	27	59

Tabelle 3: Ergebnisse der Photoprovokation mit UV-B-Licht im LE-Patientenkollektiv (Lupussubtypen)

Bei der Testung mit UV-A-Licht zeigten 23% der SLE-, 36% der SCLE-, 38% der DLE- und 44% der LET-Patienten ein positives Testergebnis. In der Gruppe der CDLE-Patienten waren 100% nicht photosensitiv für UV-A-Licht.

Die Testreaktion mit UV-B- Licht war bei 33% der SLE-, 57% der SCLE-, 14% der CDLE-, 50 % der DLE- und bei 78% der LET-Patienten eindeutig positiv.

	Testreaktion positiv in %			Testreaktion negativ in %	
	n=	UV-A	UV-B	UV-A	UV-B
SLE	22 (A) bzw. 21 (B)	23	33	77	67
SCLE	14	36	57	64	43
CDLE	7	0	14	100	86
DLE	8	38	50	62	50
LET	9	44	78	56	22

Tabelle 4: Prozentuale Verteilung der Ergebnisse der Photoprovokation mit UV-A- und UV-B-Licht im LE-Patientenkollektiv

Die häufigste Photoprovokierbarkeit von Hautläsionen ergibt sich im Kollektiv der LET-Patienten, knapp gefolgt von SCLE.

Die Photosensitivität bei SLE und DLE zeigt nur wenig differierende Werte und scheint insgesamt etwas geringer.

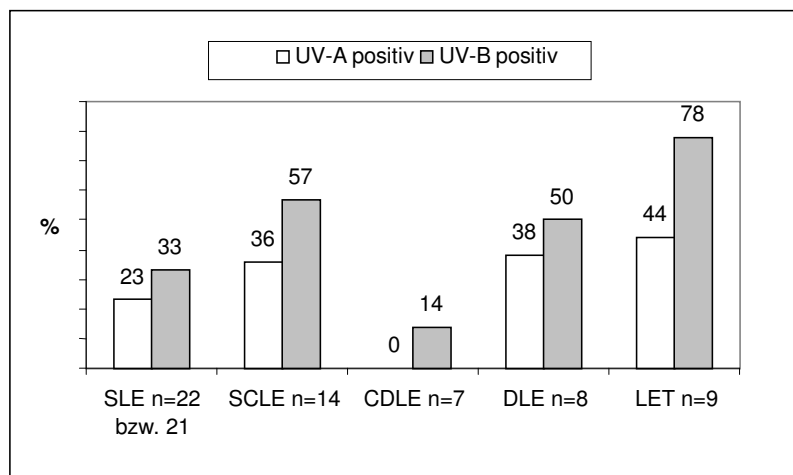


Abb. 3: Grafische Darstellung der positiven Lichttestung mit UV-A- und UV-B-Licht in den LE-Subtypen in Prozentwerten

Betrachtet man die Testergebnisse der Photoprovokation für UV-A- und UV-B-Licht getrennt, so findet man deutliche Unterschiede in der Reaktionsstärke auf die einzelnen Wellenlängen: Bei Patienten aus den Untergruppen SLE, SCLE und DLE ist die Photosensibilität für UV-B mäßig deutlicher ausgeprägt als für UV-A: 33% gegenüber 23% bei SLE, 57% gegenüber 36% bei SCLE und 50% gegenüber 38% bei DLE.

Im LET-Kollektiv ist die Empfindlichkeit für UV-B-Licht mit 78% wesentlich stärker ausgeprägt als für UV-A- Licht mit 44%.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Entstehung von Hautläsionen bei den verschiedenen LE-Subtypen auf der Ebene der Pathogenese wesentlich durch die Wellenlänge der Lichtexposition beeinflusst wird.

4.3 Autoantikörpermuster

Für diese Untersuchung wurde die Autoantikörperverteilung der Patientengruppe in den einzelnen Lupus-Subtypen betrachtet. Dabei lagen nicht von allen untersuchten Lupus-Patienten Daten über die Antikörper-Titer im Serum vor.

Serologisch positive Titer von antinukleären Antikörpern (ANA), sowie Ro- und La-Antikörpern wurden den verschiedenen Diagnosen und letztlich den Ergebnissen der Lichttestung gegenübergestellt.

4.3.1 Ro-/La-Autoantikörper

Anzahl		Ro		Gesamt
		negativ	positiv	
Diagnose	DLE	7	0	7
	SCLE	1	4	5
	SLE	5	12	17
	LET	3	1	4
	CDLE	2	2	4
	LEP	0	1	1
Gesamt		18	20	38

Tabelle 5: Ro-Autoantikörperprofil im LE-Patientenkollektiv (Lupussubtypen)

Anzahl		La		Gesamt
		negativ	positiv	
Diagnose	DLE	5	0	5
	SCLE	3	1	4
	SLE	4	5	9
	LET	2	1	3
	CDLE	1	1	2
Gesamt		15	8	23

Tabelle 6: La-Autoantikörperprofil im LE-Patientenkollektiv (Lupussubtypen)

Für die grafische Verteilung der Ro-Autoantikörper nach Anzahl in den einzelnen Lupus-Subgruppen ergibt sich folgendes Diagramm:

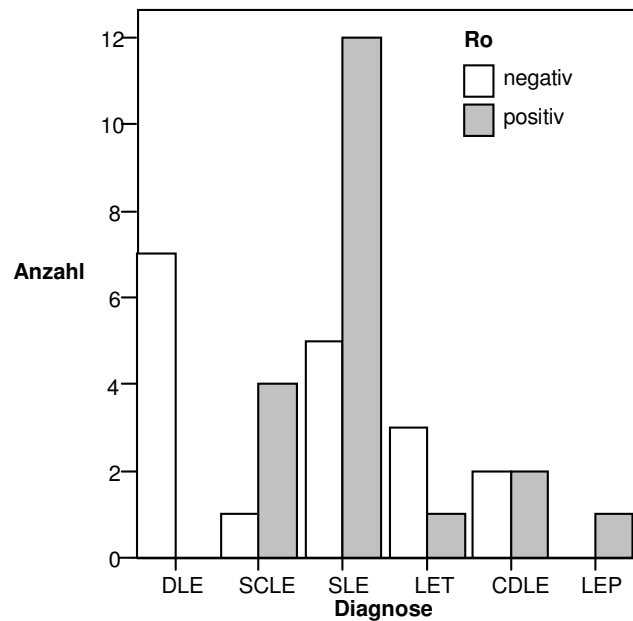


Abb. 4: Grafische Darstellung des Ro-Autoantikörperprofils in den LE-Subtypen (Anzahl)

Deutlich überwiegt in der Gruppe der SCLE- sowie der SLE-Patienten der serologisch Ro-Antikörper-positive Teil.

Der Vergleich der einzelnen LE-Subtypen in ihrer positiven Photoprovokation hinsichtlich des Ro-/La-Autoantikörpermusters zeigt folgende Verteilung:

Diagnose	UV-A positiv (%)		UV-B positiv (%)		Gesamt UV (%)	
	Ro positiv	La positiv	Ro positiv	La positiv	Ro positiv	La positiv
SLE	40	20	40	20	80	40
SCLE	20	20	40	0	60	20

Tabelle 7: Ro-/La-Autoantikörperprofil im LE-Patientenkollektiv und positive Lichttestung in Prozentwerten

Unabhängig von der Photoprovokation bilden 80% der SLE-Patienten Ro-Autoantikörper, nur 40% hingegen La-Autoantikörper. Bei den SCLE-Patienten beträgt der Anteil der Ro-positiven 60%, der Anteil der La-positiven 20%. Die Fallzahlen für LEP-, LET- und CDLE-Patienten waren so klein, dass sie bei den prozentualen Vergleichen nicht berücksichtigt wurden. Kein DLE-Patient des Kollektivs war Ro-/La-positiv. Hinweise auf einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Lupus-Unterform und der Bildung von Autoantikörpern finden sich nur für Ro-positive Patienten ($p=0,018$). Die Datenlage deutet daraufhin, dass sich dieses Ergebnis auf das Kollektiv der SLE- und SCLE-Patienten bezieht.

4.3.2 Antinukleäre Antikörper (ANA)

Anzahl	ANA		Gesamt	
	Negativ	Positiv		
Diagnose				
	DLE	4	5	9
	SCLE	4	6	10
	SLE	0	11	11
	LET	3	2	5
	CDLE	2	2	4
	LEP	0	1	1
Gesamt		13	27	40

Tabelle 8: ANA-Antikörperprofil im LE-Patientenkollektiv (Lupussubtypen)

Innerhalb der Patientengruppe ergibt sich bei den SLE-Patienten zu 100% ein positiver ANA-Titer. Aufgrund der geringen Datenmenge vor allem auch in Hinblick auf die Photoprovokation relativiert sich dieses Ergebnis allerdings und ist statistisch nicht als signifikant zu werten ($p=0,113$).

In den übrigen LE-Subformen fällt keine besondere Präferenz bezüglich ANA-Serologie auf.

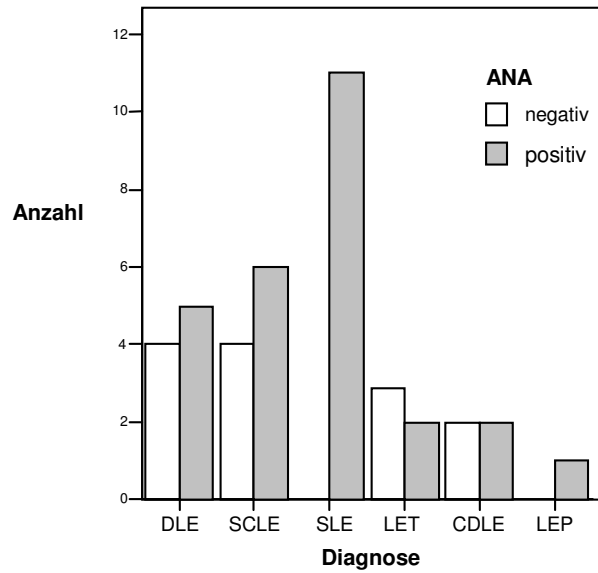


Abb.5: Grafische Darstellung des ANA-Antikörperprofils in den LE-Subtypen (Anzahl)

Die Autoantikörperverteilung innerhalb der verschiedenen LE-Subtypen unter Betrachtung ihrer positiven Phototestung zeigt statistisch keine signifikante Abweichung.

Ein Zusammenhang zwischen Autoantikörpermuster und positiver Photoprovokation kann in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

4.4 Fas-Gen-Promotor-Polymorphismus

4.4.1 Allelfrequenzen und Verteilung der Genotypen AA, AG und GG bei LE-Patienten und Kontrollen

Bei 107 Patienten aus verschiedenen LE-Untergruppen wurde eine Typisierung ihrer DNA hinsichtlich des Fas-Gen-Promotor-Polymorphismus -670 A/G (rs 1800682) durchgeführt.

Als Kontrollgruppe für den statistischen Vergleich sollte die Untersuchung der DNA von 96 zufällig ausgewählten, gesunden Studenten der Biologischen Fakultät auf die gleiche Weise dienen. Bei der Typisierung der Studenten-DNA-Proben ergab sich jedoch eine Allelverteilung, die von den erwarteten Werten für gesunde Individuen ($A=0,487$ und $G=0,512$) aus der Genomdatenbank deutlich abwich ($A=0,380$ und $G=0,619$). Genauere Rückschlüsse lassen sich in dieser Arbeit in Bezug auf die vorhandenen Daten leider nicht eruiieren. Weitere Studien könnten über derartige Zusammenhänge weitere Erkenntnisse liefern.

Aus diesem Grund wurde beschlossen, die berechneten Allelfrequenzen des Patientenkollektivs für den Fas-Gen-Promotor-Polymorphismus mit den Referenzwerten aus der Datenbank zu vergleichen, und die Studentenkontrollen als besondere Kontrollgruppe zum statistischen Vergleich der Genotypausprägung mitzuführen.

Die berechnete Allelfrequenz der Allele A und G des untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismus zeigt im Kollektiv der Lupuspatienten sehr ähnliche Werte ($A=0,519$ und $G=0,481$) mit der Referenzangabe für gesunde Individuen aus der SNP (single nucleotide polymorphism)-Datenbank ($A=0,487$ und $G=0,512$). Für andere Einzelnukleotidpolymorphismen aus dem HLA-Komplex (Chromosom 6p21) wurde eine normale Allelfrequenz entsprechend der SNP-Datenbank gefunden. Da sich die einzelnen Allele A und G aber zu verschiedenen Genotypen unterschiedlich zusammenfügen, wird im Folgenden die Genotypenverteilung genauer auf statistische Abweichungen untersucht.

Dabei ergibt sich unabhängig vom LE-Subtyp folgende Genotypenverteilung:

Anzahl	Polymorphismus			Gesamt
	AA	AG	GG	
LE-negativ (Studentenkontrolle)	11	51	34	96
LE-positiv	29	53	25	107
Gesamt	40	104	59	203

Tabelle 9: Genotypverteilung bei LE- Patienten und Studentenkontrollen, unabhängig von Lupussubtyp

Stellt man diese Absolutwerte grafisch in einem Diagramm dar, ergibt sich folgendes Bild der Genotypenverteilung:

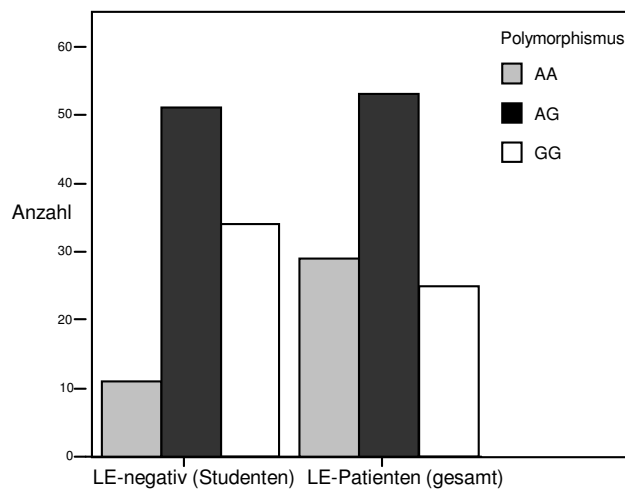


Abb. 6: Grafische Darstellung der Genotypverteilung bei LE-Patienten (AA 29, AG 53, GG 25) und Studenten (AA 11, AG 51, GG 34), unabhängig vom Lupussubtyp (Anzahl)

In Prozentwerten ausgedrückt zeigt die Häufigkeitsverteilung der Genotypen:

Genotyp	Häufigkeit (%)		
	AA	AG	GG
LE n=107	27	50	23
Kontrolle (Studenten) n=96	11,5	53	35,5

Tabelle 10: Genotypverteilung bei Patienten und Kontrollen (Studenten) in Prozentwerten, unabhängig vom Lupussubtyp

Anschauliche Gegenüberstellung der Prozentwerte bei LE-Patienten und Studentenkontrollen im Blockdiagramm:

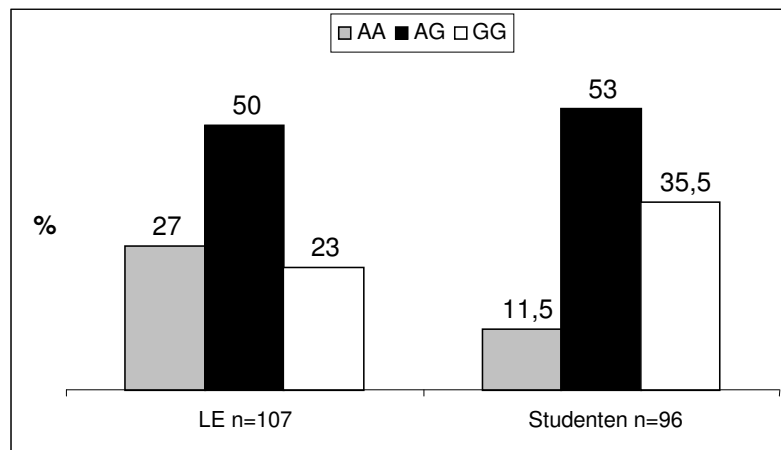


Abb. 7: Grafische Darstellung der Genotypverteilung bei Patienten und Studentenkontrollen, unabhängig vom Lupussubtyp in Prozentwerten

Der prozentuale Anteil der Homozygotie des A-Allels in der Patientengruppe unterscheidet sich mit 27% deutlich vom Vergleichswert der Studentenkontrollgruppe mit 11,5%.

Relativ ähnliche Werte zeigen sich für die Verteilung Heterozygotie AG in beiden Gruppen (50%- 53%).

Für Homozygotie des G-Allels im Patientenkollektiv ein prozentualer Anteil von 23% als Kontrast zu 35,5% in der Studentengruppe.

Bei der statistischen Analyse mit Chi-Quadrat-Test und Exaktem Test nach Fisher ergibt sich für den AA-Genotyp im typisierten LE-Patientenkollektiv eine signifikante Abweichung von der Studentengruppe mit $p=0,011$. Dichotomisiert den anderen Genotypausprägungsformen AG und GG gegenübergestellt wird die Signifikanz noch deutlicher ($p=0,005$).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein Zusammenhang der Erkrankung Lupus erythematodes mit dem Genotyp AA an der untersuchten Stelle im Fas-Gen-Promotor besteht, obwohl sich bei der Untersuchung der Verteilung der einzelnen Allele keine statistisch signifikante Abweichung ergibt.

4.4.2 Verteilung der Genotypen AA, AG und GG auf die einzelnen Lupusformen

Schlüsselt man die Patientengruppe nach den verschiedenen LE-Subtypen auf, entsteht folgende Verteilung der Genotypen:

Genotypen (%)	AA	AG	GG
SLE n=46	37	46	17
SCLE n=22	27	59	14
CDLE n=14	14	57	29
LET n=9	0	56	44
LEP n=2	0	0	100
DLE n=14	29	42	29
Studenten n=96	11,5	53	35,5

Tabelle 11: Genotypverteilung im Patientenkollektiv (Prozentwerte) nach Lupussubtypen

Die Häufigkeitsverteilung des heterozygoten Genotyps AG ist vergleichsweise ähnlich in allen Gruppen, ohne statistisch signifikante Hinweise auf eine bestimmte Prävalenz zu geben. Bei der Betrachtung der Homozygotie für das jeweilige Allel in den einzelnen Lupusunterformen, fällt auf, dass 37% der SLE- und 27% der SCLE-Patienten eine Homozygotie für das A-Allel zeigen. In der gleichen Patientengruppe haben jedoch nur 17 bzw. 14% Homozygotie des G-Allels.

Fokussiert auf das Homozygotie des A-Allels innerhalb der LE-Subtypen im Vergleich zu der Kontrollgruppe findet man folgende Verteilung:

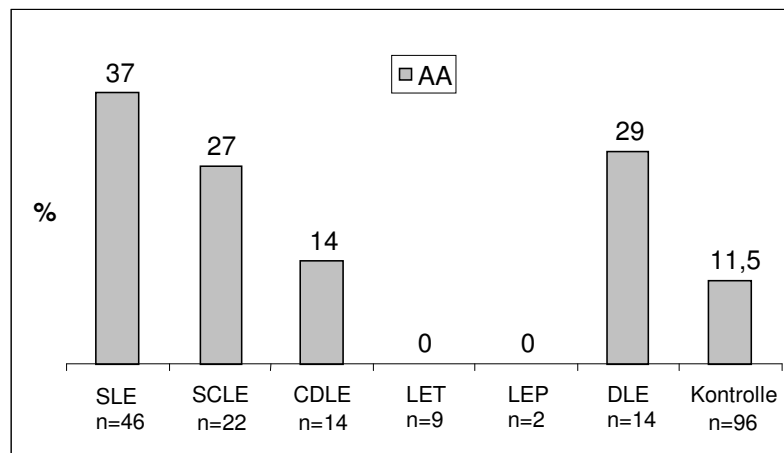


Abb. 8: Grafische Darstellung der Genotypverteilung LE-Patienten/Studentenkontrollen nach Lupussubtypen in Prozentwerten

Stellt man bei der statistischen Untersuchung Homozygotie für das A-Allel dichotomisiert den anderen Ausprägungsformen (nicht-AA: AG, GG) gegenüber und fokussiert dabei gezielt auf die einzelnen Lupusuntergruppen, ergibt sich für SLE ein statistisch grenzwertig signifikantes Ergebnis ($p=0,046$). Es besteht also ein möglicher Zusammenhang zwischen dem AA-Genotyp des untersuchten Fas-Gen-Promotor-Polymorphismus und dem Auftreten von systemischem Lupus erythematodes.

Für die anderen Lupussubtypen lässt sich keine statistische Signifikanz für den Polymorphismus und den AA-Genotyp nachweisen.

4.4.3 Assoziation der Genotypen AA, AG und GG mit den Ergebnissen der Photoprovokation

Stellt man die Patienten mit positiver Photoprovokation, unterteilt nach Wellenlänge des Empfindlichkeitsspektrums in UV-A und UV-B, den einzelnen Genotypausprägungsformen des Fas-Gen-Promotor-Polymorphismus gegenüber, zeigt sich folgende Verteilung:

		Polymorphismus			Gesamt
		AA	AG	GG	
UV-A- Empfindlichkeit	Negativ	10	24	9	43
	Positiv	4	9	4	17
Gesamt		14	33	13	60

Tabelle 12: Genotypverteilung im LE-Patientenkollektiv (Anzahl) und Lichttestung mit UV-A

		Polymorphismus			Gesamt
		AA	AG	GG	
UV-B- Empfindlichkeit	Negativ	9	17	6	32
	Positiv	4	16	7	27
Gesamt		13	33	13	59

Tabelle 13: Genotypverteilung im LE-Patientenkollektiv (Anzahl) und Lichttestung mit UV-B

Auch bei Betrachtung der prozentualen Häufigkeitsverteilung ist kein gehäuftes Vorkommen eines Genotyps in Abhängigkeit von der Photoprovokation auffällig.

Genotyp (%)	AA	AG	GG
UV-A positiv	23,5	53	23,5
UV-B positiv	15	59	26

Tabelle 14: Genotypverteilung im Patientenkollektiv (Prozentwerte) und positive Photoprovokation

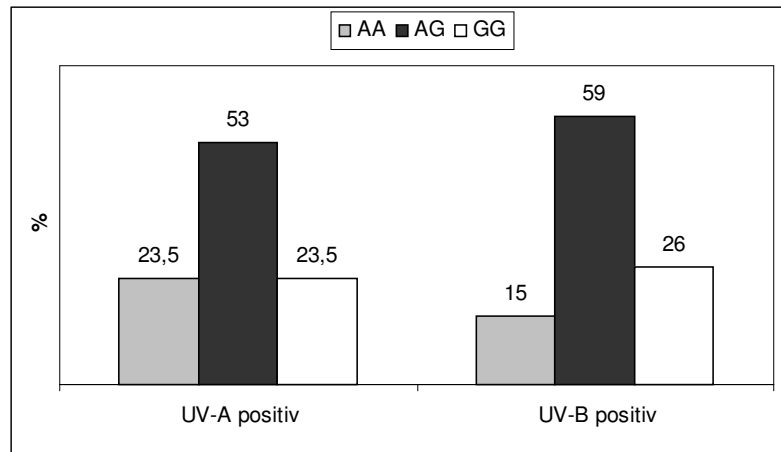


Abb. 9: Grafische Darstellung der Genotypverteilung im Patientenkollektiv und positive Photoprovokation in Prozentwerten

Unabhängig vom Lupussubtyp findet sich auch unter dichotomisierter Betrachtung der einzelnen Wellenlängenspektren UV-A ($p=0,614$) und UV-B ($p=0,345$) keine statistisch relevante Abweichung, die auf einen Zusammenhang der positiven Photoprovokation und Induzierung von Hautläsionen mit dem untersuchten Fas-Gen-Promotor-Polymorphismus hinweist.

Aufgrund der sehr kleinen Gruppengrößen bei Aufschlüsselung des typisierten Patientenkollektivs in seiner positiven Photoprovokation nach Lupussubtypen wird auf eine tabellarische und grafische Darstellung der Ergebnisse hier weitgehend verzichtet. Die vorhandenen Daten lassen jedoch nicht auf einen statistisch relevanten Zusammenhang aus Photosensitivität, Lupussubtyp und Genotypausprägungsform schließen.

UV-A positiv	AA	AG	GG	UV-B positiv	AA	AG	GG
SLE	0	4	0	SLE	0	6	1
LET	0	1	2	LET	0	5	2
SCLE	3	2	0	SCLE	2	4	2
DLE	1	1	1	DLE	2	0	2

Tabelle 15: Genotypverteilung in den Lupus-Subtypen (Anzahl) und positive Photoprovokation

4.4.4 Zusammenhang der Genotypen AA, AG und GG mit dem serologischen Autoantikörpermuster

Unter Betrachtung der Genotypverteilung des untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismus im typisierten Patientenkollektiv wird ein möglicher Zusammenhang mit dem serologischen Autoantikörpermuster des Einzelnen überprüft.

4.4.4.1 Ro-/La-Autoantikörper

Für die Patienten mit positivem serologischen Nachweis von Ro-Autoantikörpern ergibt sich folgende Verteilung der Genotypen des Polymorphismus (rs 1800682):

		AA	AG	GG	Gesamt
Ro	positiv	8	10	2	20
	negativ	2	8	8	18
Gesamt		10	18	10	38

Tabelle 16: Genotypverteilung im LE-Patientenkollektiv (Anzahl) und Ro-Autoantikörperprofil

Dichotomisierte Gegenüberstellung des homozygoten AA-Genotyps gegen die anderen möglichen Ausprägungsformen (AG, GG) weist auf sein vermehrtes Vorkommen in dem Ro-positiven Patientenkollektiv hin.

		Polymorphismus dichotomisiert		Gesamt
		AA	Nicht AA	
Ro	Negativ	2	16	18
	Positiv	8	12	20
Gesamt		10	28	38

Tabelle 17: Genotypverteilung dichotomisiert im Patientenkollektiv (Anzahl) und Ro-Autoantikörperprofil

Im Blockdiagramm grafisch dargestellt wird dies deutlich erkennbar:

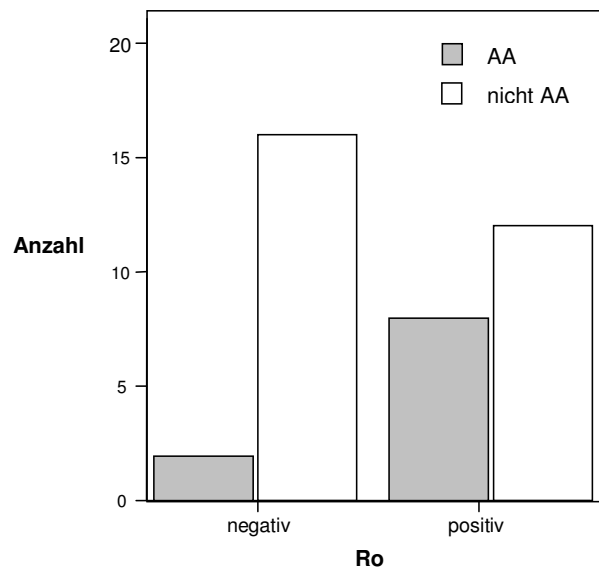


Abb. 10: Grafische Darstellung der Genotypverteilung (dichotomisiert) im Patientenkollektiv und Ro-Autoantikörperprofil (Anzahl)

Unabhängig vom jeweiligen Lupussubtyp stellt sich in der statistischen Analyse ein signifikant ausgeprägter Zusammenhang der Homozygotie für das A-Allel mit positivem Ro-Autoantikörpertiter dar ($p=0,067$). Bei Gegenüberstellung der beiden Genotypen AA und GG wird dieser Zusammenhang noch deutlicher ($p=0,023$).

Im La-Autoantikörper-positiven Patientengruppe ergibt sich keine statistisch relevante Signifikanz für den untersuchten Polymorphismus, auch nicht bei dichotomisierter Betrachtung des AA-Genotyps ($p=0,474$ bzw. $p=0,621$ (dichotomisiert)).

Die Ergebnisse in tabellarischer und grafischer Form zeigen bei insgesamt kleiner Gruppengröße keine Betonung im Genotypverteilungsmuster. Auf eine grafische Darstellung der dichotomisierten Gegenüberstellung wird deshalb hier verzichtet.

	AA	AG	GG	Gesamt
La positiv	3	4	1	8
La negativ	3	7	5	15
Gesamt	6	11	6	23

Tabelle 18: Genotypverteilung im Patientenkollektiv (Anzahl) und La-Autoantikörperprofil

		Polymorphismus dichotomisiert		Gesamt
		AA	Nicht AA	
La	Negativ	3	12	15
	Positiv	3	5	8
Gesamt		6	17	23

Tabelle 19: Genotypverteilung dichotomisiert im Patientenkollektiv (Anzahl) und La-Autoantikörperprofil

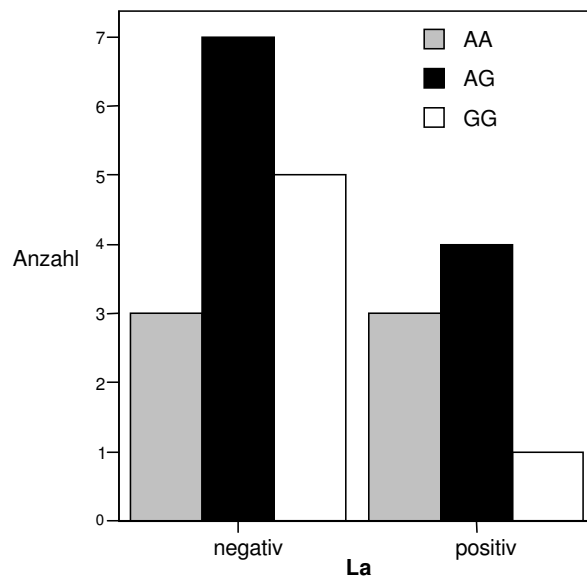


Abb. 11: Grafische Darstellung der Genotypverteilung im LE-Patientenkollektiv und La-Autoantikörperprofil (Anzahl)

4.4.4.2 Antinukleäre Antikörper (ANA)

Bei den typisierten Patienten mit positivem ANA-Titer im Serum ist keine statistisch signifikante Häufung eines Genotyps zu beobachten ($p=0,683$), was aufgrund der nahezu äquivalenten Verteilung der Homozygotie für die Allele im untersuchten LE-Patientenkollektiv bereits zu erwarten war.

		Polymorphismus dichotomisiert			Gesamt
		AA	AG	GG	
ANA	Negativ	3	6	4	13
	Positiv	7	15	5	27
Gesamt		10	21	9	40

Tabelle 20: Genotypverteilung im Patientenkollektiv (Anzahl) und ANA-Antikörperprofil

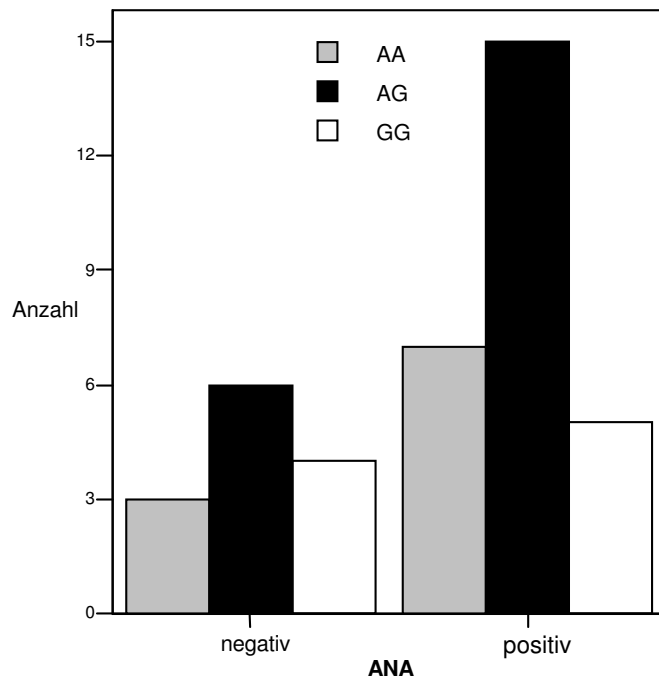


Abb. 12: Grafische Darstellung der Genotypverteilung und ANA-Antikörperprofil (Anzahl)

Bei Aufschlüsselung des typisierten Patientenkollektivs in seinem serologischen Autoantikörpermuster nach Lupussubtypen ergeben sich sowohl für die Ro-/La-Antikörper als auch für die antinukleären Antikörper, ähnlich wie bei der Photoprovokation, sehr kleine Gruppengrößen. Auf eine tabellarische und grafische Darstellung dieser Ergebnisse wird auch hier weitgehend verzichtet.

Ro-positiv	AA	AG	GG	Ro-negativ	AA	AG	GG
SLE	7	5	0	SLE	0	3	2
SCLE	1	3	0	SCLE	0	1	0

Tabelle 21: Genotypverteilung in den Lupussubtypen (Anzahl) und Ro-Autoantikörperprofil

ANA-positiv	AA	AG	GG	ANA-negativ	AA	AG	GG
SLE	4	6	1	SLE	0	0	0
SCLE	2	4	0	SCLE	1	2	1

Tabelle 22: Genotypverteilung in den Lupussubtypen (Anzahl) und ANA-Antikörperprofil

Dabei lassen die vorhandenen Ergebnisse nicht auf einen statistisch relevanten Zusammenhang des Antikörpermusters vor allem mit einem bestimmten Lupussubtyp in Verbindung mit einer Genotypausprägungsform des Fas-Gen-Promotor-Polymorphismus schließen.

5 Diskussion

Der Lupus erythematoses (LE) ist eine nicht-organspezifische Autoimmunerkrankung und gehört zur übergeordneten Krankheitsgruppe der Kollagenosen. Als rheumatologisch-immunologische Systemerkrankungen spielen sich diese Krankheitsbilder in generalisierter Form, vor allem an Haut und Bindegewebe ab, verbunden mit der Bildung bestimmter Autoantikörpermuster und der Ablagerung von Immunkomplexen. Die Krankheitsentität Lupus erythematoses in ihren verschiedenen Unterformen beschreibt eine Systemerkrankung der Haut und des Gefäßbindegewebes mit Vaskulitis und Perivaskulitis der kleinen Arterien und Arteriolen (22). Im weiteren Krankheitsverlauf können prinzipiell verschiedene Organe durch die Folgen dieser Vaskulitis befallen sein.

Für die Ätiopathogenese des Lupus erythematoses scheint ein Zusammenspiel vieler Faktoren verantwortlich zu sein. In ihrer Komplexität ist sie bisher nicht vollständig aufgeklärt.

Bestimmte Umweltfaktoren wie Viren, Medikamente, Chemikalien oder UV-Strahlung bewirken im Zusammenspiel mit einer gleichzeitig vorhandenen genetischen Disposition eine Veränderung in der Regulation der Immunantwort (24). Die daraus resultierende Störung der Selbst- und Fremderkennung äußert sich in einer überschiessenden Produktion von Autoantikörpern, nicht-organspezifischen Komplementbindungsreaktionen und einer verminderten zellulären Immunität.

Verschiedene Kandidatengene scheinen für die genetische Prädisposition zur Entwicklung und Regulation einer Autoimmunreaktion von besonderer Bedeutung zu sein, darunter TNF- α , Fas, FasL, bcl-2 und DNase1 (26, 34, 49, 80).

An der Entstehung von nicht-organspezifischen Autoimmunerkrankungen wie dem Lupus erythematoses scheint vor allem eine Fehlfunktion der Apoptose maßgeblich beteiligt zu sein.

Die aktuelle Forschung ist deshalb bemüht, einen direkten Zusammenhang der Apoptose-induzierenden Gene mit einer gesteigerten Suszeptibilität für Autoimmunerkrankungen nachzuweisen (3, 10, 12, 35, 36, 80).

Ganz aktuell untersuchten zum Beispiel Chen et al. (11, 12) 2006 mögliche Assoziationen von Apoptose-beeinflussenden Mikrosatelliten-Polymorphismen auf Chromosom 1q (u.a. FasL) mit systemischem Lupus erythematoses anhand eines sehr großen Patientenkollektivs.

Von besonderem Interesse ist dabei, wie weit immungenetische Variationen auf Einzelnukleotidebene die unterschiedlichen Ausprägungsformen einer Autoimmunreaktion beeinflussen können und sich im klinischen Bild einer Erkrankung widerspiegeln.

Ziel dieser Arbeit war, aus der Untersuchung eines umschriebenen Einzelnukleotidpolymorphismus in der Promotorregion des Gens für den Fas-Rezeptor abzuleiten, ob eine Assoziation zwischen dem programmierten Zelltod und der Krankheitsentität Lupus erythematodes in ihren Subtypen besteht. Die Suche nach Hinweisen auf einen Zusammenhang mit einer gesteigerten Lichtempfindlichkeit sowie einem bestimmten Autoantikörperprofil im Serum sollte dabei im Mittelpunkt stehen.

Als Mitglied der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie wird Fas/ CD95 besonders von den Gewebearten verstärkt exprimiert, die im menschlichen Körper an der Immunantwort beteiligt sind, wie Haut, Thymus und Intestinaltrakt. Seine Expression auf aktivierten B- und T-Lymphozyten ist wichtig für die Lymphozytenselektion im Thymus und die Ausbildung peripherer Toleranz. Das Ausmaß der Fas-Expression kann durch proinflammatorische Zytokine, wie Interferon γ oder TNF α gesteigert werden. Vor allem im Rahmen von Entzündungsprozessen scheint das von Bedeutung zu sein (7). Der dazugehörige Ligand FasL (CD178) wird vor allem von aktivierten T-Lymphozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert, von deren Zellmembran er durch Metalloproteasen abgelöst werden kann. In gelöster Form behält er seine apoptose-induzierenden Fähigkeiten jedoch bei. Die Promotorregion des Fas-Gens enthält Sequenzen, an die zahlreiche Transkriptionsfaktoren binden (24). Dort findet sich in der Enhancerregion an der Nukleotidstelle -670 ein Einzelnukleotidaustausch der Basen A und G.

Für diese Arbeit wurde ein Kollektiv von 107 Patienten untersucht, die alle unter der Diagnose „Lupus“ in einer ihrer Unterformen an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München sowohl stationär als auch über eine Spezialsprechstunde für Autoimmundermatosen betreut worden waren. Bei allen Patienten wurde eine Typisierung ihrer DNA hinsichtlich des Fas-Gen-Promotor-Polymorphismus -670 A/G durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Methoden angewandt, wobei die erste (Allel-spezifische PCR) als Hauptmethode zur statistischen Auswertung zum Einsatz kam, während die zweite (SSCP-Analyse) nur stichprobenartig die Ergebnisse der Hauptmethode validieren sollte. Als Kontrollgruppe für den statistischen Vergleich sollte ein Kollektiv von 96 zufällig ausgewählten, gesunden Studenten der Biologischen Fakultät

dienen. Bei der Typisierung der Studenten-DNA-Proben ergab sich jedoch eine Allelverteilung, die von den erwarteten Werten für gesunde Individuen ($A=0,487$ und $G=0,512$) aus der Genomdatenbank deutlich abwich ($A=0,380$ und $G=0,619$). Möglicherweise unterscheidet sich die Allelfrequenz in Bayern von den anderen getesteten Gruppen in Europa. Die Population steht jedoch im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und die DNA-Typisierung wurde mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt, so dass Fehler in der Allelzuordnung ausgeschlossen werden können. Genauere Rückschlüsse lassen sich in dieser Arbeit in Bezug auf die vorhandenen Daten leider nicht eruieren. Weitere Studien könnten über derartige Zusammenhänge weitere Erkenntnisse liefern. Die Studentenkontrollen wurden als besondere Nebengruppe zum statistischen Vergleich der Genotypausprägung mitgeführt.

Die berechneten Allelfrequenzen des Patientenkollektivs für den Fas-Gen-Promotor-Polymorphismus wurden mit den Referenzwerten aus der Genomdatenbank verglichen. Dabei zeigte die berechnete Allelfrequenz der Allele A und G des untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismus im Kollektiv der Lupuspatienten nahezu identische Werte ($A=0,519$ und $G=0,481$) mit der Referenzangabe für gesunde Individuen ($A=0,487$ und $G=0,512$). Zunächst scheint dadurch eine statistisch relevante Assoziation eines bestimmten Allels mit der Krankheitsentität Lupus erythematodes eher unwahrscheinlich. Wenn man aber nun berücksichtigt, dass sich die einzelnen Allele A und G zu verschiedenen Genotypen unterschiedlich zusammenfügen, ist eine besondere Betrachtung der Genotypenverteilung des Polymorphismus in Hinblick auf einen Zusammenhang mit der Krankheitsentstehung eindeutig gerechtfertigt. Im Folgenden wurde vor allem auf den homozygoten AA-Genotyp fokussiert. Bei der statistischen Analyse ergab sich für die Homozygotie des AA-Genotyps im typisierten LE-Patientenkollektiv eine signifikante Abweichung von der gesunden Studentengruppe, die bei dichotomisierter Gegenüberstellung der anderen Genotypausprägungsformen noch deutlicher ausgeprägt war.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung lassen einen direkten Zusammenhang der Erkrankung Lupus erythematodes mit dem Genotyp AA im untersuchten Fas-Gen-Promotor-Einzelnukleotidpolymorphismus vermuten. Obwohl die physiologische Bedeutung dieses Polymorphismus bisher nicht vollständig aufgeklärt ist, scheint seine Lage in der Konsensussequenz des Zellkern-Transkriptionselements GAS (gamma interferon activated site) die Fas-Gen-Transkription zu beeinflussen (29, 35).

Durch Veränderung der Bindungsstelle des GAS bindet der Transkriptionsfaktor STAT1 dort mit variabler Intensität. Besonders stark scheint diese Bindung bei Vorhandensein des A-Allels an Stelle -670 ausgeprägt zu sein. Über die daraus resultierende Variation der Transkriptionsrate des Fas-Gens wird möglicherweise die Apoptoserate der Fas-exprimierenden Zellen gesteuert und damit die Entstehung einer Autoimmunreaktion begünstigt.

Der Bildung von Autoantikörpern beim Lupus erythematoses scheint ein vermehrter Anfall von zirkulierenden Zellkernantigenen zu Grunde zu liegen. Diese Hypothese beruht auf der Beobachtung, dass in der Endphase der Apoptose Bestandteile aus dem Zellkern in kleinen Bläschen, so genannten *blebs* auf der Zelloberfläche den immunkompetenten Zellen als potentielle Autoantigene präsentiert werden (9). Durch autoreaktive T-Lymphozyten werden aktivierte B-Lymphozyten in Folge zur Autoantikörperproduktion gegen das akkumulierende, apoptotische Zellmaterial angeregt.

Als Auslöser für diesen vermehrten Anfall zirkulierender, antigener Zellbestandteile ist eine verminderte Beseitigung von apoptotischem Zellmaterial bei insgesamt normaler Apoptoserate durch einen Defekt der Phagozytose denkbar. Eine allgemein gesteigerte Apoptoserate mit konsekutiv verstärktem Zellzerfall erscheint als weitere Erklärungsmöglichkeit plausibel (24).

Um den beobachteten Zusammenhang des untersuchten Fas-Gen-Promotor-Einzelnukleotidpolymorphismus mit der Krankheitsentität Lupus erythematoses genauer zu spezifizieren, wurde das Patientenkollektiv im Folgenden nach Lupusuntergruppen differenziert.

Im Mittelpunkt der Untersuchung standen dabei der subakut-kutane Lupus erythematoses (SCLE) mit Hautsymptomatik und nur milder Organbeteiligung sowie die systemische Form des Lupus erythematoses (SLE) mit ausgeprägter Multiorganbeteiligung. Beiden Krankheitsbildern ist gemeinsam, dass sie nicht selten mit einer gesteigerten Lichtempfindlichkeit einhergehen und bestimmte Autoantikörpermuster im Serum zeigen.

In der Gruppe der SLE- und der SCLE-Patienten hatte bei der Typisierung der DNA unabhängig von allen anderen klinischen Parametern eine auffällig große Prozentzahl Homozygotie für das A-Allel. Bei Fokussierung auf die einzelnen Lupusuntergruppen ergab sich dabei jedoch nur für SLE ein statistisch signifikantes Ergebnis. Folglich ist ein relevanter Zusammenhang zwischen A-Homozygotie im Genotyp des untersuchten Fas-Gen-Promotor-

Polymorphismus und systemischem Lupus erythematoses anzunehmen. Dieses Ergebnis bekräftigt die Annahme, dass der programmierte Zelltod maßgeblich zur Induktion einer Autoantikörperproduktion beiträgt, die gerade bei der systemischen Form des Lupus erythematoses das klinische Ausmaß bestimmt.

In einer vergleichbaren Studie bei 109 japanischen Lupus-Patienten kamen Kanemitsu et al. 2002 zu einem ähnlichen Ergebnis (35). Nicht bestätigen konnten Huang et al. (30) 1999 einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen A-Homozygotie des untersuchten Fas-Gen-Promotor-Polymorphismus und SLE bei Patienten europäischer Abstammung. Nach eigenen Aussagen relativierte sich dieses Ergebnis allerdings durch die geringe Ausgangsdatenmenge und erlaubte keine endgültige Aussage über eine mögliche Assoziation. Ähnliches gilt für die Studie von Young Ho Lee et al. (43) aus dem Jahr 2001. Nolsoe et al. (55) sahen 2006 einen Zusammenhang des untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismus mit einer ausgeprägten Thrombozytopenie bei SLE-Patienten. Aufgrund der geringen Datenmenge für Thrombozytopenie in der für diese Arbeit untersuchten Patientengruppe aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München kann dazu keine statistische Vergleichsaussage angestellt werden. Für die anderen Lupussubtypen ließ sich keine statistische Signifikanz für den Polymorphismus und einen bestimmten Genotyp nachweisen. In der Literatur waren dazu keine Vorarbeiten vorhanden.

Die Autoantikörper bei Lupus erythematoses richten sich gegen allgemeine Zellkernbestandteile wie Doppelstrang-DNA, Histone oder Ribonukleoproteine. Autoantikörper gegen die Ribonukleoproteine Ro und La finden sich gehäuft im Serum lichtempfindlicher Lupus-Patienten (SCLE, SLE), können jedoch nicht als sine qua non-Merkmal für Photosensibilität gelten (54).

An der Oberfläche von menschlichen Keratinozyten, die *in vitro* mit UV-Licht bestrahlt worden waren, ließen sich im Rahmen von experimentellen Studien vermehrt Ro- und La-Antigene nachweisen (26). Eine gesteigerte Autoantikörperbildung gegen diese Ribonukleoproteine könnte also die Folge einer UV-getriggerten Keratinozytenapoptose sein, an deren Ende Zellkernbestandteile an der Zelloberfläche dem Immunsystem präsentiert werden.

In der Literatur variieren die Prozentangaben für das Auftreten von Ro-Antikörpern von 40-82% bei SCLE (22) und 30-60% für SLE (22). La-Autoantikörper finden sich insgesamt seltener mit einer Häufigkeit von 12-71% bei SCLE (22) und rund 10% bei SLE (22). Ihre

Ausprägung scheint in der Regel an das gleichzeitige Vorhandensein von Ro-Antikörpern gebunden zu sein.

Im untersuchten Patientenkollektiv zeigt die Autoantikörperverteilung innerhalb der verschiedenen LE-Subtypen unter Betrachtung ihrer positiven Phototestung keine statistisch signifikante Abweichung, so dass ein Zusammenhang zwischen Autoantikörpermuster und positiver Photoprovokation in dieser Arbeit nicht bestätigt werden kann.

Unabhängig von der Photoprovokation zeigten in der beschriebenen Patientengruppe vor allem SCLE- und SLE-Patienten deutlich positive Ro-Autoantikörpertiter. Hinweise auf einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Lupus-Subtyp und der Bildung von spezifischen Autoantikörpern ließen sich dabei für die Ro-positiven SLE- und SCLE-Patienten bestätigen. Da diese beiden Lupussubtypen üblicherweise mit einer ausgeprägten Lichtempfindlichkeit im klinischen Bild einhergehen, ist möglicherweise die vorhandene Datenmenge einfach zu gering, um einen statistisch wirksamen Zusammenhang zwischen Autoantikörpermuster und positiver Photoprovokation abzuleiten. Die Untersuchung der La-positiven LE-Patientengruppe ergab auch bei weiterer Differenzierung keine statistisch signifikante Abweichung. Ein positiver ANA-Titer bei allen SLE-Patienten des Kollektivs relativierte sich aufgrund der geringen Datenmenge vor allem auch in Hinblick auf die Photoprovokation als statistisch nicht signifikant. In den übrigen LE-Subformen war keine besondere Prävalenz bezüglich ANA-Serologie zu beobachten.

Unter Betrachtung der Genotypverteilung des untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismus wurde im typisierten Patientenkollektiv ein möglicher Zusammenhang mit dem serologischen Autoantikörpermuster überprüft. Unabhängig von der jeweiligen Lupuserkrankungsform ergab die statistische Analyse dabei einen signifikant ausgeprägten Zusammenhang der Homozygotie für das A-Allel mit einem positiven Ro-Autoantikörpertiter. Dieses Ergebnis legt einen direkten Zusammenhang zwischen der Bildung von Autoantikörpern gegen Ro-Ribonukleoproteine und dem AA-Genotyp des untersuchten Fas-Gen-Promotor-Einzelnukleotidpolymorphismus nahe. In der Literatur ist ein vergleichbares Ergebnis bisher nicht vorbeschrieben. Young Ho Lee et al. (43) beobachteten 2001 eine Assoziation der A-Homozygotie an Stelle -670 im Fas-Gen-Promotor mit der Bildung von Anti-RNP-Antikörpern, einen Zusammenhang mit positivem Ro-Serumtiter mussten sie jedoch verneinen.

Eine signifikante Abweichung für A-Homozygotie des untersuchten Fas-Gen-Promotor-Polymorphismus zeigt sich in dieser Arbeit nur bei Patienten mit positivem Ro-Antikörpertiter, ohne gleichzeitig statistisch relevante Ergebnisse bei positiver Photoprovokation zu ergeben. Es bleibt also die Frage offen, ob möglicherweise nur nicht-photosensitive Patienten mit positivem Serumtiter von Ro-Autoantikörpern A-homozygot sind. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Datenmenge der Photoprovokationsergebnisse einfach zu klein ist, um genauere Aussagen zu treffen.

Bei Aufschlüsselung des typisierten Patientenkollektivs nach Lupussubtypen ergaben sich sowohl für die Ro-/La-Antikörper als auch für die antinukleären Antikörper sehr kleine Gruppengrößen. Aus den resultierenden Ergebnissen ließ sich deshalb nicht auf einen statistisch relevanten Zusammenhang des Antikörpermusters in den jeweiligen Lupusuntergruppen mit einer Genotypausprägungsform des Fas-Gen-Promotor-Polymorphismus schließen.

Ein multifaktorielles Zusammenspiel zwischen Umweltfaktoren wie UV-Strahlen-Exposition, Autoantikörpermuster, genetischem Hintergrund und anderen Faktoren bedingt die Entwicklung einer gesteigerten Lichtempfindlichkeit bei Patienten mit Lupus erythematoses (57, 63). Als möglicher Entstehungsmechanismus für diese Photosensitivität wird vor allem ein vermehrter Untergang von suprabasalen Keratinozyten der Haut durch programmierten Zelltod sowie eine ungenügende oder veränderte Beseitigung des apoptotischen Zellmaterials durch Phagozyten diskutiert (2, 9, 29, 53).

In Folge der durch UV-Strahlung induzierten Keratinozytenapoptose werden dabei Zellbestandteile wie DNA und Ribonukleoproteine auf der Zelloberfläche für immunkompetente Zellen als Autoantigene sichtbar (23). Autoantikörper wie ANA, Ro und La werden gebildet, binden an die Autoantigene und führen entweder direkt (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity ADCC) oder komplementvermittelt zu einer vollständigen Lyse des apoptotischen Keratinozyten. Die charakteristischen Hautveränderungen bei photosensitiven Lupusformen, wie auch eine immunkomplexvermittelte systemische Krankheitsexazerbation nach Sonnenlichteinwirkung lassen sich über die vermehrte Bildung von Autoantikörpern im Rahmen des UV-induzierten Keratinozytenuntergangs erklären (24).

Eine Vielzahl von Apoptose-induzierenden Kandidatengen wurde bereits auf einen möglichen Zusammenhang mit einer gesteigerten Suszeptibilität für Photosensitivität untersucht (2, 33). Für den in dieser Arbeit untersuchten Fas-Gen-Promotor-Einzel-nukleotidpolymorphismus konnten immungenetische Variationen einer möglichen stringenten Assoziation zwischen programmiertem Zelltod und gesteigerter Lichtempfindlichkeit auf Einzelnukleotidebene nicht bestätigt werden.

In der Literatur rangieren die Prozentangaben für Photosensibilität von 11-94% bei SLE- und 52-100% für SCLE-Patienten (59, 60). Entsprechend zeigte sich im untersuchten Patientenkollektiv in der Gruppe der LET- und der SCLE-Patienten die häufigste Photoprovozierbarkeit von Hautläsionen, unabhängig von der Wellenlänge ihres Empfindlichkeitsspektrums. Bei den SLE- und DLE-Patienten war die Lichtempfindlichkeit insgesamt etwas geringer gewesen. Das Kollektiv der LET-Patienten konnte bei der statistischen Auswertung jedoch aufgrund seiner extrem kleinen Größe nicht berücksichtigt werden.

Bei Gegenüberstellung der Lichttestungsergebnisse der Patienten und der Genotypausprägungsformen fand sich keine statistisch relevante Abweichung, die auf einen Zusammenhang der positiven Photoprovokation und Induzierung von Hautläsionen mit dem untersuchten Fas-Gen-Promotor-Polymorphismus hinwies. Aufgrund der sehr kleinen Gruppengrößen bei Aufschlüsselung des typisierten Patientenkollektivs in seiner positiven Photoprovokation nach Lupussubtypen ließen die Ergebnisse zudem keinen Rückschluss auf einen statistisch relevanten Zusammenhang aus Photosensitivität, Lupussubtyp und Genotypausprägungsform zu.

Huang et al. (30) beobachteten 1999 bei Typisierung des gleichen Polymorphismus eine signifikante Häufung von photosensitiven, A-homozygoten SLE Patienten.

Eine mögliche Assoziation zwischen dem programmierten Zelltod und einer gesteigerten Lichtempfindlichkeit bei Patienten mit Lupus erythematoses kann in dieser Arbeit hier jedoch nicht nachgewiesen werden. Die statistisch signifikanten Ergebnisse bei den SLE-Patienten und den Patienten mit positivem Serumtiter von Ro-Autoantikörpern legen allerdings nahe, dass die vorhandene Datenmenge der Photoprovokation möglicherweise einfach zu gering ist, um einen statistisch signifikanten Zusammenhang der Photosensitivität mit dem untersuchten Polymorphismus im Promotor des Fas-Gens zu erkennen. Dazu sind vermutlich weitere Untersuchungen mit deutlich größeren Patientenkollektiven nötig.

6 Zusammenfassung

Die Krankheitsentität Lupus erythematoses in ihren verschiedenen Unterformen beschreibt eine autoimmunologische Systemerkrankung der Haut und des Gefäßbindegewebes.

Für ihre Ätiopathogenese scheinen bestimmte Umweltfaktoren wie Viren, Medikamente, Chemikalien oder UV-Strahlung verantwortlich zu sein, die im Zusammenspiel mit einer gleichzeitig vorhandenen genetischen Disposition eine Veränderung in der Regulation der Immunantwort bewirken. Die daraus resultierende Störung der Selbst- und Fremderkennung äußert sich in einer überschießenden Produktion von Autoantikörpern, nicht-organspezifischen Komplementbindungsreaktionen und einer verminderten zellulären Immunität. Endgültig sind die Entstehungsmechanismen, die letztlich zu einem Verlust der Selbsttoleranz führen, in ihrer Komplexität bisher nicht aufgeklärt.

Für die genetische Prädisposition zur Entwicklung einer Autoimmunreaktion scheinen verschiedene Kandidatengene von besonderer Bedeutung zu sein.

Um die Vermutung zu bestätigen, dass eine Fehlfunktion der Apoptose maßgeblich an der Ätiopathogenese des Lupus erythematoses beteiligt ist, versucht die aktuelle Forschung, einen direkten Zusammenhang der Apoptose-induzierenden Gene, wie Fas, FasL, bcl-2 und DNase1 mit einer gesteigerten Suszeptibilität für Autoimmunerkrankungen nachzuweisen.

Inwieweit immunogenetische Variationen auf Einzelnukleotidebene die unterschiedlichen Ausprägungsformen einer Autoimmunreaktion beeinflussen können und sich im klinischen Bild einer Erkrankung widerspiegeln, ist dabei von besonderem Interesse.

Ziel dieser Arbeit war, aus der Untersuchung eines funktionellen Einzelnukleotidpolymorphismus in der Promotorregion des Gens für den Fas-Rezeptor abzuleiten, ob eine Assoziation zwischen dem programmierten Zelltod und der Krankheit Lupus erythematoses in ihren Subtypen besteht. Die Suche nach Hinweisen auf einen Zusammenhang mit einer gesteigerten Lichtempfindlichkeit sowie einem bestimmten Autoantikörperprofil im Serum sollte dabei im Mittelpunkt stehen. Der Bildung von Autoantikörpern beim Lupus erythematoses scheint ein vermehrter Anfall von zirkulierenden Zellkernantigenen durch vermehrten Zelluntergang durch Apoptose sowie eine ungenügende Beseitigung des apoptotischen Zellmaterials durch Phagozyten zu Grunde zu liegen. Auch die Entwicklung einer gesteigerten Lichtempfindlichkeit ist über diesen Mechanismus zu verstehen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen einen direkten Zusammenhang der Erkrankung Lupus erythematoses mit dem A-homozygoten Genotyp im untersuchten Fas-Gen-Promotor-Einzelnukleotidpolymorphismus vermuten. Bei genauerer Differenzierung des Patienten-

kollektivs nach den einzelnen Lupussubtypen zeigte sich, dass diese Assoziation sich im Besonderen auf den systemischen Lupus erythematoses bezieht.

Dadurch wird die Annahme bekräftigt, dass der programmierte Zelltod maßgeblich zur Induktion einer Autoantikörperproduktion beiträgt, die gerade bei der systemischen Form des Lupus erythematoses das klinische Ausmaß bestimmt.

Unabhängig von der jeweiligen Lupuserkrankungsform ergab diese Arbeit weiterhin ein signifikant gehäuftes Vorkommen des Genotyps AA bei Patienten mit einem positiven Ro-Autoantikörpertiter. Dadurch wird ein direkter Zusammenhang zwischen der Bildung von Autoantikörpern gegen Ro-Ribonukleoproteine und der A-Homozygotie des untersuchten Fas-Gen-Promotor-Einzelnukleotidpolymorphismus wahrscheinlich.

Bei Gegenüberstellung der Lichttestungsergebnisse der Patienten und der Genotypausprägungsformen fand sich keine statistisch relevante Abweichung, die auf einen Zusammenhang der positiven Photoprovokation und Induzierung von Hautläsionen mit dem untersuchten Fas-Gen-Promotor-Polymorphismus hinwies.

Eine mögliche Assoziation zwischen dem programmierten Zelltod und einer gesteigerten Lichtempfindlichkeit bei Patienten mit Lupus erythematoses kann in dieser Arbeit folglich nicht bestätigt werden. Die statistisch signifikanten Ergebnisse bei den SLE-Patienten und den Patienten mit positivem Ro-Autoantikörper-Titer legen allerdings nahe, dass die vorhandene Datenmenge der Photoprovokationsergebnisse einfach zu gering ist, um einen statistisch verwertbaren Zusammenhang der Photosensitivität mit dem untersuchten Polymorphismus im Promotor des Fas-Gens zu erkennen.

Es bleibt weiteren Studien in der Zukunft überlassen, diese Ergebnisse durch Untersuchung eines deutlich größeren Patientenkollektivs zu relativieren und neue Ansatzpunkte zur vollständigen Aufklärung der Ätiopathogenese der Autoimmunreaktion bei Lupus erythematoses zu finden.

7 Literaturverzeichnis

1. Amasaki Y, Kobayashi S, Takeda T et al. Upregulated expression of Fas antigen (CD95) by peripheral naive and memory T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus (SLE): a possible mechanism for lymphopenia. *Clin Exp Immunol* 1995; 99:245-250.
2. Angotti C. Immunology of cutaneous lupus erythematosus. *Clinics in Dermatology* 2004; 22:105-12.
3. Baca V, Velaquez-Cruz R, Sals-Martinez G et al. Association of the PTPN22 gene in childhood-onset systemic lupus erythematosus in Mexican population. *Genes Immun*. 2006 Dec; 7(8):693-5. Epub 2006 Oct.
4. Baksh MF, Balding DJ, Vyse TJ, Whittaker JC. Family based association analysis with ordered categorical phenotypes, covariates and interactions. *Genet Epidemiol*. 2007 Jan; 32(1):1-8.
5. Balada E, Villarreal-Tolchinsky J, Ordi-Ros J, Labrador et al. Multiplex family-based study in systemic lupus erythematosus: association between the R620W polymorphism of PTPN22 and the FcγRIIa (CD32A) R131 allele. *Tissue Antigens*. 2006 Nov; 68(5):432-8.
6. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, Landthaler M. *Dermatologie und Venerologie*. Springer Verlag (2005), Berlin, 5. Auflage.
7. Brink van den MRM, Burakoff SJ. Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature Reviews Immunology* 2002; 2:273-281.
8. Cantwell MJ, Hua T, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Deficient Fas ligand expression by synovial lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;40:1644-52.
9. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigenes targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* 1994; 197:1317-30.
10. Chen JY, Wang CM, Ma CC, Luo SF, Edberg JC, Kimberly RP, Wu J. Association of a transmembrane polymorphism of Fcγ receptor IIb (FCGR2B) with systemic lupus erythematosus in Taiwanese patients. *Arthritis Rheum*. 2006; 54(12):3908-17.
11. Chen JY, Wang CM, Lu SC, Chou YH, Luo SF. Association of apoptosis-related microsatellite polymorphisms on chromosome 1q in Taiwanese systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*. 2006 Feb; 143(2):281-7.

12. Chen JY, Wang CM, Lu SC, Chou YH, Luo SF. The -844C/T polymorphism in the Fas ligand promoter associates with Taiwanese SLE. *Genes Immunol.* 2005 Mar; 6(2):123-8.
13. Coakley G, Manolios N, Loughran TP Jr et al. A fas promotor polymorphism at position -670 does not confer susceptibility to Felty's and large granular lymphocyte syndromes. *Rheumatology* 1999;38:883-86.
14. Courtney PA, Crockard AD, Williamson K, McConnell J, Kennedy RJ, Bell AL. Lymphocytic apoptosis in systemic lupus erythematosus: relationships with Fas expression, serum soluble Fas and disease activity. *Lupus* 1999;8:508-13.
15. Emlen W, Niebur JA, Kadera R. Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1994; 152:3685-92.
16. Engelmark MT, Renkema KY, Gyllensten UB. No evidence of the involvement of the Fas -670 promotor polymorphism in cervical cancer in situ. *Int J Cancer* 2004;112:1084-5.
17. Epstein J, Tuffanelli D, Dubois E. Light sensitivity in lupus erythematosus. *Arch Dermatol* 1965;91:483-5.
18. Georgescu L, Vakkalanka RK, Elkon KB, Crow MK. Interleukin-10 promotes activation-induced cell death of SLE lymphocytes mediated by fas ligand. *J Clin Invest* 1997;100(10):2622-33.
19. Gibson AW, Edberg JC, Wu J, Westendorp RGJ, Huizinga TWJ, Kimberly RP. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promotor affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001;166:3915-22.
20. Hasan T, Nyberg F, Stephansson E, Puska P, Häkkinen M, Sarna S, Ros AM, Ranki A. Photosensitivity in lupus erythematosus, UV photoprovocation results compared with history of photosensitivity and clinical findings. *Br J Dermatol* 1997; 36:699-705.
21. Haust M, Bonsmann G, Kuhn A. Aktuelle Diagnostik des kutanen Lupus erythematoses. *Dtsch Med Wochenschr* 2006; 131:1594-1598.
22. Herold G und Mitarbeiter. *Innere Medizin.* Köln 2003.
23. Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998;41:1241-50.
24. Herrmann M, Winkler T, Gaipf U, Lorenz HM, Geiler T, Kalden JR. Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;123:28-35.

25. Hertl M (ed.). Autoimmune diseases of the skin. Chapter 5. SpringerWienNewYork 2001.
26. Hoffman IEA, Peene I, Meheus L, Huizinga TWJ et al. Specific antinuclear antibodies are associated with clinical features in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1155-8.
27. Honda Z. Fcepsilon- and Fcgamma-receptor signaling in diseases. *Springer Semin Immunopathol.* 2006 Dec; 28(4):365-75. Epub 2006 Nov 15.
28. Horiuchi T, Kiyohara C, Tsukamoto H, Sawabe T, Furugo I, Yoshizawa S, Ueda A et al. A functional M196R polymorphism of tumor necrosis factor receptor type 2 is associated with systemic lupus erythematosus: A case-control study and a meta-analysis. *Ann Rheum Dis.* 2006 Oct 6; [Epub ahead of print]
29. Horiuchi T, Nishizaka H, Yasunaga S, Higuchi M, Tsukamoto H, Hayashi K, Nagasawa K. Association of fas/APO-1 gene polymorphism with systemic lupus erythematosus in Japanese. *Rheumatol* 1999; 38:516-20.
30. Huang QR, Danis V, Lassere M, Edmonds J, Manolis N. Evaluation of a new Apo-1/Fas promotor polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatol* 1999; 38:645-51.
31. Huang QR, Manolios N. Investigation of the -1377 polymorphism on the Apo-1/Fas promotor in systemic lupus erythematosus patients using allele-specific amplification. *Pathology* 2000; 32:126-30.
32. Huang QR, Morris D, Manolios N. Identification and characterization of polymorphisms in the promotor region of the human Apo-1/ Fas (CD95) gene. *Mol Immunol* 1997; 34:577-82.
33. Ioannides D, Golden BD, Buyon JP, Bystryn JC. Expression of SS-A/Ro and SS-B/La antigens in skin biopsy specimens of patients with photosensitive forms of lupus erythematosus. *Arch dermatol* 2000; 136:340-6.
34. Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 13th Edition. MacGrawHill 1994.
35. Kanemitsu S, Ihara K, Saifddin A, Otsuka T, Takeuchi T, Nagayama J, Kuwano M, Hara T. A functional polymorphism in fas (CD95/APO-1) gene promotor associated with lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2002; 29:1183-8.
36. Kojima T, Horiuchi T, Nishizaka H, Sawabe T, Higuchi M, Harashima SI, Yoshizawa S, Tsukamoto H, Nagasawa K, Niho Y. Analysis of fas ligand gene mutation in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000; 43:135-9.

37. Komori H, Furukawa H, Mori S, Ito MR, Terada M, Zhang MC, Ishii N, Sakuma N, Nose M, Ono M. A signal adaptor SLAM-associated protein regulates spontaneous autoimmunity and Fas-dependent lymphoproliferation in MRL-Fas lpr lupus mice. *J Immunol.* 2006 Jan 1; 176(1):395-400.
38. Kuhn A, Lehmann P, Ruzicka T. *Cutaneous lupus erythematosus.* Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 2005.
39. Kuhn A, Sonntag M, Richter-Hintz D et al. Phototesting in lupus erythematosus tumidus- review of 60 patients. *Photochem Photobiol* 2001;73:532-6.
40. Kuhn A, Sonntag M, Richter-Hintz D et al. Phototesting in lupus erythematosus: a 15-year experience. *J Am Acad Dermatol* 2001;45:86-95.
41. Lai HC, Sytwu HK, Sun CA, Yu MH, Yu CP et al. Single nucleotide polymorphism at fas promotor is associated with cervical carcinogenesis. *Int J Cancer* 2003; 103:221-5.
42. Le Feber WP, Norris DA, Ryan SR et al. Ultraviolet light induces binding of antibodies to selected nuclear antigens in normal human skin. *J Invest Dermatol* 1991; 96:77-85.
43. Lee YH, Ji JD, Sohn J, Song GG. Polymorphisms of CTLA-4 Exon 1 +49, CTLA-4 Promotor -318 and Fas Promotor -670 in Spondyloarthropathies. *Clin Rheumatol* 2001; 20(6):420-2.
44. Lee YH, Kim YR, Ji JD, Sohn J, Song GG. Fas promotor -670 polymorphism is associated with development of anti-RNP antibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol* 2001;289:2008-11.
45. Lehmann P, Hölzle E, von Kries R, Plewig G. Lichtdiagnostische Verfahren bei Patienten mit Verdacht auf Photodermatosen. *Z Haut Geschlechtskr* 1986;152:667-682.
46. Lehmann P, Hölzle E, Kind P, Goerz G, Plewig G. Experimental reproduction of skin lesions in lupus erythematosus by UVA and UVB radiation. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22:181-7.
47. Magnusson V, Nakken B, Bolstad AI, Alarcon-Riquelme ME. Cytokine polymorphisms in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol* 2001;54:55-61.
48. McNally J, Yoo DH, Drappa J et al. Fas ligand expression and function in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1997;159:4628-36.
49. Millard TP, Hawk JL, McGregor JM. Photosensitivity in lupus. *Lupus* 2000; 9:3-10.

50. Millard TP, Kondeatis E, Cox A, Wilson AG, Grabczynska SA et al. A candidate gene analysis of three related photosensitivity disorders: cutaneous lupus erythematosus, polymorphic light eruption and actinic prurigo. *Brit J Dermatol* 2001;145:229-36.
51. Mullighan CG, Heatly S, Lester S, Rischmueller M, Gordon TP, Bardy PG. Fas gene promoter polymorphisms in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:98-101.
52. Mysler E, Bini P, Drappa J, Ramos P, Friedman SM, Krammer PH, Elkon KB. The apoptosis-1/ fas protein in human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1994; 93:1029-34.
53. Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* 1995; 16:39-43.
54. Nakken B, Jonsson R, Bolstad AI. Polymorphisms of the Ro52 gene associated with anti-Ro 52-kD autoantibodies in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2001;44:638-646.
55. Nolsoe RL, Kelly JA, Pociot F, Moser KL, Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T, Harley JB. Functional promoter haplotypes of the human FAS gene are associated with the phenotype of SLE characterized by thrombocytopenia. *Genes Immun.* 2005 Dec; 6(8):699-706.
56. Nozawa K, Kayagaki N, Tokano Y, Yagita H, Okumura K, Hasimoto H. Soluble fas (APO-1,CD95) and soluble fas ligand in rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1997; 40(6):1126-9.
57. Ohsako S, Hara M, Harigai M, Fukasawa C, Kashiwazaki S. Expression and function of Fas antigene and bcl-2 in human systemic lupus erythematosus lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 73:109-14.
58. Olfieriev M, Masuda E, Tanaka S, Blank MC, Pricop L. The role of activating protein 1 in the transcriptional regulation of the human FCGR2B promoter mediated by the -343 g to C polymorphism associated with systemic lupus erythematosus. *J Biol Chem.* 2006 Nov 27; [Epub ahead of print]
59. Orteu CH, Sontheimer RD, Dutz JP. The pathophysiology of photosensitivity in lupus erythematosus. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2001;17:95-113.
60. Prokunina L, Castillejo-Lopez C, Öberg F, Gunnarsson I, Berg L et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nature genetics* 2002;32:666-9.

61. Rudert F, Visser E, Forbes L et al. Identification of a silencer, enhancer and basal promotor region in the human CD95(Fas/Apo-1) gene. *DNA Cell Biol* 1995;14:931-7.
62. Sanchez E, Sabio JM, Calleja JL, de Ramon E, de Haro M, Jimenez-Alonso J et al. Study of a functional polymorphism in the p53 gene in systemic lupus erythematosus: lack of replication in a Spanish population. *Lupus*. 2006; 15(10):658-61.
63. Sanders CJG, Van Weelden H, Kazzaz GAA, Sigurdson V, Toonstra J, Bruinjnzeel-Koomen CAFM. Photosensitivity in patients with lupus erythematosus: a clinical and photobiological study of 100 patients using a prolonged phototest protocol. *Brit J Dermatol* 2003;149:131-137.
64. Scheinfeld N, Deleo VA. Photosensitivity in lupus erythematosus. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2004;20:272-9.
65. Schmidt DE. Immungenetische Untersuchungen zur Lichtempfindlichkeit bei kutanen und systemischen Formen des Lupus erythematoses. Dissertation Medizinische Fakultät der LMU München, 1997.
66. Shiroiwa W, Tsukamoto K, Ohtsuji M, Lin Q, Ida A, Kodera S, Ohtsuji N, Nakamura K, Tsurui H, Kinoshita K, Nishimura H, Shirai T, Hirose S. IL-4R{alpha} polymorphism in regulation of IL-4 synthesis by T cells: implication in susceptibility to a subset of murine lupus. *Int Immunol*. 2006, Dez. [Epub ahead of print]
67. Shoshan Y, Shapira I, Toubi E, Frolkis I, Yaron M, Mevorach D. Accelerated fas-mediated apoptosis of monocytes and maturing macrophages from patients with systemic lupus erythematosus: relevance to in vitro impairment of interaction with iC3b-opsonized apoptotic cells. *J Immunol* 2001; 167:5963-9.
68. Sibley K, Rollinson S, Allan JM, Smith AG, Law GR, Roddam PL, Skibola CF, Smith MT, Morgan GJ. Functional FAS promotor polymorphisms are associated with increased risk of acute myeloid leukaemia. *Cancer research* 2003;63:4327-30.
69. Sullivan KE. Genetics of systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 2000;26:229-56.
70. Suzuki N, Ichino M, Mihara S, Kaneko S, Sakane T. Inhibition of Fas/Fas ligand-mediated apoptotic cell death of lymphocytes in vitro by circulating anti-Fas ligand autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998; 41:344-53.
71. Tan EM et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7.

72. Tuffanelli DL, Dubois EL. Cutaneous manifestations of systemic lupus erythematosus. *Arch Dermatol* 1964;90:377-86.
73. Vaishnaw AK, Toubi E, Ohsako S et al. The spectrum of apoptotic defects and clinical manifestations, including systemic lupus erythematosus, in humans with CD95 (Fas/APO-1) mutations. *Arthritis Rheum* 1999;42:1833-42.
74. Vasilescu A, Heath SC, Diop G, Do H, Hirtzig T. Genomic analysis of Fas and fasL genes and absence of correlation with disease progression in AIDS. *Immunogenetics* 2004; 56:56-60.
75. Vyse TJ, Kotzin BL. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol* 1998;16:261-92.
76. Walchner M, Messer G, Kind P. Phototesting and photoprotection in LE. *Lupus* 1997; 6:167-74.
77. Walchner M, Meurer M, Plewig G. Clinical and immunologic parameters during thalidomide treatment of lupus erythematosus. *Int J Dermatol* 2000;39:383-8.
78. Wang SC, Chen YJ, Ou TT, Wu CC, Tsai WC, Liu HW, Yen JH. Programmed cell death-1 gene polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus in Taiwan. *J Clin Immunol*. 2006 Nov; 26(6):506-11. Epub 2006 Oct 6.
79. Werth V. Current treatment of cutaneous lupus erythematosus. *Dermatology Online Journal* 2001;7(1).
80. Wu J, Metz C, Xu X, Abe R, Gibson AW, Edberg JC, Cooke J, Xie F et al. A novel polymorphic CAAT/enhancer-binding protein β element in the fasL gene promoter alters fas ligand expression: a candidate background gene in African American systemic lupus erythematosus patients. *J Immunol* 2003;170:132-8.
81. Wu J, Wilson J, He J, Xiang L et al. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1996;1107-13.
82. Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, Tsukamoto H, Hashimura C, Urushihara M, Kuroda Y. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nature genetics* 2001; 28:313-4.
83. Yoshimasu T, Hiroi A, Ohtani T, Uede K, Furukawa F. Comparison of anti 60 and 52 kDa SS-A/Ro antibodies in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. *J Dermatol Sci* 2002; 29(1):35-41.

Danksagung

Herrn Privatdozent Dr. med. G. Messer, meinem Doktorvater, danke ich für die freundliche Überlassung dieses Dissertationsthemas, die geduldige Unterstützung und die Gelegenheit, durch Teilnahme an der Autoimmunsprechstunde der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München klinische Bezüge kennen zu lernen und praktische Erfahrungen zu vertiefen.

Mein ganz besonderer Dank gebührt Frau Professor Dr. E. Weiss vom Departement Biologie II der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Möglichkeit, in ihren Labors meine Experimente durchführen zu können. Durch ihre freundliche, fördernde und motivierende Betreuung in allen Phasen der Dissertation und ihre aufschlussreiche Beratung bei allen Fragestellungen gab sie mir eine wertvolle Unterstützung.

Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. mult. G. Plewig und Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. T. Ruzicka danke ich für die Arbeitsmöglichkeiten und die klinische Ausbildung an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Für die instrumentelle Unterstützung bei der theoretischen und praktischen Versuchsdurchführung danke ich besonders Frau Dipl. biol. H. Hirner. Auch Frau G. Maurer möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen, insbesondere für die hilfsbereite Beratung bei der statistischen Auswertung.

Lebenslauf

Name: Sonja Christine Molin

Geburtsdatum: 1.11.1980

Geburtsort: München

Schulbildung

1987 - 1990 Grundschohle in München (2. Klasse übersprungen)
1990 - 1994 Gymnasium in München
1994 - 1996 Gymnasium in Braunschweig; Besuch des Förderzweigs für Hochbegabte der Jugenddorf-Christophorus-Schule
1996 - 1999 Gymnasium in München
1999 Abitur am Max-Josef-Stift-Gymnasium München

Studium

1999 - 2005 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

Praktische Tätigkeiten

Praktisches Jahr

10/2004 - 2/2005 Dermatologie, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

02 - 05/2005 Chirurgie, Kantonsspital Olten, Schweiz

05 - 09/2005 Innere Medizin, Klinikum Traunstein

Sonstiges

2003/2004 Hospitanz in der Autoimmunspezialsprechstunde, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Klinische Arbeit

01/2006-04/2006 Assistenzärztin, Kardiologie, Klinikum Traunstein

04/2006-03/2007 Assistenzärztin, Praxis für Dermatologie und Allergologie Dr. med. W. Klövekorn, Gilching bei München

seit 03/2007 Assistenzärztin, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München