

***Untersuchungen zum Einfluss der Genotypen des Mannosebindungslektins  
sowie des Tumornekrosefaktor  $\alpha$ -Promotor-Polymorphismus -308 (G/A) auf das  
Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Annekristin Hausen  
Berlin-Wilmersdorf

2010

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Vetter
2. Gutachter: Prof. Dr. T. Sauerbruch

Tag der Mündlichen Prüfung: 24.02.2010

Aus der Medizinischen Poliklinik, Universitätsklinikum Bonn  
Prof. Dr. H.Vetter

## **Inhaltsverzeichnis**

---

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>6</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
1.1 Das Krankheitsbild	7
1.2 Historische Perspektive	8
1.3 Klinisches Bild und Verlauf der Erkrankung	8
1.4 Charakteristische Laborparameter	9
1.5 Mortalität	10
1.6 Epidemiologie	10
1.6.1 Inzidenz	10
1.6.2 Prävalenz	10
1.6.3 Geographische Verteilung	11
1.7 Soziale und ökonomische Bedeutung der rheumatoiden Arthritis	11
1.8 Pathogenitätsmodelle der rheumatoiden Arthritis	12
1.8.1 Die Bedeutung von T-Lymphozyten in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis	12
1.8.2 Die pathogenetische Bedeutung des lokalen Zytokinnetzwerkes	13
1.8.3 Die Ausbildung der Synovitis	14
1.8.4 Die irreversible Gelenkdestruktion	15
1.8.5 Immunogenetische Prädisposition	15
1.9 Die Bedeutung des Mannosebindungslektins (MBL) für die rheumatoide Arthritis	16
1.9.1 Die Molekülstruktur des Mannosebindungslektins (MBL) und das MBL-Gen	16
1.9.2 Die Stellung des MBL im Komplementsystem	18
1.9.3 Die verschiedenen MBL-Genotypen	19
1.9.4 Die Häufigkeit der verschiedenen MBL-Genotypen	20
1.9.5 Veränderungen der Molekülstruktur durch die Polymorphismen in Exon 1	20
1.9.6 Die Polymorphismen in Exon 1 und der MBL-Serumspiegel	21
1.9.7 MBL-Genotypen bzw. MBL-Serumspiegel und die rheumatoide Arthritis	21
1.9.8 Assoziation von MBL-Defizienz mit anderen Erkrankungen	22
1.10 Die Bedeutung von TNF $\alpha$ für die rheumatoide Arthritis	23
1.10.1 Molekülstruktur des Tumornekrosefaktors $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) und das TNF $\alpha$ -Gen	23
1.10.2 Die pathogenetische Wirkweise von TNF $\alpha$ bei der rheumatoiden Arthritis	24
1.10.3 Polymorphismen im Bereich des TNF $\alpha$ -Gens	24
1.10.4 Die Häufigkeit des TNF $\alpha$ - Promotor- Polymorphismus -308 und der TNF $\alpha$ -Serumspiegel	25
1.11 Fragestellung und Ziel der Arbeit	25

<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>26</b>
2.1.1 Laborgeräte.....	26
2.1.2 Chemikalien.....	26
2.1.3 Kits.....	27
2.1.4 Enzyme.....	27
2.1.5 Puffer und Lösungen.....	27
2.1.6 Primer.....	28
<b>2.2 Patienten und Proben.....</b>	<b>29</b>
2.2.1 Auswahl der Patienten.....	29
2.2.2 Klinische Untersuchung der Patienten.....	30
2.2.3 Erhebung der biochemischen Daten.....	31
<b>2.3 Methoden.....</b>	<b>31</b>
2.3.1 Isolierung genomischer DNA.....	31
2.3.2 DNA Isolierung mit dem Puregene DNA Isolation Kit.....	31
2.3.3 DNA Isolierung nach der Aussalzmethode.....	32
2.3.4 Spektralphotometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung.....	34
2.3.5 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
2.3.6 Verwendete PCR-Protokolle.....	39
2.3.7 Gelelektrophorese.....	41
2.3.8 Herstellung der Gele.....	42
2.3.9 Restriktionsverdau.....	43
2.3.10 Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem Wizard® PCR Preps DNA Purification System.....	45
2.3.11 Sequenzierung.....	46
2.3.12 Statistische Auswertung.....	47
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1 Ergebnisse der DNA-Isolierung und Reinheitsbestimmung .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2 Ergebnisse der DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....</b>	<b>48</b>
3.2.1 Ergebnisse der PCR für das A-, B- und C-Allel.....	48
3.2.2 Ergebnisse der SDM-PCR für das D-Allel.....	49
3.2.3 Ergebnisse der mutagenically seperated- PCR (MS-PCR) für den TNF $\alpha$ -Promotor-Polymorphismus.....	49
<b>3.3 Ergebnisse des Restriktionsverdaus .....</b>	<b>50</b>
3.3.1 Ergebnisse des Restriktionsverdaus für das A-, B- und C-Allel.....	50
3.3.2 Ergebnisse des Restriktionsverdaus für das D-Allel.....	50
<b>3.4 Ergebnisse der Aufreinigung der PCR-Produkte .....</b>	<b>52</b>
<b>3.5 Ergebnisse der Sequenzierung.....</b>	<b>52</b>
3.5.1 Das Allel A.....	53
3.5.2 Das Allel D (Codon 52).....	53
3.5.3 Das Allel B (Codon 54).....	54
3.5.4 Das Allel C (Codon 57).....	55
<b>3.6 MBL- und TNF<math>\alpha</math>- Genotypen in der Patientengruppe.....</b>	<b>56</b>

<b>3.7 Klinische und biochemische Daten der Patientengruppe .....</b>	<b>57</b>
3.7.1 Charakteristika der Patientengruppe im Bezug auf die MBL-Genotypisierung .....	58
3.7.2 Charakteristika der Patientengruppe in Abhängigkeit von der TNF $\alpha$ - Genotypisierung .....	59
<b>3.8 Daten zur medikamentösen Vorbehandlung der Patienten.....</b>	<b>61</b>
<b>3.9 Statistische Auswertung.....</b>	<b>62</b>
<b>4 DISKUSSION.....</b>	<b>69</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>79</b>
<b>6 TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>81</b>
<b>7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>81</b>
<b>8 ANHANG.....</b>	<b>84</b>
<b>9 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>85</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>94</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>95</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

---

APC	Antigen- präsentierende Zellen
bp	Basenpaare
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i>
CRP	C-reaktives Protein
DMARD	<i>disease modifying antirheumatic drug</i>
ENA-78	<i>epithelial neutrophil activating peptide 78</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
gp39	<i>cartilage antigen glycoprotein 39</i>
HBGF	<i>heparin-binding growth factor</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
MAC	<i>membrane-attack complex</i>
MAF	<i>macrophage angiogenic factor</i>
MASP-1/MASP-2	MBL-assozierte Serinprotease
MBL	Mannosebindungslektin
MIF	<i>macrophage migration inhibiting factor</i>
MS-PCR	<i>mutagenically seperated PCR</i>
PG	Prostaglandin
RA	Rheumatoide Arthritis
SDM-PCR	<i>site directed mutagenesis-PCR</i>
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
TACE	<i>TNF<math>\alpha</math> converting enzyme</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor -<math>\beta</math></i>
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

# 1 Einleitung

---

## 1.1 Das Krankheitsbild

Die rheumatoide Arthritis, auch chronische Polyarthritis genannt, ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung mit systemischem Befall des gesamten Organismus und multifaktorieller Genese. Die Erkrankung wird in wesentlichen Teilen durch ihren klinischen Verlauf charakterisiert, der unbehandelt zu einer fortschreitenden, entzündlich bedingten Gelenkdestruktion führt. Daraus können vielfältige und erhebliche Beeinträchtigungen der körperlichen Leistungsfähigkeit und des psychischen Befindens resultieren. Im Unterschied zu anderen Krankheitsbildern lässt sich die rheumatoide Arthritis daher nicht durch eine statische, d.h. vom zeitlichen Verlauf und Therapie unabhängige Zusammenstellung von Kriterien eindeutig definieren. Eine allgemein akzeptierte Beschreibung des Krankheitsbildes und Basis aller Studien im Bereich der Rheumatologie sowie der vorliegenden Arbeit stellen die Diagnosekriterien des *American College of Rheumatology* in der revidierten Fassung von 1987 dar, die sowohl dem klinischen Bild als auch dem zeitlichen Verlauf Rechnung tragen (Arnett et al., 1988).

**Tab. 1:** Kriterien zur Diagnose der rheumatoiden Arthritis (nach Arnett et al., 1988; deutsche Übersetzung nach Hettenkofer, 2001).

Kriterium	Definition
1. Morgensteifigkeit der Gelenke	Morgensteifigkeit der betroffenen Gelenke von mindestens 1 Stunde Dauer bis zur Besserung
2. Arthritis in 3 oder mehr Gelenken	Synovitis (Schwellung mit Ergussbildung) von mindestens 3 Gelenkregionen (nicht allein knöcherne Verdickungen), 14 mögliche Gelenkregionen: Fingergrund- und -mittelgelenke, Hand-, Ellenbogen-, Knie- und Zehengrundgelenke beiderseits
3. Arthritis an Hand- oder Fingergelenken	Synovitis mindestens einer Gelenkregion in einem Hand-, Fingergrund- oder -mittelgelenk
4. Symmetrische Arthritis	Gleichzeitige symmetrische Befunde der Gelenke der Gegenseite
5. Rheumaknoten	Subkutane Knoten über Knochenvorsprüngen an den Streckseiten der Gelenke oder in Gelenknähe
6. Rheumafaktor im Serum	Nachweis mit einer Methode, die in einer normalen Kontrollgruppe in unter 5% positive Befunde ergibt
7. Radiologische Veränderungen	Für die chronische Polyarthritis typische radiologische Veränderungen auf einer p.- a. Aufnahme der Hand mit gelenknaher Osteoporose und/oder Erosionen
Vier der sieben Kriterien müssen für die Diagnose erfüllt sein. Die Kriterien 1-4 müssen seit mindestens sechs Wochen bestehen.	

## **1.2 Historische Perspektive**

Frühe archäologische Hinweise auf das Vorliegen einer erosiven Arthritis fanden sich z.B. im Rahmen paleopathologischer Untersuchungen an nordamerikanischen 3000-5000 Jahre alten Skelettfunden (Rothschild et al., 1988). Die frühesten schriftliche Zeugnisse über rheumatische Gelenkerkrankungen finden sich in ayurvedischen Schriften vom indischen Subkontinent, die auf einen Zeitraum 600-1000 Jahre vor Christi Geburt datiert werden können (Ulrich-Merzenich et al., 1999). Als Krankheitsentität wurde die rheumatoide Arthritis erstmalig von A. J. Landré-Beauvais (1800) und Sir Alfred Baring Garrod (1859) definiert (Garrod 1892; Kaiser 2004).

## **1.3 Klinisches Bild und Verlauf der Erkrankung**

Trotz des häufigen Auftretens extraartikulärer Symptome ist die rheumatoide Arthritis vor allem durch entzündliche Gelenkveränderungen gekennzeichnet. Diese manifestieren sich durch Schwellung, Rötung, Überwärmung, sowie Schmerzhaftigkeit der betroffenen Gelenkregion. Es können sowohl periphere Gelenke wie Handgelenke, Ellenbogen, Knie, Schulter oder Sprunggelenke, als auch das Achsenskelett betroffen sein. Charakteristisch ist ein symmetrisches Auftreten der Arthritis.

Extraartikuläre Manifestationen können sich u.a. als Serositis, Vaskulitis, subkutane Rheumaknoten, Neuropathie oder Skleritis äußern. Darüber hinaus können unspezifische Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit, Myalgien, subfebrile Temperaturen, Gewichtsverlust oder Depressionen auftreten. Der klinische Verlauf der Erkrankung stellt sich extrem variabel dar und reicht von chronisch progredient bis spontan remittierend. In Abhängigkeit vom Ansprechen auf eine medikamentöse Therapie kommt es zumeist zu fluktuierenden Krankheitsphasen höherer und niedriger entzündlicher Aktivität. Kennzeichnend für die rheumatoide Arthritis sind als Folge der destruktiven entzündlichen Aktivität verbleibende strukturelle Gelenkveränderungen, die ihrerseits dauerhafte Fehlstellungen des Bewegungsapparates bedingen. Typische Folgezustände rheumatoider Gelenkprozesse sind Schwanenhalsdeformität, Knopflochdeformität, Ulnardeviation und Hallux valgus. Da sich die Gelenkerosionen am stärksten in den ersten zwei Jahren der Erkrankung ausprägen, ist eine frühe Diagnosestellung und Therapieeinleitung für den weiteren Verlauf entscheidend.





**Abb. 1:** Charakteristisches Bild der Folgezustände einer rheumatoiden Arthritis der Finger- und Handgelenke. Die Abbildung zeigt den typischen Befall der MCP-Gelenke und die Ulnardeviation. (Ulrich-Merzenich, 1998).

**Abb. 2:** Die Abbildung zeigt die Schwanenhalsdeformität der Fingergelenke (Ulrich-Merzenich, 1998).



**Abb. 3:** Charakteristisches Bild der Folgezustände einer rheumatoiden Arthritis der Zehngelenke mit Ausbildung eines Hallux valgus.

#### 1.4 Charakteristische Laborparameter

Typischerweise finden sich im Rahmen eines akuten Krankheitsschubs laborchemisch erhöhte unspezifische Entzündungsparameter wie CRP, ESR und weitere Akut-Phase-Proteine. In 30-40% der Fälle sind positive Antinukleäre Antikörper (ANA) nachweisbar (Venables und Maini, 2006). Positive Rheumafaktoren liegen in 70-80% der Fälle vor. Die Angaben über die Sensitivität schwanken jedoch stark (26-90%) bei niedrigem positiv prädiktivem Wert (Shmerling, 2006). Aussagekräftiger sind daher Anti-CCP-Antikörper (anti-citrullin containing peptides) mit einer Spezifität von 90-96% (Venables und Maini, 2006) und einem hohen positiv prädiktivem Wert lange Jahre vor Krankheitsbeginn (Rantapaa-Dahlqvist et al., 2003).

## **1.5 Mortalität**

Studien haben eine im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöhte Mortalität von an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten gezeigt, die mit einer um ca. 3-18 Jahre verkürzten Lebenserwartung einhergeht (Felson, 2005). Besonders in den ersten 7 Jahren der Erkrankung konnte eine erniedrigte Überlebenswahrscheinlichkeit gezeigt werden. Als häufigste Todesursache wurde in diesem Zusammenhang eine ischämische Herzerkrankung festgestellt. Im Vergleich zur Normalbevölkerung ist auch die Rate an Infektionen, Non Hodgkin Lymphomen und pulmonaler Fibrose erhöht (Young et al., 2007).

## **1.6 Epidemiologie**

### **1.6.1 Inzidenz**

Weltweit wurden Untersuchungen zur Inzidenz und Prävalenz der rheumatoiden Arthritis angestellt. In europäischen und nordamerikanischen Studien zeigte sich eine gewisse Variabilität mit altersangepassten Inzidenzraten zwischen 0,25 und 0,4 pro 1000 Personen pro Jahr (Silman und Hochberg, 2001). Signifikante Unterschiede bestehen sowohl im Bezug auf die geschlechtsspezifischen als auch im Bezug auf die altersabhängigen Inzidenzraten. In der weiblichen Bevölkerung zeigten sich bis zu 4fach höhere Inzidenzraten als in der altersentsprechenden männlichen Bevölkerung (Symmons et al., 1994). Sowohl in der männlichen als auch in der weiblichen Bevölkerung steigt die Inzidenz mit dem Lebensalter kontinuierlich an. Die höchsten Inzidenzraten lassen sich dementsprechend bei Frauen zwischen dem 60. und dem 70. Lebensjahr feststellen, die niedrigsten bei jungen Männern (Silman und Hochberg, 2001).

### **1.6.2 Prävalenz**

Für die meisten europäischen Staaten und Nordamerika sind Prävalenzen zwischen 0.4 und 1.1% festgestellt worden. Auch hier zeigt sich ein deutliches Überwiegen der Erkrankung in der weiblichen Bevölkerung mit einer bis zu 7fach höheren Prävalenz, so dass in einigen Regionen eine Prävalenz von bis zu 1,4 % erreicht wird (MacGregor et al., 1994).

### **1.6.3 Geographische Verteilung**

Die rheumatoide Arthritis ist weltweit mit ähnlich hohen Prävalenz- und Inzidenzraten nachweisbar. Es gibt allerdings einige ethnische Gruppen, in denen die rheumatoide Arthritis signifikant häufiger oder seltener auftritt. Besonders niedrige Prävalenzraten konnten für in ländlichen Gebieten Afrikas lebende Bevölkerungsgruppen nachgewiesen werden, wie z. B. in Nigeria (Silman et al., 1993). Auffällig hohe Prävalenzen (5,3% bzw. 6,8%) zeigten sich bei den in den USA lebenden Pima- und Chippewa-Indianern (Harvey et al., 19981 und Del Puente et al., 1989).

### **1.7 Soziale und ökonomische Bedeutung der rheumatoiden Arthritis**

Aufgrund der systemischen Ausprägung der Erkrankung sind die möglichen sozialen und ökonomischen Folgen vielfältig. Dazu trägt auch bei, dass es im langfristigen Verlauf zu irreversiblen Folgezuständen der Erkrankung kommen kann, die das soziale Leben der Erkrankten in privater und beruflicher Hinsicht massiv beeinträchtigen können. Daraus resultieren sowohl für den Einzelnen als auch für die Gesellschaft erhebliche soziale und finanzielle Belastungen. Die für die Gesellschaft resultierenden Belastungen werden unter anderem in den finanziellen Belastungen abgebildet, die sich in direkte (u.a. medikamentöse Therapie, Kosten von Arztbesuchen und Krankenhausaufenthalten) und indirekte (z.B. Produktivitätsausfälle) Kosten aufgliedern lassen. Die indirekten Kosten ergeben sich bei der rheumatoiden Arthritis aus den Produktivitätsausfällen aufgrund von Frühberentung und krankheitsbedingtem Fehlen am Arbeitsplatz. Die Gesamtkosten belaufen sich in Deutschland pro Patient auf durchschnittlich 15637 € im Jahr (Huscher D et al., 2006). Die direkten Krankheitskosten allein betragen in Deutschland im Mittel 4737 € im Jahr, wobei der größte Anteil auf Medikamentkosten (1843 €/Jahr) und Krankenhauskosten (1624 €) entfällt. Nicht zu vernachlässigen sind die direkt vom Patienten aufzubringenden „out-of-pocket“ Ausgaben von 559 € pro Jahr (Huscher et al., 2006). Aktuelle Untersuchungen in Deutschland haben mittels Multivarianzanalysen einen eindeutigen Zusammenhang zwischen den entstehenden Kosten und dem funktionellen Status, d.h. dem Grad der körperlichen Beeinträchtigung nachgewiesen (Huscher et al., 2006), so dass ein sich verschlechternder funktioneller Status der wichtigste Grund für eine Kostensteigerung ist. Umgekehrt führt eine Verbesserung des körperlichen Zustands zu einer deutlichen Kostensenkung.

## **1.8 Pathogenitätsmodelle der rheumatoiden Arthritis**

Die rheumatoide Arthritis stellt sich nach aktuellem Verständnis als eine multifaktoriell bedingte und pathogenetisch komplexe Erkrankung dar. Trotz intensiver Forschung ist es bislang nicht gelungen, ein allgemein anerkanntes und das Krankheitsgeschehen vollständig erklärendes Konzept zur Pathogenese zu entwickeln. Demgegenüber stehen vielfältige sich ergänzende Ansätze, die die Entwicklung einer rheumatoiden Arthritis aus dem Blickwinkel verschiedener Agonisten des Immunsystems betrachten. Neben dem zweckfreien Interesse am Verständnis der Entstehung und Entwicklung einer rheumatoiden Arthritis, bildet auch die Möglichkeit neue therapeutische Strategien zu entwickeln, einen Antrieb zur weiteren Erforschung der pathogenetischen Mechanismen. Die offensichtliche Wirksamkeit neuer, direkt in das Immunsystem eingreifender Medikamente, sogenannter *biologicals*, beweist einerseits eindrucksvoll die pathogenetische Funktion der durch die Medikamente blockierten Zytokine, andererseits weist die begrenzte Wirksamkeit der verwendeten Substanzen auch auf die Komplexität des Systems hin. Grundlage für das Verständnis der rheumatoiden Arthritis bildet zudem das Wechselspiel zwischen den systemisch stattfindenden Reaktionen und den sich lokal im Gelenk abspielenden Vorgängen.

### **1.8.1 Die Bedeutung von T-Lymphozyten in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis**

T- Lymphozyten sind sowohl in der Gelenkflüssigkeit als auch in der Synovia entzündeter Gelenke nachweisbar, teilweise mit einem Anteil von über 50% (Harris und Schur, 2006). Als ein möglicher Startmechanismus einer RA wird die Aktivierung von T-Zellen durch ein oder mehrere bisher nicht identifizierte Antigene mit anschließender klonaler Proliferation diskutiert. Die Aktivierung erfolgt durch Kontakt mit Antigen-präsentierenden Zellen (APC), d.h. Makrophagen, dendritischen Zellen oder B-Lymphozyten. In rheumatischen Gelenken sind zumeist CD 4+ T-Lymphozyten nachweisbar (Harris und Schur, 2006). Die Aktivierung der T- Zelle erfordert eine Kostimulation durch 2 Signale. Dies beinhaltet eine Bindung zwischen MHC II/ Antigen-Komplex und T-Zell-Rezeptor einerseits und zusätzlich eine Bindung über ein kostimulierendes Rezeptor-Liganden-Paar, beispielsweise CD80/86 auf der antigenpräsentierenden Zelle und CD28 auf der T-Zelle. Aktivierte T-Lymphozyten können über die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine Makrophagen und Synovialzellen aktivieren. Diskutiert wird, ob es bei der rheumatoiden Arthritis nach initialer Stimulierung von T-Zellen durch ein exogenes

Antigen im Laufe des Entzündungsprozesses zu einer Verselbstständigung mit Stimulation durch Autoantigene kommt. Willkürlich herausgegriffen seien im Folgenden zwei Beispiele für diese Hypothese. Als ein mögliches Autoantigen, wenn auch nicht im Sinne eines auslösenden Agens, wird Kollagen Typ II diskutiert, das im weiteren Verlauf der Erkrankung im Rahmen des Entzündungsprozesses durch Oxidanzien angegriffen wird, so dass neue, antigen wirksame Strukturen entstehen können (Nissim et al., 2005). Ein weiteres mögliches Autoantigen stellt das im Rahmen von Entzündungsprozessen von Chondrozyten und Synovialzellen sezernierte cartilage antigen glycoprotein 39 (gp39) dar (Harris und Schur, 2006).

### **1.8.2 Die pathogenetische Bedeutung des lokalen Zytokinnetzwerkes**

Trotz des hohen Anteils von T-Lymphozyten am Zellgehalt der Gelenkflüssigkeit und der Synovia, ergaben Messungen der dort nachweisbaren Zytokine einen relativ niedrigen Anteil von T-Zell-Produkten wie IFN- $\gamma$  oder IL-2 (Firestein et al., 1990). Im Vergleich dazu war der Anteil von Zytokinen, die von Makrophagen und Fibroblasten ausgeschüttet werden, hoch (Firestein 2003). Dazu zählen beispielsweise IL-1, IL-6, IL-15, IL-18, TNF $\alpha$  und GM-CSF. Dieses auch als *unbalanced cytokine profile* bezeichnete Ungleichgewicht weist -wie die therapeutische Wirksamkeit von TNF $\alpha$ -Antagonisten- auf eine wichtige Rolle des von Makrophagen und Fibroblasten bestimmten lokalen Zytokinnetzwerkes hin.

Unter anderem sezernieren Makrophagen im Gelenk proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-1, IL-18 und bewirken eine Aktivierung von Metalloproteinasen und die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Synovialzellen, die zur Anlagerung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen führen (Firestein 2003). Fibroblasten bzw. Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten schütten ebenfalls proinflammatorische Zytokine wie TGF- $\beta$ , IL-, IL-6, FGF und GM-CSF aus. Zusätzlich beeinflussen auch Prostaglandine, NO und Komplementfaktoren die lokale Entzündung. Es wird angenommen, dass dieses Zytokinnetzwerk im Sinne einer unspezifischen Entzündungsreaktion und unabhängig von der T-Zell-Aktivierung die lokale Entzündung im Gelenk aufrechterhält (Firestein 2003).

### 1.8.3 Die Ausbildung der Synovitis

Das Hauptmerkmal der rheumatischen Gelenkveränderung ist die fortschreitende entzündliche Destruktion mit reparativen Umbauvorgängen, die das gesamte Gelenk sowie die angrenzenden Weichteile und Bandstrukturen betreffen. Angeregt durch Synovialzellen und vermittelt über die Ausschüttung von angiogenetischen Zytokinen wie VEGF, Angiopoietin-1, ENA-78, IL-8, HBGF, MAF und den Prostaglandinen E1 und E2 kommt es zur Bildung neuer Gefäße im Gelenk (Harris und Schur, 2006). Die Angiogenese wird auch ein durch einen veränderten Stoffwechsel der Hyaluronsäure als wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix gefördert. Im Serum finden sich erhöhte Hyaluronsäurespiegel (Engström-Laurent und Hällgren, 1985), im Gelenkerguss ist besonders der Anteil der niedermolekularen Hyaluronsäure erhöht (Balazs et al., 1967), vermutlich aufgrund von Degradationsprozessen und einer gesteigerten Ausschüttung niedermolekularer Hyaluronsäure durch Synovialzellen (McNeil et al., 1985; Castor und Dorstewitz, 1966). Es wird angenommen, dass besonders niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente eine verstärkte Angiogenese im Gelenk induzieren (Pavasant et al., 1994). Entsteht im Laufe der fortschreitenden Entzündung ein relativer Sauerstoffmangel im Gelenk aufgrund der Gewebszunahme und der intraartikulären Drucksteigerung durch den Gelenkerguss, führt auch die daraus resultierende Gewebsischämie zur Ausschüttung angiogenetischer Zytokine.

Die entzündliche Reaktion schreitet fort, indem Leukozyten, vor allem polymorphkernige Granulozyten und Lymphozyten, aus den neu gebildeten Gefäßen in die Synovialflüssigkeit und die Synovia transmigrieren. Dies erfolgt als Reaktion auf die Bildung von Adhäsionsmolekülen durch die Synovialzellen wie z.B. ICAM-1, VCAM-1, P-Selectin und E-Selectin. Polymorphkernige Granulozyten sind in der Lage eine Vielzahl von gewebsschädigenden Substanzen auszuschütten wie Elastase, Myeloperoxidase, Kollagenase, Lysozyme oder Matrix-Metalloproteinasen. Die Entzündungsreaktion im Gelenk wird durch eine komplexe Zytokinkaskade unterhalten. Eine entscheidende Funktion kommt dabei sehr wahrscheinlich  $\text{TNF}\alpha$  zu (s. dazu auch 1.6).  $\text{TNF}\alpha$  induziert nicht nur die Proliferation von B- und T-Lymphozyten, sondern regt die Synovialzellen auch zur Produktion von Kollagenasen, Matrix-Metalloproteinasen und Prostaglandinen an (Brennan et al., 1992). Der Entzündungsprozess wird außerdem von Mastzellen beeinflusst, die z.B. nach Aktivierung durch das Komplementsystem zur Ausschüttung von Histamin,  $\text{TNF}\alpha$ , und verschiedener gewebsschädigender Proteasen

angeregt werden. Maßgeblich am Entzündungsprozess beteiligt ist auch das Komplementsystem. Beispielsweise sind in den obersten Knorpelschichten Immunkomplexe bestehend aus Komplement und selbst-aggregierendem IgG nachweisbar (Jasin, 1985), die ebenfalls eine lokale Entzündungsreaktion mit Aktivierung von Synovialzellen und B-Lymphozyten hervorrufen.

#### **1.8.4 Die irreversible Gelenkdestruktion**

Unter dem Einfluss einer Vielzahl von proinflammatorischen Zytokinen verändern Synovialzellen ihren Phänotyp, erscheinen hyperplastisch und werden zur Produktion von Enzymen (s.o.) angeregt, die die Synovialzellen zur Invasion in die benachbarten Gewebsstrukturen befähigen. Das so neugebildete und invasiv proliferierende Gewebe wird als Pannusgewebe bezeichnet. Der hyaline Gelenkknorpel wird von entzündlichen Infiltraten aus neutrophilen Granulozyten und Synovialzellen durchsetzt und bindegewebig umgebaut. Im subchondralen Knochen werden Osteoklasten und Chondroklasten durch synoviale Zytokine und Cathepsin B und L aktiviert und führen im Zusammenspiel mit den von den Synovialzellen sezernierten Metalloproteinasen zu fortschreitender Knochendestruktion.

#### **1.8.5 Immunogenetische Prädisposition**

Das gehäufte Auftreten einer rheumatoiden Arthritis in bestimmten ethnischen Gruppen (s.1.2.3) und erhöhte Konkordanzraten bei eineiigen Zwillingen deuten auf eine genetische Mitbeeinflussung in der Krankheitsentstehung hin (Aho et al., 1986; Silman et al., 1993). Zudem lässt sich für Verwandte ersten Grades von an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten ein erhöhtes Erkrankungsrisiko feststellen (Jones et al., 1996). Eine deutliche Assoziation konnte hinsichtlich bestimmter HLA Klasse II- Allele festgestellt werden. Verschiedene HLA- DRB- Allele codieren eine Aminosäuresequenz, die wegen ihrer Sequenzähnlichkeit bzw. Sequenzhomologie auch als *shared epitope* bezeichnet wird. In der kaukasischen Bevölkerung ist beispielsweise das Allel HLA-DRB\*0401 in 50 bis 61 % mit einem relativen Risiko von 5 bis 11 % nachweisbar. Das Allel HLA-DRB\*0404 zeigt sich in 27 bis 37 % mit einem relativen Risiko von 5 bis 14 %. Ursächlich für eine pathogenetische Beteiligung könnte ein verändertes Bindungsverhalten von Antigenen an Zellen, die ein *shared epitope* aufweisen, sein mit Präsentation dieser Antigene gegenüber CD4+ T-Lymphozyten. (Barton, 2006). In diesem Zusammenhang sind Sequenzhomologien bzw. -ähnlichkeiten zwischen dem *shared epitope* und

Aminosäuresequenzabschnitten des *Epstein-Barr-Virus* oder dem *heat shock protein* (HSP) von *E.coli* auffällig, so dass hier die Möglichkeit einer molekularen Mimikry oder einer Kreuzreaktion diskutiert wird (Firestein, 2003).

## **1.9 Die Bedeutung des Mannosebindungslektins (MBL) für die rheumatoide Arthritis**

Das Mannosebindungslektin (MBL; früher auch Mannosebindungsprotein MBP) gehört zu den löslichen Komponenten des angeborenen unspezifischen Immunsystems. Es ist ein Opsonin, das Glykostrukturen, die häufig auf der Oberfläche von bakteriellen, viralen oder parasitären Erregern zu finden sind, erkennt und durch Bindung daran das Komplementsystem aktiviert. Im Rahmen der Akutphasereaktion steigt der Serumspiegel zu Beginn eines Entzündungsprozesses.

### **1.9.1 Die Molekülstruktur des Mannosebindungslektins (MBL) und das MBL-Gen**

Das MBL-Molekül wird in der Leber synthetisiert und umfasst eine Cystein-reiche N-terminale Region, eine Kollagen-ähnliche Helix (*collagen-like helix*), eine  $\alpha$ -helikal gewundene Polypeptidkette (*neck region*) und eine Karbohydrat-Erkennungs-Domäne (*carbohydrate-recognition domain*, CRD). Das MBL-Genprodukt lagert sich zu Trimeren zusammen, die über Disulfidbrücken am N-terminalen Ende verbunden sind (Taylor et al., 1989). Über die Karbohydrat-Erkennungs-Domäne kann MBL an Mannose, Glucose, Fucose und N-Acetyl-Glucosamin binden (siehe Abbildung 4). Die einzelnen Trimere können sich über Disulfid-Brücken am N-terminalen Ende zu Oligomeren verbinden. Im Serum liegt MBL hauptsächlich als Hexamer vor.



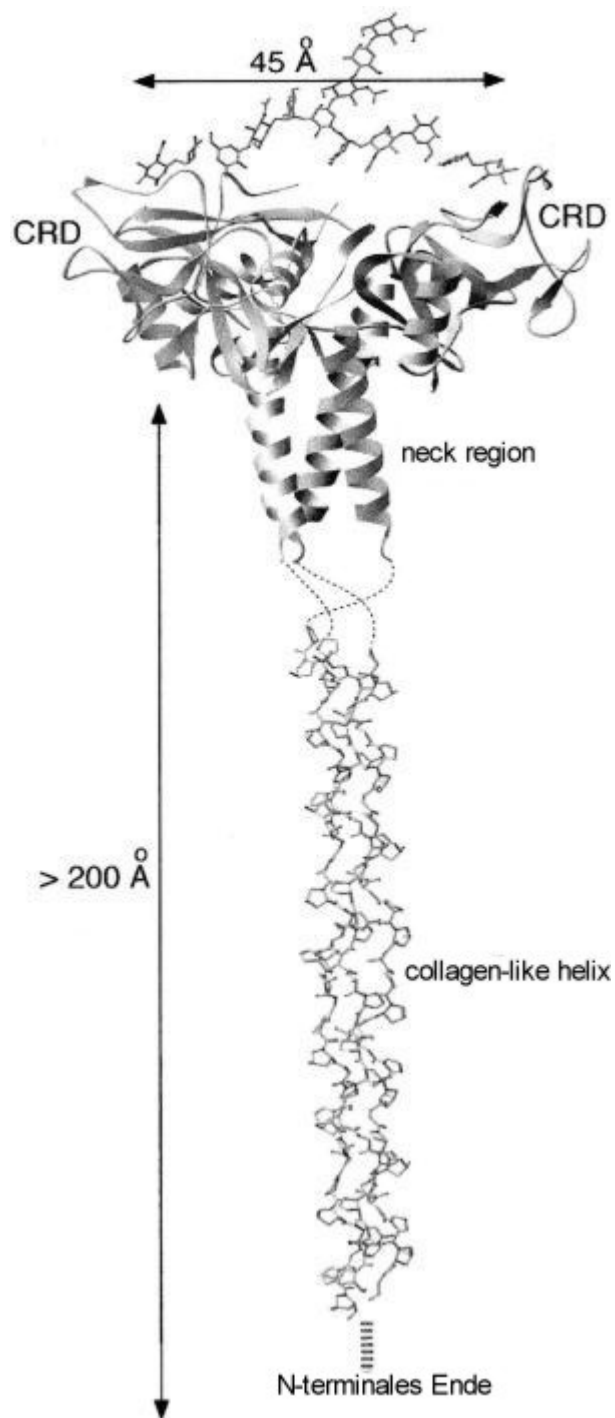
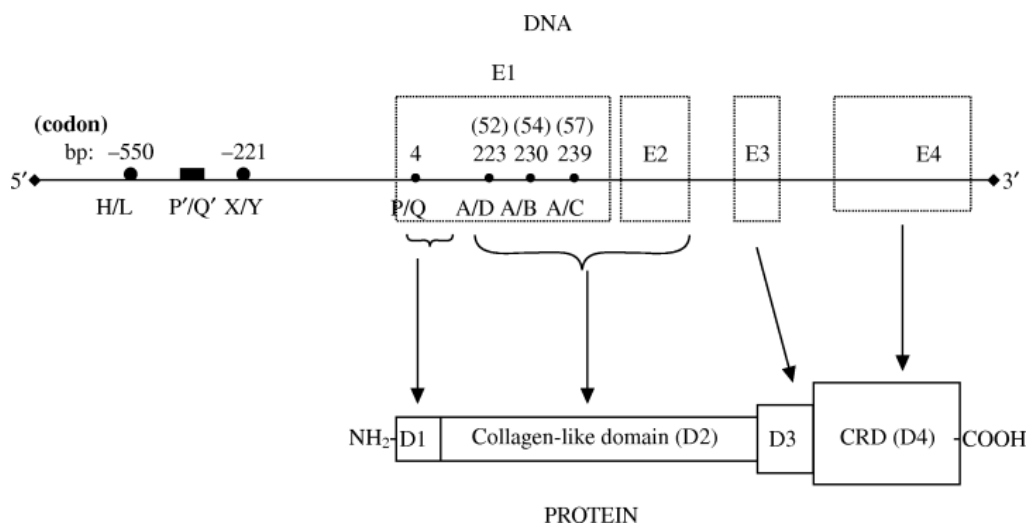


Abb. 4: Molekülstruktur eines MBL-Trimer; nach Ezekowitz et al., 2003

Auffällig sind die Ähnlichkeiten in der Molekülstruktur zwischen MBL und C1q. Die genetische Information für MBL ist auf dem Chromosom 10 (10q11.2-q21) codiert und auf vier Exons (E1-E4) verteilt. Exon 1 und Exon 2 beinhalten die Information für die Kollagen-ähnliche Helix, Exon 3 codiert die *neck region* und Exon 4 enthält den genetischen Code für die Karbohydrat-Erkennungs-Domäne (Taylor et al., 1989; Sastry et al., 1989). Die im Zusammenhang mit der rheumatoiden Arthritis wichtigsten Mutationen befinden sich im Exon 1 und betreffen die Codons 52, 54 und 57 (s. Abb.5).



**Abb. 5:** Genstruktur des Mannosebindungslektins nach Kilpatrick, 2002

### 1.9.2 Die Stellung des MBL im Komplementsystem

Das Komplementsystem stellt eine wichtige Komponente des Immunsystems dar, da es Elemente der adaptiven und der angeborenen Immunität effektiv kombiniert. Die Aktivierung des Komplementsystems führt zur Rekrutierung weiterer Entzündungszellen, zur Opsonierung und ggf. auch zur Lyse pathogener Mikroorganismen. Es sind drei Wege der Komplementaktivierung bekannt, der sogenannte „klassische Weg“, der „alternative Weg“ und der MBL-Weg. Der erste Schritt ist die Bindung von MBL an Zelloberflächen, die Mannose, Glucose, Fucose, N-Acetyl-Glucosamin oder N-Acetyl-Mannosamin aufweisen (Taylor et al., 1989). Die genannten Glykostrukturen finden sich an der Zelloberfläche einer Vielzahl mikrobieller und viraler Erreger, einschließlich Parasiten und Mykobakterien (Fraser et al., 1998). Säugetierzellen und damit auch körpereigene Zellen sind im Gegensatz dazu durch Sialinsäure oder Galactose-Ketten gekennzeichnet und damit kein Ziel des MBL. Darüber hinaus ist MBL auch in der Lage

nekrotische Zellen zu erkennen (Ogden et al., 2001). Kohlenhydrate, die als Antigene von den Karbohydrat-Erkennungs-Domänen erkannt werden, müssen einen Abstand von ca. 4,5 bis 5,3 nm sowie eine zu den Karbohydrat-Erkennungs-Domänen passende räumliche Orientierung aufweisen. Für eine stabile Bindung von MBL an der Zelloberfläche ist zudem die Hexamer-Struktur entscheidend, da durch die Bindung von insgesamt 18 Karbohydrat-Erkennungs-Domänen eine deutlich höhere Bindungsaffinität erreicht werden kann (Arnold et al., 2006). Nach der Bindung von MBL kommt es zur Aktivierung von MBL-assoziierten Serinproteasen (MASP-1 und MASP-2). Dies hat die Spaltung von C4 zur Folge. An diesem Punkt laufen der MBL- und der klassische Weg der Komplementaktivierung zusammen. C4b bindet C2 und bildet zusammen mit dem Spaltprodukt C2b den Komplex C4b2a. Da dieser Komplex die Spaltung von C3 bewirkt, wird er auch C3 Konvertase genannt. Da ein C3-Konvertase-Komplex die Spaltung von mehr als 200 C3-Molekülen bewirken kann, ist in dieser Reaktion die Möglichkeit einer ausgedehnten Amplifikation der Immunreaktion enthalten.

Darüber hinaus stellt C3 ein Verbindungsglied zum alternativen Weg der Komplementaktivierung dar, da C3 neben seiner Funktion als Opsonin auch diesen Weg direkt aktivieren kann. Der Komplex aus C4b, C2a und C3b bildet die C5-Konvertase. C5b bindet C6, C7 und C8. Dieser Komplex ist bereits zur Porenbildung befähigt, der maximale Effekt wird jedoch erst durch die wiederholte Anlagerung von C9 erreicht. Dieser Komplex wird auch als *membrane-attack complex* (MAC) bezeichnet und durchdringt die Zellmembran als Kanal für Ionen und kleine Moleküle, so dass es zur Lyse kommt. Neben dieser Funktion agieren viele Komplementfaktoren auch als Immunmodulatoren im Sinne einer Steigerung der Immunreaktion. Beispielsweise stimulieren C3b und C4a Makrophagen zur Phagozytose opsonierter Pathogene. C3a und C5a üben eine chemotaktische Wirkung auf Leukozyten aus und regen Mastzellen und eosinophile und basophile Granulozyten zur Degranulation an. C3c bewirkt die Ausschwemmung neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark (Goldsby et al., 2000).

### 1.9.3 Die verschiedenen MBL-Genotypen

Die genetische Information für MBL ist auf Chromosom 10 codiert (s. 1.5.1) und auf 4 Exons verteilt. Exon 1 codiert die cysteinreiche Region und einen Teil der kollagenreichen Region. Exon 2 codiert den restlichen Teil der kollagenreichen Region. Exon 3 codiert die *neck region*

und Exon 4 enthält die genetischen Informationen für die Karbohydrat-Erkennungs-Domäne (Taylor et al., 1998; Sastry et al., 1989). Es sind 3 Polymorphismen bekannt, die im Exon 1 liegen und damit den strukturellen Teil des MBL-Moleküls betreffen. Von Sumiya et al. wurde 1991 ein Polymorphismus im Codon 54 beschrieben (230bp), der gegenüber dem Wildtyp A als B-Allel bezeichnet wird und den Einbau von Aspartat anstelle von Glycin in der kollagenreichen Tripelhelix zur Folge hat (GGC→ GAC). In Codon 57 kann ein Polymorphismus vorliegen, der zum Einbau von Glutamin anstelle von Glycin führt (GGA→ GAA) und als C-Allel bezeichnet wird (Lipscombe et al., 1992). Der Polymorphismus in Codon 52 bewirkt den Einbau von Cystein statt Arginin (CGT→ TGT) und wird als D-Allel beschrieben (Madsen et al., 1994). Zusätzlich konnten auch für die Promotorregion 3 Polymorphismen beschrieben werden (Madsen et al., 1995). Diese befinden sich an den Positionen -550, -221 und +4 bp.

#### **1.9.4 Die Häufigkeit der verschiedenen MBL-Genotypen**

Weltweit zeigen sich deutliche Unterschiede in der Häufigkeit der einzelnen Polymorphismen in Exon 1. Der Wildtyp A/A ohne Mutation liegt in Europa mit einer Genhäufigkeit von 0,79 vor, weitaus seltener ist er bei argentinischen Indianern (0,54) nachzuweisen, weitaus häufiger bei Aborigines (1,00). Der in Europa am häufigsten nachzuweisende Polymorphismus ist das B-Allel (Codon 54) mit einer Häufigkeit von ca. 0,14. Am seltensten liegt in Europa das C-Allel vor (0,01) (Kilpatrick, 2002). Demgegenüber konnte für afrikanische Bevölkerungsgruppen das C-Allel in Codon 57 bei 50-60% der Untersuchten festgestellt werden (Lipscombe et al., 1992). In China, Japan und bei den Inuit ist wie in Europa das B-Allel am häufigsten anzutreffen, das C-Allel ist in diesen Populationen nicht nachweisbar (Kilpatrick, 2002). Das D-Allel konnte mit einer Häufigkeiten von 0.05 in afrikanischen und kaukasischen Bevölkerungsgruppen nachgewiesen werden, bei grönländischen Inuit war es nicht nachweisbar (Madsen et al., 1994).

#### **1.9.5 Veränderungen der Molekülstruktur durch die Polymorphismen in Exon 1**

Die Polymorphismen im Exon 1 betreffen den strukturellen Aufbau des MBL-Moleküls, die *collagen-like region*. Die kollagenreiche Tripelhelix ist aus sich wiederholenden Gly-X-Y Triplets aufgebaut, wobei X und Y die neben Glycin vorkommenden Aminosäuren bezeichnen. Da die Punktmutationen im Exon 1 zum Austausch von Glycin (Codon 54 und 57) bzw. Arginin

(Codon 52) führen, ist kein regelrechter Aufbau der Tripelhelix möglich. Dies behindert die Oligomerisation und setzt damit die Bindungsaffinität von MBL herab (Sumiya et al., 1991; Arnold et al., 2006; Wallis und Cheng, 1999). Zudem wird ein verstärkter Abbau (Naito et al. 1999) und eine verminderte Sekretion mutierter MBL-Varianten diskutiert (Heise et al., 2000).

### **1.9.6 Die Polymorphismen in Exon 1 und der MBL-Serumspiegel**

Studien in verschiedenen ethnischen Gruppen haben gezeigt, dass die oben beschriebenen Polymorphismen meist mit einem niedrigeren MBL-Serumspiegel einhergehen. Dabei hat sich zwar ein dominanter Effekt der jeweiligen Mutationen gezeigt, es konnte bisher aber kein vorhersagbarer Zusammenhang zwischen den bekannten Haplotypen und dem MBL-Serumspiegel hergestellt werden, so dass von einer komplexen Regulation der MBL-Produktion in den Hepatozyten auszugehen ist. Die Basenaustauschmutation in Codon 54, d.h. das B-Allel mit dem Genotyp (A/B) ist in der Regel mit einem erniedrigten MBL-Serumspiegel verbunden. Dieser Effekt tritt noch deutlicher bei Homozygotie zutage (Sumiya et al., 1991). Auch die Punktmutation in Codon 57, d.h. das C-Allel, korreliert mit einem erniedrigten MBL-Serumspiegel, der bei homozygotem Vorliegen der Mutation ebenfalls deutlicher ausgeprägt ist (Lipscombe et al., 1992). Derselbe Effekt konnte auch für den Polymorphismus in Codon 52, d.h. für das D-Allel nachgewiesen werden. Die am deutlichsten erniedrigten MBL-Serumspiegel lagen bei Homozygotie des Polymorphismus vor (Madsen et al., 1994). Auffällig ist bei allen Genotyp-Varianten die große Schwankungsbreite der MBL-Serumspiegel. Diese könnten auch durch zusätzliche Polymorphismen im Bereich des MBL-Gens bedingt sein. Weitere bereits bekannte Polymorphismen betreffen z.B. die Promotorregion an den Positionen -550bp und -221bp (H/L bzw. X/Y; Madsen et al., 1995).

### **1.9.7 MBL-Genotypen bzw. MBL-Serumspiegel und die rheumatoide Arthritis**

Aufgrund der zentralen Stellung des MBL in der Komplementaktivierung und der daraus potentiell resultierenden entzündlichen Reaktion wurde eine pathogenetische Beteiligung an der rheumatoiden Arthritis vorgeschlagen.

Graudal et al. konnten zeigen, dass ein großer Anteil der an RA erkrankten Patienten niedrige oder nicht messbare MBL-Serumspiegel aufwiesen. Der Anteil der Patienten mit nicht

messbarem MBL-Serumwerten war signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Patienten mit niedrigen MBL-Serumspiegeln waren signifikant jünger bei Krankheitsbeginn, hatten eine höhere Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und eine höhere Anzahl geschwollener Gelenke (Graudal et al., 1998). Zudem konnte für MBL-defiziente Patienten ein höheres Risiko für einen radiologisch sichtbaren Progress von Gelenkerosionen festgestellt werden (Graudal et al., 2000). Auch ein früher Krankheitsbeginn konnte mit einer MBL-Defizienz assoziiert werden (Garred et al., 2000). Gleichzeitig gibt es jedoch Hinweise die darauf hindeuten, dass bei fortgeschrittener oder spät einsetzender rheumatoider Arthritis auch ein hoher MBL-Spiegel für eine hohe entzündliche Aktivität prädisponiert (Garred et al., 2000). Ip et al. konnten zeigen, dass ein niedriger MBL-Spiegel mit einem erosiverem Krankheitsverlauf und dem Auftreten extraartikulärer Manifestationen korreliert (Ip et al., 2000). Ergebnisse, die in die gleiche Richtung weisen, lieferte eine isländische Studie (Saevarsdottir et al., 2001). Hier war in Patienten mit niedrigen MBL-Serumwerten der Behandlungserfolg nach sechsmonatiger Therapie deutlich geringer als in einer Vergleichsgruppe mit normalen MBL-Serumwerten. Zusammenfassend deuten diese Studien auf ein höheres Risiko für einen ungünstigen Krankheitsverlauf in MBL-defizienten Patienten hin. Inwieweit die verschiedenen varianten MBL-Allele das Erkrankungsrisiko für die RA direkt beeinflussen, konnte bislang nicht zweifelsfrei festgestellt werden. Zusammenfassend deuten viele Studien auf ein höheres Risiko für einen prognostisch ungünstigen Krankheitsverlauf von MBL-defizienten Patienten hin. Ob die verschiedenen Genotypen das Risiko an einer rheumatoiden Arthritis zu erkranken, beeinflussen, konnte bislang nicht zweifelsfrei festgestellt werden.

### **1.9.8 Assoziation von MBL-Defizienz mit anderen Erkrankungen**

Niedrige MBL-Serumspiegel, d.h. eine relative MBL-Defizienz, prädisponieren für wiederkehrende oder besonders schwere Infektionserkrankungen (Summerfield et al., 1995). Besonders auffällig ist die erhöhte Empfänglichkeit für rekurrende Infektionen der oberen Atemwege im frühen Kindesalter (Sumiya et al., 1991). Dies lässt auf eine wichtige Funktion von MBL als Bestandteil der angeborenen Immunität während der Ausreifung des Immunsystems schließen. Es zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Empfänglichkeit MBL-defizienter Patienten für Infektionen im Rahmen immunsuppressiver Therapien oder Komorbiditäten, z.B. nach Chemotherapie bei Malignom (Peterslund et al., 2001). Hinsichtlich der Assoziation einer MBL-

Defizienz mit viralen Infektionen wie HIV, HCV und HBV bestehen widersprüchliche Ansichten (Kilpatrick, 2002). Im Bezug auf die Entwicklung eines systemischen Lupus erythematoses (SLE) scheinen niedrige MBL-Serumspiegel ein Risikofaktor zu sein und es besteht eine Assoziation mit MBL-Genotypen, die zu niedrigen MBL-Serumspiegeln führen (Ip et al., 1998). Promotor-Polymorphismen, die mit einem niedrigen MBL-Serumspiegel einhergehen, scheinen für einen frühen Krankheitsbeginn des SLE und eine höhere Rate an Organmanifestationen zu prädisponieren (Jakab et al., 2007). Beim SLE kommt es zur Ablagerung von Immunkomplexen. Es wird vermutet, dass mit dem MBL-Mangel eine Verringerung der Kapazität des Immunsystems Immunkomplexe zu eliminieren einhergeht. Auf diese Weise wird die Entwicklung des SLE begünstigt. Auch die Entwicklung einer Sepsis bzw. eines *systemic inflammatory response syndromes* (SIRS) kann bei MBL-insuffizienten Patienten begünstigt werden (Garred et al., 2003). Interessanterweise scheint ein niedriger MBL-Spiegel allerdings auch einen Schutz vor Infektionen mit (intrazellulären) parasitären Erregern wie *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum* oder *Leishmania chagasi* darzustellen (Luty et al., 1998; El Sahly et al., 2004; Santos et al., 2001). Bevölkerungsgruppen, die einem hohen Infektionsrisiko durch derartige Erreger ausgesetzt sind, könnten demnach von niedrigen MBL-Serumspiegeln im Sinne eines evolutionären Selektionsvorteils profitieren.

## **1.10 Die Bedeutung von TNF $\alpha$ für die rheumatoide Arthritis**

TNF $\alpha$  ist ein Schlüsselzytokin für die Regulation der Immunantwort sowohl in der Auseinandersetzung mit pathogenen Erregern als auch im Rahmen autoimmuner Entzündungsprozesse. Transgene Mäuse, die TNF überexprimieren, entwickeln ein der rheumatoiden Arthritis sehr ähnliches Krankheitsbild (Keffer et al., 1991). Die pathogenetische Bedeutung von TNF $\alpha$  wird durch den Erfolg der spezifisch gegen TNF $\alpha$  gerichteten und therapeutisch eingesetzten monoklonalen Antikörper bzw. löslichen TNF $\alpha$ -Rezeptoren unterstrichen (Klippel, 2000; Listing et al., 2006).

### **1.10.1 Molekülstruktur des Tumornekrosefaktors $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) und das TNF $\alpha$ -Gen**

TNF $\alpha$  kann von aktivierten T-Lymphozyten und Monozyten sezerniert werden und bindet an die Rezeptoren TNF RI (p55) und TNF RII (p75) (Vassali, 1992). Es wird zunächst als 26kDA Protein sezerniert, lagert sich zu Homotrimeren zusammen und wird dann durch das TNF $\alpha$

*converting enzyme* (TACE) in 17kDA Monomere gespalten. Die genetische Information für TNF $\alpha$  ist auf dem Chromosom 6 im Bereich des MHC III Komplexes codiert.

### **1.10.2 Die pathogenetische Wirkweise von TNF $\alpha$ bei der rheumatoiden Arthritis**

TNF $\alpha$  wird unter anderem von aktivierten Synovialmakrophagen und Fibroblasten im entzündeten Gelenk ausgeschüttet und ist sowohl im Serum als auch in der Gelenkflüssigkeit nachweisbar. TNF $\alpha$  wirkt in erster Linie proinflammatorisch auf die an der Entzündungsreaktion beteiligten Zelltypen. TNF $\alpha$  stimuliert die Synovialzellen zur Produktion von Kollagenase und Prostaglandin E<sub>2</sub> und fördert damit die histologischen Umbauvorgänge im Gelenk. Zusätzlich stimuliert TNF $\alpha$  die Knochenresorption, inhibiert die Knochenneubildung und die Proteoglykansynthese, und stimuliert die Proteoglykanresorption im Gelenkknorpel (Dayer et al., 1985; Bertolini et al., 1986; Saklatvala, 1986). Die Ausschüttung von TNF $\alpha$  bewirkt zudem eine Proliferation von Fibroblasten und induziert die Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 oder GM-CSF. TNF $\alpha$  ist dabei eingebunden in ein sich selbst verstärkendes Zytokinnetzwerk. So wird beispielsweise die TNF $\alpha$ -Ausschüttung durch *macrophage migration inhibiting factor* (MIF)- sezernierende Fibroblasten angeregt (McInnes, 2004), die ihrerseits durch TNF $\alpha$  stimuliert werden (s.auch 1.8.2).

### **1.10.3 Polymorphismen im Bereich des TNF $\alpha$ -Gens**

Für das TNF $\alpha$ - Gen sind mehrere Polymorphismen bekannt. Diese sind entweder durch einzelne Basenaustauschmutationen definiert oder durch sogenannte Mikrosatelliten, d.h. Basen-repeats in den nicht transkribierten Introns, die ggf. durch Konformationsänderung der DNA die Transkription beeinflussen (Field, 2001). Der Polymorphismus an Position -308 bp führt zum Austausch von Guanin durch Adenin und liegt innerhalb der Promotorregion. Er ist Teil des HLA-A1-B8-DR3-DQ2-Haplotyps. Weitere Polymorphismen wurden an den Positionen -376 bp, -238 bp, +70 bp und +489 bp festgestellt. Aufgrund der Lage des TNF $\alpha$ - Gens innerhalb des MHC III Komplexes stellt sich die Frage nach einem möglichen *linkage disequilibrium* in der Vererbung der Polymorphismen (Field, 2001).



#### **1.10.4 Die Häufigkeit des TNF $\alpha$ - Promotor- Polymorphismus -308 und der TNF $\alpha$ - Serumspiegel**

Das Wildtyp-Allel, auch als „TNF1“ (-308G) bezeichnet, ist bei ca. 80%, die mutierte Variante „TNF2“ (-308A) bei ca. 20% der kaukasischen Normalbevölkerung nachweisbar (Verweij, 1999). Das TNF2-Allel ist mit dem Haplotyp HLA-A1-B8-DR3-DQ2 assoziiert, der wiederum mit Autoimmunerkrankungen und hohen TNF $\alpha$ -Serumspiegeln assoziiert zu sein scheint (Verweij, 1999). Hinsichtlich der funktionellen Bedeutung des TNF $\alpha$ - Promotor- Polymorphismus -308 bestehen bislang divergierende Ansichten. Eine Reihe von Studien konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen (-308A/G) in Bezug auf die Transkriptionsrate in Zellkulturen oder die in vitro TNF $\alpha$ -Ausschüttung beispielsweise in Blutkulturen und Monozyten zeigen (Brinkmann et al., 1996; Cuenca et al., 2002; Danis et al., 1994; Verweij, 1999). Demgegenüber stehen Studien von Bouma et al. und Kroeger et al., in denen eine niedrige TNF $\alpha$ -Ausschüttung durch kultivierte Monozyten mit dem Genotyp TNF1 (Bouma et al., 1996) und eine bis zu 2fach erhöhte Transkriptionsrate für den Genotyp TNF2 nachgewiesen werden konnte (Kroeger et al., 1997; Wilson et al., 1997). Interessante Ansätze lieferte in der Folge eine Studie von Kroeger et al., die eine deutliche Abhängigkeit der Genotyp-spezifischen Promotoraktivität von den verwendeten Zelltypen und den zur TNF $\alpha$ -Produktion eingesetzten Stimuli zeigte (Kroeger et al., 2000).

#### **1.11 Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der MBL-Allele A, B, C und D sowie der TNF $\alpha$ -Genotypen TNF1 und TNF2 in einer Gruppe von Patienten mit rheumatoider Arthritis, die nicht mit *disease modifying antirheumatic drugs* (DMARD) oder TNF $\alpha$ -Antagonisten (*biologicals*) vorbehandelt waren. Zusätzlich wurde die Assoziation verschiedener klinischer und laborchemischer Parameter untereinander und mit den jeweiligen Genotypen analysiert. Als Vergleichskollektiv diente eine Gruppe gesunder Probanden.

## **2 Material und Methoden**

---

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Laborgeräte**

##### *DNA –Isolierung und PCR:*

DNA Thermal Cycler 480, Perkin Elmer; Bodenseewerk Perkin Elmer & Co GmbH, Überlingen; Spektralphotometer: UV-160A, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg; Zentrifuge: GPKR, Beckman Instruments Inc., Beckman Coulter GmbH, Krefeld; Tubes: Falcon Tubes, Becton Dickinson Labware, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA; Saarstedt AG & Co, Nümbrecht; Pipettenspitzen: Saarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland; Axygen Inc., Union City, USA.

##### *Gelelektrophorese:*

Gelkammern: QS 710 Quick Screen, Shelton Scientific IBI, Shelton, USA; QS 710 Kodak Biomax, New Haven, USA; Horizon 11.14, Bethesda Research Laboratories Life Technologies Inc., Gaithersburg, USA; Elektrophoresegerät: Power Pack 300, Bio Rad Laboratories GmbH, München.

##### *Dokumentation der Gelelektrophorese:*

Gel Doc 1000, Bio-Rad Laboratories GmbH, München; Software: Multi-Analyst, Version 1.1, Bio-Rad Laboratories GmbH, München; Digital Colour Printer CP-D1E, Mitsubishi Electric Europe B.V., Ratingen; UV-Tisch: 2011 Macrovue Transluminator, LKB-Produkte AB, Bromma, Schweden.

#### **2.1.2 Chemikalien**

Agarose serva, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg; Agarose serva high EEO, Serva Feinbiochemica GmbH & Co.Kg, Heidelberg; Mineral Oil, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen; Molekulargewichtsstandard: 100bp DNA Ladder, Invitrogen, Karlsruhe; Nusieve GTG Agarose, Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, USA; Ultrapure dNTP Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg; Bovine Serum Albumin (BSA) Acetylated 10mg/ml Promega Corporation, Mannheim.

Alle weiteren Chemikalien wurden in Analysequalität von verschiedenen Anbietern bezogen.

### 2.1.3 Kits

Puregene DNA Isolation Kit, Gentra Systems, Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf

Wizard® PCR Preps DNA Purification System, Promega Corporation, Mannheim

### 2.1.4 Enzyme

Taq DNA Polymerase, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Mbo II (*Moraxella bovis*, 8u/μl) Promega Corporation, Mannheim

Ban I (*Bacillus aneurinolyticus*, 12u/μl) Promega Corporation, Mannheim

Mlu I (*Micrococcus luteus*, 10/μl) Promega Corporation, Mannheim

Hha I (*Haemophilus haemolyticus*, 10u/μl) Promega Corporation, Mannheim

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit H<sub>2</sub>O bidest. angesetzt.

#### *PCR und Gelelektrophorese:*

TBE Puffer (5x): nach Sambrook et al., 1989:

54 g Tris-Base

27,5 g Borsäure

20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

GeneAmp® 10x PCR Buffer, Applied Biosystems Roche, Mannheim

Ethidiumbromid Lösung 1%, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

6x loading dye, MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

#### *DNA-Isolierung nach der Aussalzmethode:*

0,1 % Triton X100 –Lösung:

935 μl TritonX100

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

Lysis-Puffer:

50 ml 1 M NaCl (=14,61g NaCl/ 250 ml H<sub>2</sub>O)

12,5 ml 0,1 M EDTA (=3,72g EDTA/100 ml H<sub>2</sub>O; mit 10N NaOH auf pH 8.0 einstellen)

ad 500 ml H<sub>2</sub>O

10% SDS-Lösung:

2,5 g Sodium Dodecyl Sulfate

ad 250 ml H<sub>2</sub>O

Proteinase-K-Lösung:

20 mg Proteinase K

ad 1 ml H<sub>2</sub>O

6 M NaCl-Lösung:

35,064 g NaCl

ad 100 ml H<sub>2</sub>O

TE8-Puffer:

5 ml 0,1 M Tris-HCl (=1,21g Tris/100 ml H<sub>2</sub>O; mit HCl auf pH 8.0 einstellen)

0,5 ml 1 M EDTA (s. Lysis-Puffer)

ad 50 ml H<sub>2</sub>O

*Restriktionslängenpolymorphismus (RFLP)-Verdau:*

Re 10x Buffer (Buffer B,C,D,G), Promega Corporation, Mannheim

### **2.1.6 Primer**

Alle Primer wurden von der MWG-Biotech AG, Ebersberg, bezogen.

**Tab. 2:** In den verschiedenen Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) eingesetzte Primer.

T<sub>m</sub>: mittlerer Schmelzpunkt; (F) und (R) geben an, ob sich der Primer an den codogenen (F, forward) oder anticodogenen Strang (R, reverse) anlagert. Zu den Besonderheiten der TNF $\alpha$ -Primer und D-Allel-Primer s. 2.3.3.

Primer	Primersequenz	T <sub>m</sub> (°C)
MBK (1) (F)	5'-AGT CGA CCC AGA TTG TAG GAC AGA G-3'	64,6
MBL (1) (R)	5'-AGG ATC CAG GCA GTT TCC TCT GGA AGG-3'	68
MBL-D (F)	5'-CAT CAA CGG CTT CCC AGG CAA AGA CGC G-3'	71
MBL-D (R)	5'-AGG ATC CAG GCA GTT TCC TCT GGA AGG-3'	68
pTNF-CS	5'-TGA AGC CCC TCC CAG TTC TAG TTC T-3'	64,6
pTNF1	5'-TGA CTG ATT TGT GTG ATG GAC CCT GGA GGC TGA ACC CCG TCA-C-3'	>75
pTNF2	5'-TAG GAC CCT GGA GGC TGA ACC CCG TGC T-3'	72,4

## 2.2 Patienten und Proben

Die in dieser Arbeit untersuchten Proben stammen von 30 Patienten des *Sane Guruji Hospital*, des *Seth Tacharand Ayurvedic Hospital* und des *Sancheti Institute of Orthopaedics and Rehabilitation* in Poona, Indien. Sie wurden gemeinsam mit den klinischen Daten zu dieser Studie in den Jahren 1992-95 von Frau Dr. Gudrun Ulrich-Merzenich zusammengetragen. Als Kontrollgruppe dienten 20 gesunde Inder aus Poona, Indien und aus Deutschland. Alle an der Untersuchung beteiligten Personen gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Durchführung der Studie und die Studie wurde von den Ethikkommissionen der beteiligten Institutionen genehmigt. Alle Untersuchungen wurden an venösem Blut durchgeführt, welches mit EDTA oder ACD-Reagenz (Maniatis et al., 1989) antikoaguliert und dann bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C aufbewahrt wurde.

### 2.2.1 Auswahl der Patienten

Bei den in die Studie eingeschlossenen Patienten wurde eine rheumatoide Arthritis nach den ARA Kriterien (Arnett et al. 1988) diagnostiziert (s.1.1). Ausschlusskriterien waren:

- 1) Erhöhung der Serum-ALT, -AST oder der Bilirubinkonzentration über den Normalbereich, Hepatitis innerhalb der letzten 12 Monate oder Nachweis des Hepatitis B-Oberflächen Antigens

- 2) Nachweis des HIV I oder HIV II Antigens
- 3) Zusätzliche komplizierende Erkrankungen wie Tuberkulose oder andere chronische Infektionen, Krebserkrankungen oder jede andere schwere Erkrankung
- 4) Schwangerschaft
- 5) Gastrointestinale Blutungen in der Anamnese oder floride Magengeschwüre
- 6) Alter unter 20 Jahre
- 7) Intermittierende intraartikuläre Kortikosteroidinjektionen oder kontinuierliche Einnahme von langsam wirkenden DMARDs (disease modifying antirheumatic drugs) innerhalb von 3 Monaten vor Eintritt in die Studie
- 8) Unregelmäßige Einnahme nichtsteroidaler Antiphlogistika (nonsteroidal antiinflammatory drugs NSAIDs) oder unregelmäßige Einnahme von Kortikosteroiden innerhalb eines Monats vor Eintritt in die Studie

### **2.2.2 Klinische Untersuchung der Patienten**

Bei allen Patienten wurde eine vollständige Anamnese erhoben und eine körperliche Untersuchung durchgeführt. Außerdem wurden ein Routine-Blutbild, eine Routineuntersuchung des Urins und eine Thorax-Röntgenaufnahme gemacht. Zu den klinischen Parametern, die für die Studie erhoben wurden, zählten:

- 1) Untersuchung und Einteilung der geschwollenen Gelenke (58 untersuchte Gelenke), der druckschmerzhaften Gelenke (60 untersuchte Gelenke) und der schmerzhaften Gelenke (60 untersuchte Gelenke) auf einer Skala von 0 bis 4 (0= absent, 1= mild, 2= moderate, 3= severe, 4= very severe )
- 2) Ritchie-Index (RI) (Ritchie et al., 1968) s. Anhang
- 3) Schmerzindex auf einer visuellen Skala von 0-100 oder wahlweise bei Analphabeten eine Auswahl von vier verschiedenen Gesichtsausdrücken in Kombination mit der visuellen Skala
- 4) Morgensteifigkeit gemessen in Minuten
- 5) Einteilung der Patienten nach den Steinbrocker-Kriterien (Steinbrocker et al., 1949)
- 6) Functional status score nach Raspe (Raspe, 1990) entsprechend dem Funktionsfragebogen Hannover (FfbH)

### **2.2.3 Erhebung der biochemischen Daten**

Die Routine-Laborparameter (Leukozyten, Thrombozyten, Erythrozyten, Hämoglobin) wurden am Studienort bestimmt. Die BSG wurde nach der Wintrobe-Methode bestimmt. CRP und RF wurden aus codierten tiefgefrorenen Proben in der Medizinischen Poliklinik, Bonn bestimmt, MBL im Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston. CRP und RF wurden mittels Nephelometrie bestimmt (Beckmann ARRAY Inc., Fullerton, USA, RF am Studienort auch durch Latexagglutination. Die Hyaluronsäurekonzentration wurde durch RIA (Pharmacia, Uppsala, Schweden) in der National Facility for Animal Tissue and Cell Culture, Poona, Indien bestimmt. Die Intraassay- Variabilität lag bei 0,4 bis 9%, die Interassay-Variabilität bei 3 bis 10%. Die Serumproben wurden zwischen 10.00 Uhr und 12.30 Uhr entnommen, um eine Verfälschung durch den morgendlichen Anstieg der Hyaluronsäure zu vermeiden. Die MBL-Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt (Schweinle et al., 1989).

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Isolierung genomischer DNA**

Die genomische DNA wurde aus im Blut vorhandenen kernhaltigen Zellen gewonnen. Dabei handelt es sich in erster Linie um Leukozyten. Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem Puregene DNA Isolation Kit und nach der von Miller beschriebenen Aussalzmethode (Miller et al., 1988).

#### *Prinzip der DNA Isolierung:*

Zunächst werden die kernlosen Erythrozyten lysiert und abzentrifugiert. Daran schließt sich die Lyse der kernhaltigen Zellen und der RNA-Abbau an. Dann werden die Proteine ausgefällt und die DNA abzentrifugiert. Zuletzt wird die DNA mit Alkohol ausgefällt und mit TE8-Puffer rehydratisiert.

### **2.3.2 DNA Isolierung mit dem Puregene DNA Isolation Kit**

Die Isolierung der DNA erfolgte nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll aus 10 ml Blutproben. Der Erfolg wurde über eine photometrische Reinheitsbestimmung und eine Gelelektrophorese kontrolliert.

Zur Lyse der Erythrozyten wurden die Blutproben in einem 50 ml Tube mit 30 ml Erythrozytenlysispuffer versetzt, durchmischt und für 10 min inkubiert. Die Probe wurde bei 2500 x g für 15 min zentrifugiert und der die Erythrozytenreste enthaltende Überstand verworfen. Das weiße Pellet enthielt die Leukozyten und wurde in dem verbliebenen Flüssigkeitsrest resuspendiert. Durch Zugabe von 10 ml Zell-Lyse-Lösung wurden dann die Leukozyten lysiert. Der sich anschließende RNA-Abbau ist optional und wurde nur bei einem Teil der Proben durchgeführt. Dazu wurden die Proben mit 50 µl RNase A-Lösung durchmischt und bei 37°C für 30 min inkubiert.

Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur mit 3,33 ml Protein Precipitation Solution versetzt und der Ansatz 20 sec lang mit dem Vortex durchmischt. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 2500 x g lagerten sich die ausgefallenen Proteine als braunes Pellet ab. Der Überstand enthielt die DNA und wurde in ein sauberes 50 ml Tube überführt und mit 10 ml 100% Isopropanol ausgefällt. Die Proben wurden erneut bei 2500 x g 5 min lang zentrifugiert, wodurch sich die DNA als weißes Pellet ablagerte. Der Überstand wurde verworfen und das DNA Pellet mit 10 ml 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde 5 min lang bei 2500 x g abzentrifugiert, das Ethanol verworfen und das DNA Pellet an der Luft getrocknet. Zur Rehydratisierung der DNA wurde das Pellet mit 1 ml DNA Hydration Solution versetzt und 1 h bei 65°C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die hydratisierte DNA wurde bei 4°C aufbewahrt.

### **2.3.3 DNA Isolierung nach der Aussalzmethode**

Die Isolierung wurde wie von Miller et al. (1988) beschrieben durchgeführt. Zur Lyse der Leukozyten und Erythrozyten wurden 5 ml EDTA-Blut mit 45 ml sterilem bidest. Wasser versetzt und 30 min bei 4°C inkubiert.

Nachdem der Ansatz 20 min bei 1500 x g zentrifugiert worden war, wurde der Überstand verworfen und das die leukozytären Zellkerne enthaltende Pellet zur weiteren Lyse mit 30 ml Triton X100-Lösung versetzt. Der sorgfältig durchmischte Ansatz wurde wiederum 20 min bei 1500 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mittels 5 ml Lysis-Puffer mittels vortexen resuspendiert.



Anschließend wurden die Zellkerne durch Zugabe von 250µl 10% SDS-Lösung fragmentiert. Um den Ansatz zu durchmischen wurde er vorsichtig gedreht. Das Vortexen sollte zu diesem Zeitpunkt vermieden werden, da Scherkräfte die nun freiliegende DNA schädigen können. Dann wurde den Proben 100 µl Proteinase-K-Lösung (20mg/ml) hinzugefügt, um an der DNA haftende Proteine, wie z.B. Histone, zu entfernen. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde der Ansatz mit sterilen abgebrochenen Pasteurpipetten in 15ml Tubes überführt und mit 1,5 ml 6 M NaCL-Lösung zur Proteinausfällung versetzt. Um die Proteinausfällung möglichst quantitativ erfolgen zu lassen, wurden die Proben auf einem Rotationsschüttler 90 min gemischt. Dieser Ansatz wurde anschließend 20 min bei 3500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum mit sterilen abgebrochenen Pasteurpipetten in ein 50 ml Tube überführt, der Rückstand enthielt die präzipitierten Proteine und konnte verworfen werden.

Um die in dem Überstand enthaltene DNA auszufällen, wurde er mit 25 ml Ethanol (abs.) versetzt. Im ausgefallten Zustand ist die DNA als weißer Faden sichtbar, der sich durch leichtes hin- und herbewegen des Reaktionsgefäßes zu einem DNA-Klumpen zusammenlagert. Dann wurde die DNA mit Hilfe von sterilen, geschmolzenen und zu einem Haken gebogenen Pasteurpipetten aus dem Ansatz gefischt und kurz an der Luft getrocknet. Danach wurde die DNA in 70% Ethanol gewaschen und in 250µl TE8-Puffer gelöst.

### 2.3.4 Spektralphotometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung

Der Reinheitsgrad und die Konzentration der isolierten DNA wurden spektralphotometrisch bestimmt.

*Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren:*

Nukleinsäuren haben auf Grund der konjugierten Doppelbindungen in den Basen ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 260$  nm. Gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Absorption abhängig von der Konzentration  $c$  der Lösung, der Dicke der durchstrahlten Schicht  $d$  und dem für die Substanz spezifischen Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$ :

$$E = \varepsilon \times c \times d$$

E: Extinktion                     $\varepsilon$ : Extinktionskoeffizient

c: Konzentration des gelösten Stoffes                    d: Schichtdicke (1cm)

Nach Maniatis et al. (1989) entspricht  $OD_{260} = 1$  einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  Doppelstrang-DNA.

*Reinheitsbestimmung:*

Der Reinheitsgrad der gelösten DNA lässt sich anhand des Quotienten  $A_{260} / A_{280}$  abschätzen, da im Wellenlängenbereich um 280 nm die aromatischen Aminosäuren der Proteine (Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin) absorbieren können. Der Quotient  $A_{260} / A_{280}$  sollte Werte zwischen 1,8 und 2,0 besitzen. Niedrigere Werte deuten auf eine Proteinkontamination hin, die eine erneute Aufreinigung z.B. durch Phenol-Fällung erforderlich machen.

### 2.3.5 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde 1983 von Kary B. Mullis entwickelt und ermöglicht die *in vitro* Amplifikation definierter DNA-Sequenzen. Damit sich spezifische Primer anlagern können, muss die Sequenz von bekannten DNA-Abschnitten flankiert sein.

Jeder PCR-Zyklus gliedert sich in 3 Phasen:

1. Denaturierung der DNA durch Erhitzen auf 94-98°C: so erhält man DNA-Einzelstränge, die jeweils als Matrize (template) dienen
2. Primeranlagerung (annealing): durch Abkühlung auf Primer-spezifische Temperaturen lagern sich die Primer an komplementäre DNA-Abschnitte an
3. Elongation (extension): bei 72°C wird der DNA-Strang ausgehend von den Primern komplementär zum als Matrize dienenden codogenen und anticodogenen Strang in 5'-3'-Richtung durch die Taq-Polymerase verlängert.

Dieser Zyklus wird in der Regel 35 fach wiederholt. Durch mehrfache Wiederholung dieses Zyklus erfolgt eine nahezu exponentielle Amplifikation der DNA-Sequenz. Im Reaktionsansatz sind Primer, dNTPs und eine DNA-Polymerase im Überschuss enthalten. Außerdem verwendet man einen PCR-Puffer, der optimale Reaktionsbedingungen einstellt.

In dieser Arbeit enthielt der PCR-Puffer 15 mM MgCl<sub>2</sub>, das als Cofaktor der DNA-Polymerase wirkt und Primerannealing, Produktspezifität und die Fehlerrate beeinflusst. Der Puffer enthielt darüber hinaus Tris-HCl und KCl zur Einstellung optimaler pH-Werte bzw. Salzkonzentrationen. Als DNA-Polymerase wurde Taq-Polymerase verwendet, die ursprünglich aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* stammt. Taq-Polymerase besitzt ein Temperaturoptimum von 72°C und überlebt kurzfristig auch Temperaturen von 94°C. So können durch den Denaturierungsschritt immer wieder neue als Matrizen dienende Einzelstränge hergestellt werden, ohne dass neues Enzym hinzugefügt werden muss.

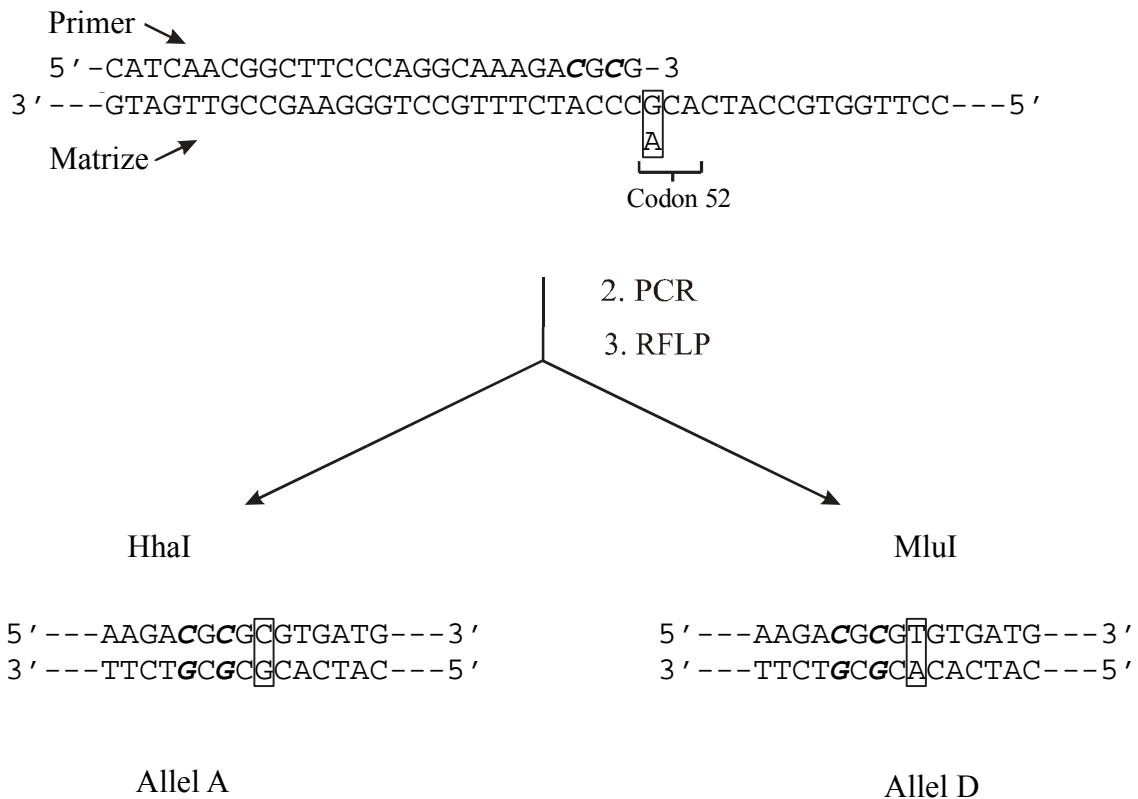
Die Anzahl der Zyklen ist jedoch begrenzt, da die Vermehrungsrate ab einem bestimmten Zeitpunkt auf Grund rehybridisierender PCR-Produkte, denaturierter dNTPs und einer Aktivitätsabnahme der Taq-Polymerase sinkt. Die für das Annealing notwendigen Temperaturen richten sich nach dem spezifischen Schmelzpunkt  $T_m$  der verwendeten Primer, der von Länge und Basengehalt abhängt. Die Annealing-Temperatur sollte 5°C unter dem niedrigeren der beiden Schmelzpunkte der Primer liegen, damit eine sichere Anlagerung aller Primer gewährleistet ist. Die pro Zyklus für die Elongation eingeplante Zeitspanne muss so lang sein, dass die Taq-Polymerase den DNA-Strang auf die gewünschte Länge elongieren kann, bevor die Synthese durch den Denaturierungsschritt unterbrochen wird. Dabei ist von einer ungefähren Syntheserate

von 1 kbp/min auszugehen. Der Zusatz von bis zu 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) verhindert am Template die Spaltung von Sekundärstrukturen. Dadurch kann die Spezifität der PCR und besonders die Amplifikation G, C-reicher Strukturen gesteigert werden (Hung et al., 1990; Masoud et al., 1992). Die PCR wird eingeleitet durch einen längeren Denaturierungsschritt (bis zu 5 min), um eine komplette Denaturierung der Doppelstrang-DNA in Einzelstränge sicherzustellen. An den letzten Zyklus schließt sich ein längerer finaler Elongationsschritt an (5-15 min), um PCR-Produkte, die durch die abnehmende Aktivität der Taq-Polymerase noch nicht vollständig elongiert sind, fertigzustellen.

#### *SDM-PCR:*

Das D-Allel wurde mittels *site directed mutagenesis-PCR* (SDM-PCR) untersucht. In der SDM-PCR werden über einen Primer Mutationen in das PCR-Produkt eingeführt (*SDM priming*), um so in Kombination mit dem Polymorphismus des D-Allels neue Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen zu generieren. In dieser Arbeit wurde ein Primer verwendet, der jeweils ein Cytosin anstelle von Thymin und Guanin enthält und daher in der PCR zur Einlagerung von Guanin in die neugebildeten DNA-Stränge führt (Madsen et al., 1994). Abhängig davon, welcher Polymorphismus vorliegt, entsteht dadurch entweder eine Schnittstelle für HhaI oder für MluI.

## 1. SDM priming



*kursiv*: eingeführte Mutationen;  
 eingerahmt: Polymorphismus des D-Allels  
 Durch einen mutierten Primer werden in den PCR-Produkten in Kombination  
 mit dem Polymorphismus des D-Allels Schnittstellen für HhaI oder MluI generiert

**Abb. 6:** Ablaufschema der SDM-PCR in Anlehnung an Madsen et al., 1994.

*Mutagenically seperated PCR (MS-PCR):*

Die Genotypisierung des TNF $\alpha$ -Promotor-Polymorphismus (-308 G/A) erfolgte mittels MS-PCR. Die MS-PCR beruht auf der Verwendung unterschiedlich langer allelspezifischer Primer in einem Ansatz, die eine sequenzspezifische Auftrennung des PCR-Produkts durch Gelelektrophorese erlauben (Rust et al., 1993). In dieser Arbeit wurden zwei reverse-Primer mit einem Längenunterschied von 15bp (pTNF 1 und pTNF2), die sich allelspezifisch anlagern, und ein nicht-allelspezifischer forward-Primer (pTNF-CS; complementary strand) eingesetzt. Die am 3'-Ende von pTNF1 und pTNF2 an unterschiedlichen Positionen eingefügten Basen verhindern, dass sich nicht passende Primer im Verlauf der PCR anlagern und elongiert werden, da dies zu

einer Fehlpaarung von 3bp führt. Die mutagenetischen Positionen im mittleren Bereich von pTNF1 korrespondieren mit dem 5'-Ende von pTNF2. Bilden sich in den späteren Stadien der PCR Heteroduplexmoleküle zwischen einem kurzen und einem langen Primer aus, verhindert der Basenaustausch, dass diese über das 3'-Ende von pTNF2 hinaus verlängert werden. Da in jeder erfolgreichen PCR mindestens ein Allel amplifiziert wird, sind keine Kontroll-PCRs erforderlich (Schlüter et al., 2002).

Durch die unterschiedlich langen PCR-Produkte erübrigt sich ein Restriktionsverdau, die PCR-Produkte können sofort mittels Gelelektrophorese identifiziert werden. Die in diesem Ansatz verwendeten Primer führen zur Synthese eines 162bp-PCR-Produkte (TNF 1) und eines 147bp-PCR-Produktes (TNF2). Die unterschiedlichen Primerkonzentrationen lassen sich vermutlich durch eine bessere Anlagerung längerer Primer bei hohen Temperaturen erklären (Rust et al., 1993).

**Tab. 3:** Primer für die Mutagenically seperated-PCR (MS-PCR), nach Schlüter et al., 2002.

Primer	Länge (bp)	Konzentration ( $\mu\text{mol/l}$ )	Spezifität
pTNF-CS	25	0,20	unspezifisch
pTNF1	43	0,20	TNF1-Allel
pTNF2	28	0,07	TNF2-Allel

pTNF1: 5' -TGA CTG ATT TGT GTG **ATG** GAC CCT GGA GGC TGA ACC CCG TCA **C**-3'  
 pTNF2: 5' -TAG GAC CCT GGA GGC TGA ACC CCG **TGC** **T**-3'

**Abb. 7:** Primer-Design zur Genotypisierung des TNF $\alpha$ -Polymorphismus (-308 G/A) mittels MS-PCR.

Durch die Verwendung unterschiedlich langer allelspezifischer reverse-Primer (pTNF1 und pTNF2) entstehen abhängig vom Genotyp unterschiedlich lange PCR-Produkte, die sich mittels Gelelektrophorese identifizieren lassen. Zusätzliche Basensubstitutionen verhindern Kreuzreaktionen während der Amplifikation.

**Fett:** mutagenetische Primerpositionen

**Fett und kursiv:** Allel-spezifische Primerpositionen

### 2.3.6 Verwendete PCR-Protokolle

Die PCR-Programme für das A-Allel, B-Allel, C-Allel und D-Allel wurden die von Madsen et al., 1995, beschriebenen PCR-Programme in Anpassung an die verwendeten Geräte gewählt.

**Tab. 4:** Reaktionsansatz für MBL Exon 1: A-Allel, B-Allel und C-Allel

10 µl	Primer Mix (MBK (1) (F) und MBL (1) (R) (0,2 µg/µl pro Primer)
5 µl	10x PCR Puffer
0,4 µl	Taq-Polymerase (2 Units)
5 µl	dNTP Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP; je 0,125 µl dNTP (2,5 mM))
x µl	DNA-Lösung (~1 µg)
optional bis zu 2,5 µl DMSO	
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O dest.

Beim Pippettieren des Reaktionsansatzes wurden Pipettenspitzen mit Filter verwendet um Kontaminationen zu vermeiden.

Nach Herstellung des Reaktionsansatzes wurden die Proben mit 40 µl Mineralöl überschichtet um zu verhindern, dass sich während der PCR durch Kondenswasserbildung die Probenkonzentration ändert.

#### *PCR-Programm für MBP-Exon1: A-Allel, B-Allel und C-Allel*

	5 min	94°C	erste Denaturierung	
29 Zyklen	{	40 sec	94°C	Denaturierung
		40 sec	55°C	Primeranlagerung (annealing)
		3 min	72°C	Elongation
		10 min	72°C	finale Elongation
anschließend Kühlung bei 4°C				

**Tab. 5:** Reaktionsansatz für MBL Exon 1, D-Allel: SDM-PCR

10 µl	Primer Mix (MBL-D (F) und MBL-D (R) (0,2 µg/µl pro Primer)
5 µl	10x PCR Puffer
0,4 µl	Taq-Polymerase (2 Units)
5 µl	dNTP Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP; je 0,125 µl dNTP (2,5 mM))
x µl	DNA-Lösung (~1 µg)
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O dest.

*PCR-Programm für das D-Allel:*

35 Zyklen	{	96°C	4 sec	erste Denaturierung
		96°C	30 sec	Denaturierung
		56°C	30 sec	Primeranlagerung (annealing)
		74°C	1 min	Elongation
		72°C	10 min	finale Elongation
				anschließend Kühlung bei 4°C

Die TNF $\alpha$ -PCRs wurden wie von Schlüter et al., 2002, beschrieben in Anpassung an die verwendeten Geräte durchgeführt.

**Tab. 6:** Reaktionsansatz für den TNF $\alpha$ -Promotor-Polymorphismus (-308 G/A): MS-PCR

0,2 µl	CS-Primer (Endkonzentration: 0,2 µmol/l)
0,2 µl	pTNF1 (Endkonzentration: 0,2 µmol/l)
0,07 µl	pTNF2 (Endkonzentration: 0,07 µmol/l)
10 µl	10x PCR Puffer
0,8 µl	Taq-Polymerase (4 units)
10µl	dNTP Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP; je 500 µmol/l)
6 µl	DNA Lösung (~1 µg)
ad 100 µl	H <sub>2</sub> O dest.



*PCR-Programm für den TNF $\alpha$ -Promotor-Polymorphismus (-308 G/A): MS-PCR*

	95°C	10 min	erste Denaturierung	
40 Zyklen	{	95°C	30 sec	Denaturierung
		64°C	45 sec	Primeranlagerung (annealing)
		73°C	45 sec	Elongation
		73°C	7 min	finale Elongation
	anschließend Kühlung bei 4°C			

### 2.3.7 Gelelektrophorese

Zur Darstellung der PCR-Ergebnisse wurden Agarosegele verwendet.

*Prinzip der Gelelektrophorese:*

Die Gelelektrophorese beruht auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit geladener Moleküle durch ein Agarosegel im elektrischen Feld. Durch die Wirkung des Agarosegels als Molekularsieb ist die Wanderungsgeschwindigkeit nicht nur abhängig von der Ladung des Moleküls und der angelegten Spannung, sondern auch von Größe und Form des Moleküls sowie der Porengröße des Gels. Die Porengröße ist abhängig von der Agarosekonzentration, umso höher die Konzentration, umso kleinere Poren bilden sich während der Polymerisation. Auch die Sekundär- und Tertiärstruktur eines Moleküls kann sein Laufverhalten beeinflussen, so verhält sich circuläre DNA anders als lineare. Die Laufgeschwindigkeit kann gesteigert werden, indem man eine höhere Spannung anlegt, die jedoch nicht so hoch werden darf, dass es zur Erhitzung des Gels kommt. DNA hat auf Grund des „Zucker-Phosphat-Rückgrates“ eine negative Ladung, die bewirkt, dass die DNA-Fragmente in Richtung der Anode laufen. Da kürzere lineare DNA-Stränge schneller laufen als längere, werden die PCR-Produkte entsprechend ihrer Länge aufgetrennt und lassen sich durch Vergleich der Banden mit einem Längenstandard (DNA-Ladder) identifizieren. Der verwendete Längenstandard lieferte Banden im Abstand von 100 kb. Zur Visualisierung der Banden verwendet man Ethidiumbromid, das zwischen die Basenpaare der DNA-Doppelhelix interkaliert. Es enthält ein aromatisches Ringsystem, dessen  $\pi$ -Elektronen bei Anregung durch UV-Licht (366 nm) fluoreszieren. Aus Sicherheitsgründen wurde das Ethidiumbromid direkt dem Gel zugesetzt. Die PCR-Produkte akkumulieren während ihrer Wanderung durch das Gel das Ethidiumbromid.

### 2.3.8 Herstellung der Gele

**Tab. 7:** Ansatz zur Herstellung der Agarosegele

0,7-2% Agarose serva  
 TBE Puffer  
 2,5µl Ethidiumbromidlösung (1%)/50ml TBE Puffer

Die Agarosegele für die Auftrennung der PCR-Produkte wurden in Konzentrationen von 0,7 - 2% in verschiedenen Größen hergestellt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose mit TBE-Puffer (1x) versetzt und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Anschließend wurden der Lösung 2,5µl Ethidiumbromid-Lösung/50ml TBE-Puffer hinzugefügt und das Gel luftblasenfrei in den Gelschlitten gegossen. Mit einem Kamm wurden Taschen im Gel ausgespart. In Abhängigkeit von der Größe des Gels und der Agarosekonzentration nahm die Polymerisation 0,5- 1,5 h in Anspruch. Anschließend wurde das Gel in die horizontale Gelkammer gelegt und vollständig mit Laufpuffer bedeckt (TBE-Puffer). Der Laufpuffer ist notwendig, um die Ladung der Moleküle während des Elektrophoresevorgangs konstant zu halten. Der Längenstandard (DNA-Ladder) wurde im Verhältnis 1: 10 mit TBE-Puffer verdünnt (1µg/ml). Vor dem Auftragen wurden der Längenstandard und die Proben jeweils mit 2 µl Probenpuffer (Loading Buffer) vermischt. Der Loading Buffer enthielt als sichtbare Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol zur Abschätzung der zurückgelegten Laufstrecke und EDTA, welches zweiwertige Ionen komplexiert und damit indirekt DNAsen inaktiviert. Um zu verhindern, dass die Proben nach dem Auftragen aus den Taschen herausdiffundieren, enthielt er außerdem Glycerol zur Erhöhung der spezifischen Dichte. Die Proben wurden in Volumina von 20-50 µl in die Taschen pipettiert und anschließend eine Spannung von 70-130 Volt angelegt.

**Tab. 8:** Ansatz zur Herstellung der Nusieve Agarose Gele

3% Nusieve Agarose Gel (Nusieve Agarose/Agarose serva 4:1)  
 TBE Puffer  
 2,5 µl Ethidiumbromidlösung (1%)/50 ml TBE Puffer

Zur besseren Differenzierung der Banden wurden für die TNF $\alpha$ -PCR 3%ige Nusieve Agarosegele verwendet. Nusieve Agarosegele können in hohen Konzentrationen gegossen

werden und ermöglichen daher eine höhere Auflösung im Bereich von 10-1000 bp. Um das Gel zu stabilisieren, wurden Nusieve Agarose und Agarose Serva im Verhältnis 4:1 gemischt.

Das Gel wurde nach dem vom Hersteller (Cambrex Bio Science) empfohlenen Protokoll (mehrfaches Aufkochen erforderlich) hergestellt.

#### *Dokumentation der Ergebnisse:*

Die Gele wurden mit der Gel Doc 1000 photographiert und mit dem Programm Multi-Analyst, Version 1.1, digital gespeichert. Ausdrücke wurden mit dem Digital Colour Printer CP-D1E von Mitsubishi auf Fotopapier erstellt.

### **2.3.9 Restriktionsverdau**

Zur Genotypisierung wurde neben der Sequenzierung der Verdau der PCR-Produkte durch Restriktionsendonucleasen eingesetzt. Restriktionsendonucleasen sind aus Bakterien stammende Enzyme, deren Aufgabe es ist, das Bakterium vor fremder DNA, insbesondere Phagen-DNA zu schützen. Anhand des Methylierungsmusters kann das Enzym zwischen eigener und fremder DNA unterscheiden. Restriktionsendonucleasen lagern sich an spezifische Erkennungssequenzen, meist Palindrome mit einer Länge von 4-8bp, an und schneiden den DNA-Doppelstrang entweder dort oder in der näheren Umgebung. Grundlage für die Nutzung des Restriktionsverdau zur Genotypisierung ist die Existenz von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP). Dies sind DNA-Polymorphismen, durch die die Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease entweder zerstört oder neugebildet wird. Dementsprechend resultiert der enzymatische Verdau in unterschiedlich langen DNA-Fragmenten, die durch Gelektrophorese detektiert werden können. Ob in der untersuchten Sequenz ein Polymorphismus vorliegt und in welcher Form (homozygot oder heterozygot), lässt sich am Bandenmuster erkennen. Der Reaktionsansatz enthält neben der zu verdauenden DNA und dem Restriktionsenzym acetyliertes Rinderserumalbumin (BSA) und Puffer. BSA erhöht die Aktivität vieler Restriktionsendonucleasen und ist zur Inaktivierung vorhandener Spuren von Nucleasen acetyliert. Der Puffer sollte den für das Enzym optimalem pH Wert einstellen, andernfalls kann es passieren, dass das Enzym Staraktivität zeigt und unspezifisch schneidet.

*Restriktionsverdau für das A-Allel, B-Allel und C-Allel:*

Die A-, B- und C-Allele wurden mit Hilfe der Restriktionsenzyme Ban I und Mbo II detektiert. Ban I spaltet das 349bp-PCR-Produkt bei Vorhandensein des A-Allels in ein 260bp- und ein 89bp-DNA-Fragment, spaltet aber nicht bei Vorhandensein des B-Allels. Mbo II hingegen spaltet das C-Allel in ein 279bp- und ein 70bp-DNA-Fragment.

**Tab. 9:** Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau des A-,B-, und C-Allels

2 µl RE 10X Puffer  
 0,2 µl acetyliertes BSA  
 X µl DNA (PCR-Produkt; ~1 µg/µl)  
 0,5 µl Restriktionsenzym (Ban I, Mbo II)  
 ad 20 µl H<sub>2</sub>O dest.

Der Ansatz sollte zügig pipettiert und die Restriktionsenzyme so kurz wie möglich aufgetaut bleiben. Die Proben wurden 1,5 h bei 37°C (Mbo II) und 50°C (Ban I) im Heizblock bzw. im Heizschrank inkubiert. Anschließend wurden die verdauten PCR-Produkte auf 1,5%igem Agarosegel aufgetrennt und dokumentiert (s. 2.3.7 Gelelektrophorese).

*Restriktionsverdau für das D-Allel:*

Das D-Allel wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme Hha I und Mlu I detektiert. HhaI spaltet das 125-bp PCR-Produkt in ein 100-bp und ein 25-bp Fragment, wenn das A-, B- oder C-Allel vorhanden ist. Mlu I spaltet das D-Allel.

**Tab. 10:** Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau des D-Allels

2 µl RE 10X Puffer  
 0,2 µl acetyliertes BSA  
 X µl DNA (PCR-Produkt; ~1 µg/µl)  
 0,5 µl Restriktionsenzym (Hha I, Mlu I)  
 ad 20 µl H<sub>2</sub>O dest.

Die Proben wurden 2h bei 37°C inkubiert und anschließend auf 2%igem Agarosegel aufgetrennt und dokumentiert (s. 2.3.7 Gelelektrophorese).

### **2.3.10 Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem Wizard® PCR Preps DNA Purification System**

Zur Vorbereitung der Sequenzierung wurde die durch die PCR gewonnene DNA mit dem Wizard® Purification System aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte sowohl aus Agarosegel als auch aus dem PCR-Produkt direkt, jeweils nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll.

Wurde die DNA aus Agarosegelen extrahiert, wurden die Banden direkt im Anschluß an die Gelelektrophorese auf dem UV-Tisch mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten.

#### *Prinzip der Aufreinigung:*

Dieses System beruht auf der Bindung der bei pH-Werten oberhalb von pH 2 stark negativ geladenen DNA an ein Anionenaustauscherharz, das positiv geladene Gruppen enthält. Da sich die Bindungsstärke für DNA von der für andere Verbindungen unterscheidet, kann die DNA von allen anderen noch im Ansatz befindlichen Verunreinigungen wie z.B. Primern, nichteingebauten Nukleotiden oder Gelresten abgetrennt werden.

#### *Durchführung:*

Befand sich die DNA noch im Agarosegel wurde die Gelstückchen zunächst im Wasserbad bei 70°C geschmolzen und dann mit dem Austauscherharz vorsichtig vermischt. PCR-Produkte wurden erst mit *Direct PCR Purification Buffer* versetzt, dann mit dem Harz vermischt und gevortext. Anschließend wurden alle Ansätze mittels Unterdruck, erzeugt durch eine Vakuumpumpe, über eine Minisäule gesaugt.

Das DNA/Harz-Gemisch blieb dabei an einem Filter in der Minisäule haften. Danach wurde jede Minisäule mit 80% Isopropanol versetzt, um die DNA zu waschen. Mittels Vakuumpumpe und kurzer Zentrifugation wurde das Isopropanol entfernt und die Minisäule danach mit 50 µl H<sub>2</sub>O bidest. versetzt, 1 min stehen gelassen und dann in Eppendorfgefäßen 20 sec bei 10000xg zentrifugiert. Das Eluat enthielt die DNA.

### 2.3.11 Sequenzierung

Die mittels Restriktionsverdau ermittelten Genotypen wurden durch die Sequenzierung der PCR-Produkte nochmals überprüft. Hierzu wurden die PCR-Produkte der verschiedenen Allele ohne Kennzeichnung des Genotyps an das Molekularbiologische Labor des Instituts für Biochemie, Universität Bonn, gegeben. Die Sequenzierung erfolgte durch die Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Ludwig nach dem Verfahren der zyklischen Sequenzierung mittels Kettenabbruch (Sanger et al., 1977).

#### *Prinzip der zyklischen Sequenzierung:*

Wie bei einer PCR wird Einzelstrang-DNA mit Hilfe von Primern, Desoxynukleosidtriphosphaten (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) und hitzebeständiger DNA-Polymerase sequenzspezifisch amplifiziert (s. 2.3.5). Zusätzlich werden dem Ansatz markierte Dideoxynukleosidtriphosphate (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP) hinzugefügt, deren zufällige Anlagerung in der PCR zur Beendigung des Polymerisationsvorgangs, d.h. zum Kettenabbruch, führt. So entstehen unterschiedlich lange PCR-Produkte mit ablesbaren, da markierten, endständigen ddNTPs. Anschließend werden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Sequenz anhand der radioaktiv oder fluoreszenzmarkierten ddNTPs abgelesen. Für die vorliegende Arbeit wurde ein modifiziertes Verfahren angewandt, bei dem fluoreszenzmarkierte ddNTPs verwendet wurden, die bei unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszieren, so dass die gesamte Reaktion in einem Ansatz ablaufen kann.

#### *Automatische Sequenzierung*

Die automatische Sequenzierung erfolgte mit einem Fluoreszenzsequenzierautomaten der Firma Applied Biosystems (Modell 307A). Das System besteht aus einer Vertikalapparatur zur gelelektrophoretischen Auftrennung der Proben, einem Laserdetektorsystem und einem daran angeschlossenen Computer. Zum Sequenzieren wurde das *Cycle Sequencing Kit* mit *Amplitaq DNA Polymerase-FS* von der Firma Applied Biosystems nach dem Prinzip des *TaqDyeDeoxyTerminatoren-Cycle Sequencing* benutzt.

### 2.3.12 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm SigmaStat, Version 1.01. Zur Untersuchung der Mutationen im Bereich des MBL-Gens wurde die Patientengruppe entsprechend dem Genotyp in die Untergruppen A/A und A/O eingeteilt, wobei die Untergruppe A/O die Genotypen A/B und A/C umfasste. Zur Untersuchung des TNF $\alpha$ -Promotor-Polymorphismus wurden die Untergruppen TNF1 und TNF2 gebildet. „TNF1“ enthielt den Wildtyp ohne Basenaustauschmutation an Position -308, „TNF2“ enthielt die Genotypen mit Basenaustauschmutation von Guanin zu Adenin in homozygoter (TNF2/2) oder heterozygoter variante (TNF1/2).

Anschließend wurden alle vorhandenen klinischen Daten beider Untergruppen vergleichend untersucht. Für Daten, die einer Normalverteilung und gleicher Varianz in beiden Gruppen unterlagen, wurden der T-Test und der Chi-Quadrat-Test verwendet. Daten, die keine Normalverteilung zeigten, wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. P-Werte <0,05 wurden als signifikant bewertet. Korrelationen wurden mit dem Spearman-Korrelationskoeffizienten ( $r_s$ ) untersucht.

### 3 Ergebnisse

---

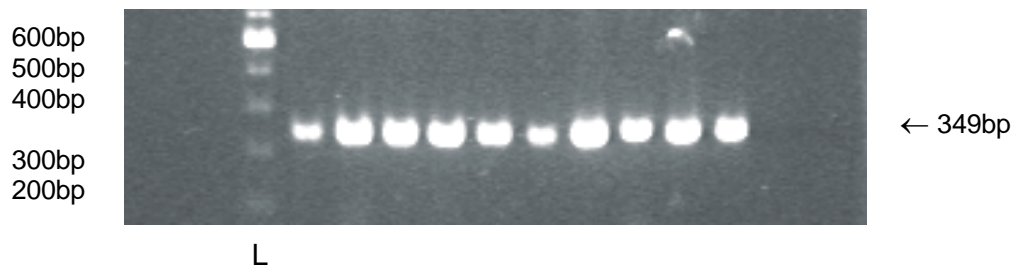
#### 3.1 Ergebnisse der DNA-Isolierung und Reinheitsbestimmung

Die Isolierung der DNA wurde nach der Aussalzmethode nach Miller et al. (1988) oder mit Hilfe des *Puregene DNA Isolation Kits* durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmungen ergaben Werte zwischen 390 µg/ml und 2530 µg/ml bei der Isolierung mit dem Puregene DNA Isolation Kit und Werte zwischen 25 µg/ml und 150 µg/ml bei der Isolierung nach der Aussalzmethode. Zur Reinheitskontrolle wurde der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  errechnet. Dabei wurden Werte zwischen 1,8 und 2,0 erreicht.

#### 3.2 Ergebnisse der DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

##### 3.2.1 Ergebnisse der PCR für das A-, B- und C-Allel

Die Polymerase-Kettenreaktion zur Analyse der A-, B-, und C-Allele lieferte ein 349 bp Produkt, das durch Gelelektrophorese dargestellt wurde. Die Abbildung 8 zeigt beispielhaft die PCR-Produkte von insgesamt 10 Proben.

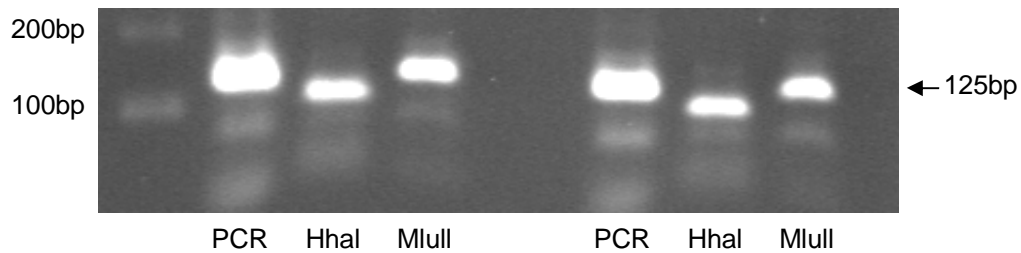


**Abb. 8:** Gelelektrophorese zur Darstellung der Produkte der PCR des A-, B- und C-Allels  
L: Molekulargewichtsstandard (molecular ladder)



### 3.2.2 Ergebnisse der SDM-PCR für das D-Allel

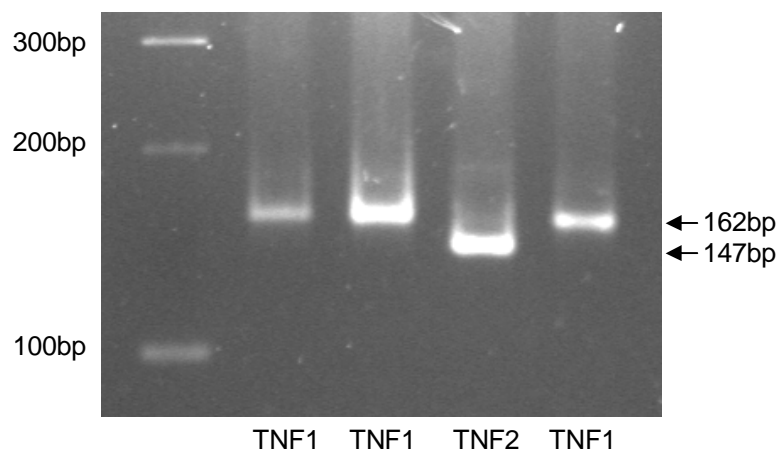
Die *site directed mutagenesis*-PCR (SDM-PCR) diente dazu 125bp- Produkte zu generieren, die in Abhängigkeit vom vorliegenden Genotyp entweder Schnittstellen für HhaI oder MluII enthielten. Abbildung 9 zeigt beispielhaft das 125bp-Produkt der SDM-PCR sowie die Ergebnisse des unterschiedlichen Restriktionsverdau bei Nicht-Vorhandensein eines D-Allels.



**Abb. 9:** Gelelektrophorese zur Darstellung der PCR und des Restriktionsverdau zur Genotypisierung des D-Allels. Die PCR erfolgte als SDM-PCR (s.2.3.3). HhaI spaltet das 125bp-PCR-Produkt in ein 100bp- und ein 25bp-Fragment sofern ein A-, B- oder C-Allel vorliegt. MluII spaltet das PCR-Produkt in ein 100bp- und ein 25bp-Fragment, wenn das D-Allel vorliegt. Hier liegt bei keiner Probe ein D-Allel vor.

### 3.2.3 Ergebnisse der mutagenically seperated- PCR (MS-PCR) für den TNF $\alpha$ -Promotor-Polymorphismus

Die *mutagenically seperated*-PCR (MS-PCR) lieferte ein 162bp-Produkt für den Genotyp TNF1 und ein 147bp-Produkt für den Genotyp TNF2.

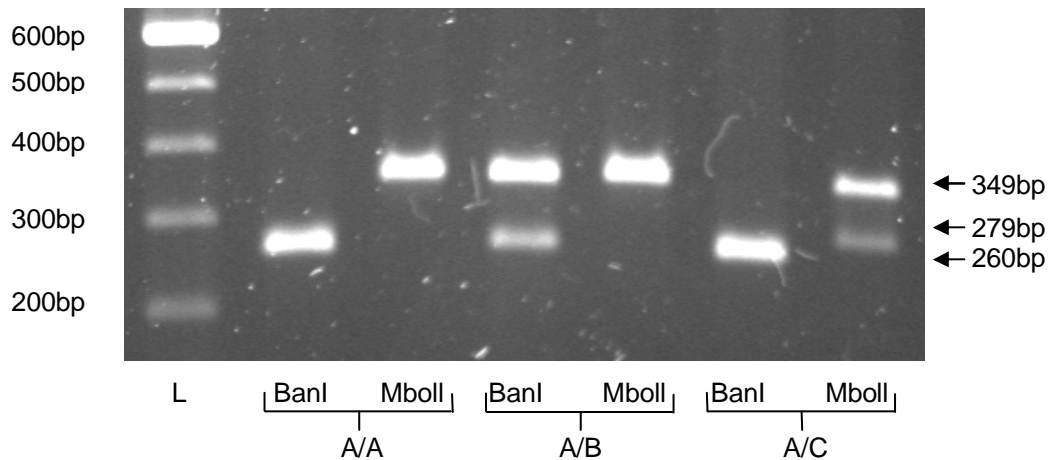


**Abb. 10:** Mutagenically seperated-PCR (MS-PCR) zur Genotypisierung des TNF $\alpha$ -Polymorphismus -308 (G/A). Durch die Verwendung unterschiedlich langer allelspezifischer Primer (pTNF1 und pTNF2) werden zwei allelspezifische PCR-Produkte generiert: das PCR-Produkt für TNF1 (-308 G) mit einer Länge von 162bp und das PCR-Produkt für TNF2 (-308 A) mit einer Länge von 147bp.

### 3.3 Ergebnisse des Restriktionsverdaus

#### 3.3.1 Ergebnisse des Restriktionsverdaus für das A-, B- und C-Allel

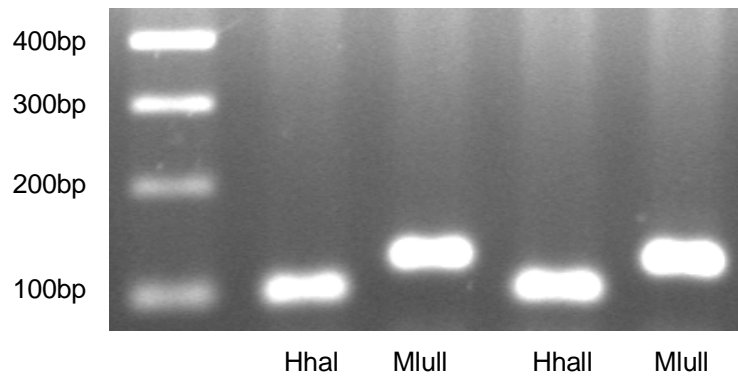
Durch den Restriktionsverdaus mit BanI und MboII wurden die Genotypen A/A, A/B und A/C identifiziert. Das 349bp-Produkt der PCR wurde von BanI in ein 260bp- und ein 89bp-Fragment gespalten, wenn das A-Allel vorlag, nicht aber, wenn das B-Allel vorlag. MboII spaltete das PCR-Produkt, wenn ein C-Allel vorhanden war, in ein 279bp- und ein 70bp-Fragment.



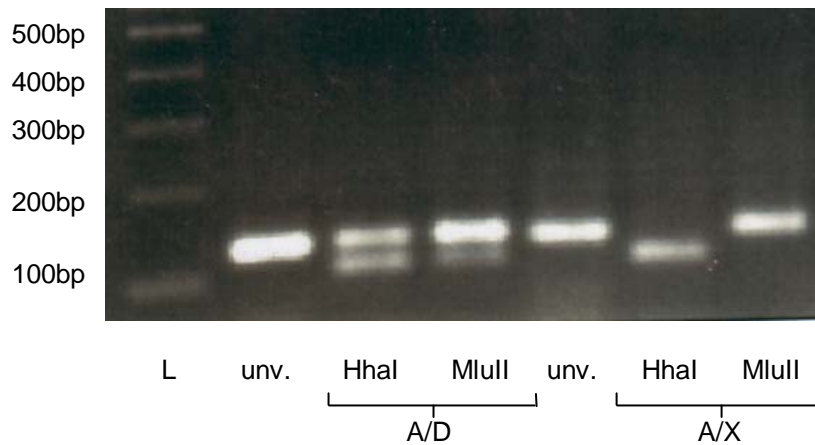
**Abb. 11:** Restriktionsverdaus durch die Restriktionsendonukleasen BanI und MboII: BanI spaltet das 349bp-Produkt, bei Vorhandensein des A-Allels in ein 260bp- und ein 89bp-Fragment, nicht aber, wenn das B-Allel vorliegt. MboII spaltet nur bei Vorhandensein des C-Allels in ein 279- und ein 70bp-Fragment. Die jeweils kleineren Fragmente sind nicht identifizierbar, da sie mit Überresten der PCR zusammenlaufen.

#### 3.3.2 Ergebnisse des Restriktionsverdaus für das D-Allel

Der Restriktionsverdaus des 125bp-PCR-Produktes mittels HhaI und MluII lieferte ein 100bp- und ein 25bp-Produkt. Die A-, B- und C-Allele wurden durch HhaI gespalten, das D-Allel wurde durch MluII gespalten.



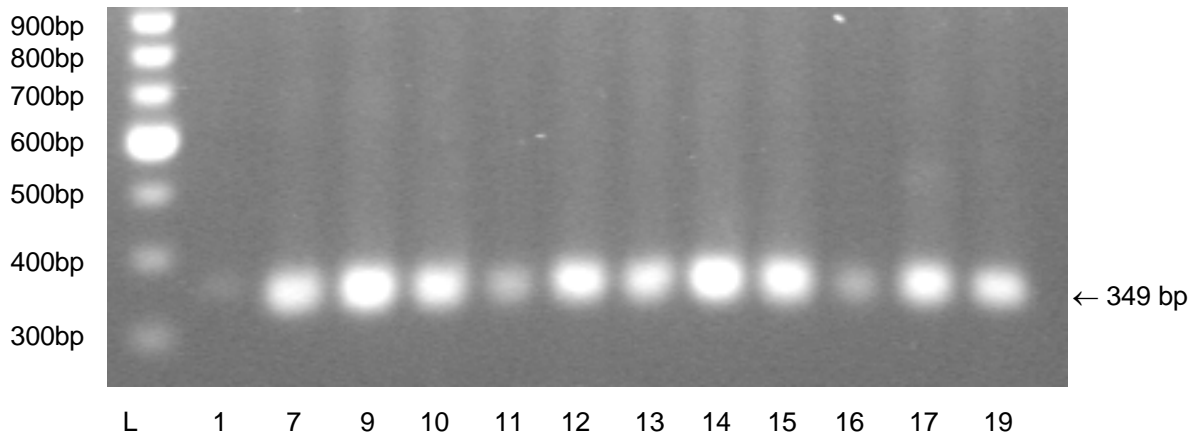
**Abb. 12:** Restriktionsverdau zur Genotypisierung des D-Allels. HhaI spaltet, wenn ein A-, B-, oder C-Allel vorliegt in ein 100bp- und ein 25bp-Fragment, MluII spaltet, wenn ein D-Allel vorliegt. Hier liegt kein D-Allel vor.



**Abb. 13:** Restriktionsverdau zur Genotypisierung des D-Allels. HhaI spaltet, wenn ein A-, B-, oder C-Allel vorliegt in ein 100bp- und ein 25bp-Fragment, MluII spaltet, wenn ein D-Allel vorliegt. Hier liegen die Genotypen A/D und A/X (d.h. A/A, A/B oder A/C) vor. Unv.: unverdaute Kontrolle

### 3.4 Ergebnisse der Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Kontrolle des Aufreinigungsprozesses, der für die Sequenzierung der PCR-Produkte erforderlich war, wurden Gelelektrophoresen durchgeführt. Diese zeigten eine einzelne Bande bei 349bp (PCR für das A-, B-, C- Allel) ohne Nebenbanden und entsprachen damit dem gewünschten Genprodukt.



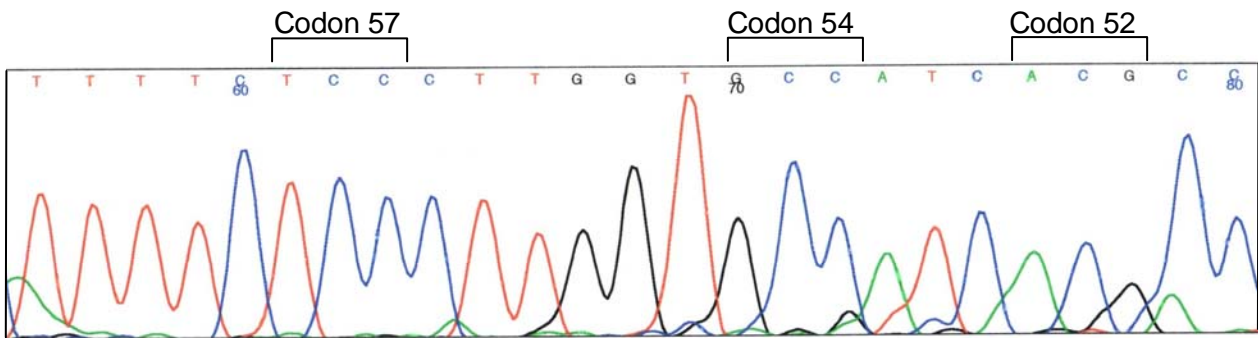
**Abb. 14:** Gelelektrophorese zur Kontrolle der DNA-Aufreinigung; L: Molekulargewichtsstandard; 1-19: Patientenproben;

### 3.5 Ergebnisse der Sequenzierung

Neben der Genotypisierung mittels PCR und anschließendem Restriktionsverdau wurden die Genotypen für das MBL-Gen durch Sequenzierung nach dem Prinzip der zyklischen Sequenzierung bestätigt. Dazu wurde ein Fluoreszenzsequenzierautomat der Firma Applied Biosystems verwendet (s. 2.3.11). Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden digital gespeichert und in der unten dargestellten Form ausgedruckt. Dabei bezeichnen die Buchstaben A, T, G und C die Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin. In Übereinstimmung mit den Farben der Buchstaben steht ein grüner Graph für die Base Adenin, ein roter Graph für die Base Thymin, ein schwarzer Graph für Guanin und ein blauer Graph für Cytosin. In den Fällen, in denen eine heterozygote Mutation vorliegt, wird der Buchstabe N (in schwarz) verwendet und beide Basen als Graph dargestellt.

### 3.5.1 Das Allel A

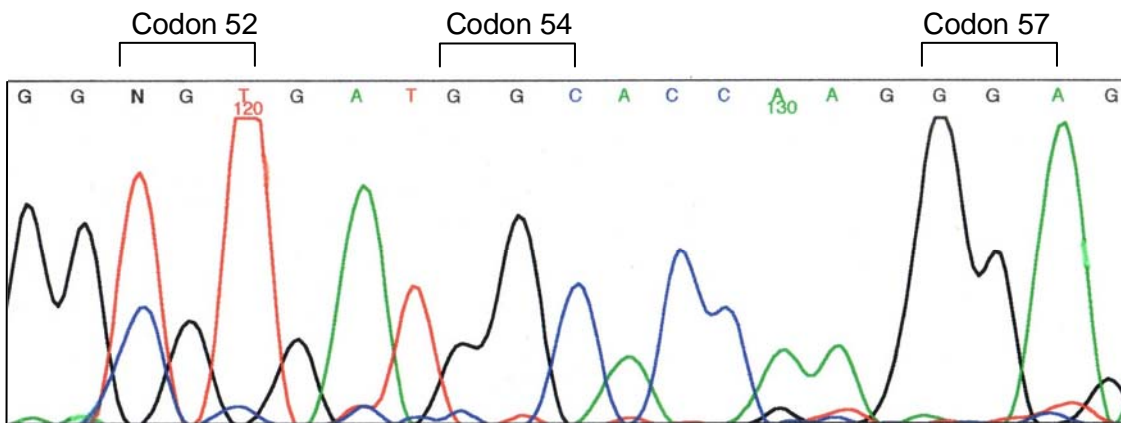
Die untersuchten Mutationen liegen auf Chromosom 10 im Exon 1. Abbildung 15 zeigt den Ausschnitt der Sequenz, der die Codons 52, 54 und 57 umfasst. Die Sequenz ist hier rückwärts (reverse) und komplementär zu lesen. In Codon 52 (Allel D) liegt die Sequenz CGT, und in Codon 54 (Allel B) die Sequenz GGC vor. Codon 57 (Allel C) zeigt die Sequenz GGA. Der Vergleich mit der Originalsequenz (Sastry et al., 1989) zeigt, dass bei dem hier dargestellten DNA-Fragment keine Mutation bezüglich der Allele B oder C oder D feststellbar ist. Der Genotyp der hier dargestellten Probe kann demnach als A/A bezeichnet werden und wird auch als Allel A beschrieben.



**Abb. 15:** Sequenzierung des Genabschnitts von Chromosom 10, Exon 1, der die Codons 52, 54 und 57 enthält. Die Sequenz ist rückwärts (reverse) und komplementär zu lesen. Der dargestellte Abschnitt ist frei von Mutationen.

### 3.5.2 Das Allel D (Codon 52)

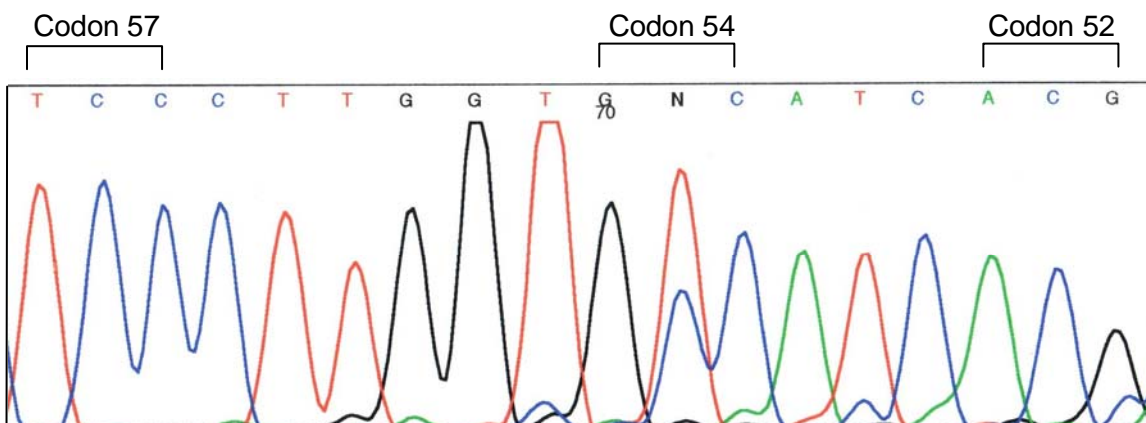
Abbildung 16 zeigt eine Mutation in Codon 52. Diese Mutation entspricht dem Allel D. An Position 180 in der hier dargestellten Zählung (entspricht Position 223 in der originalen Zählung) werden, wie in der Abbildung erkennbar, sowohl die Basen Guanin als auch Adenin angezeigt, wobei Adenin die mutierte Variante darstellt. Da vom Gerät beide Basen registriert werden, wird in der Sequenz N als Buchstabe ausgedruckt. Es handelt sich also um eine heterozygote Probe. Die Änderung der DNA Sequenz durch Punktmutation von CGT zu TGT führt zum Einbau von Cystein anstelle von Arginin während der Translation und zu einer veränderten Sekundärstruktur. Die Codons 54 und 57 zeigen keine Mutation. Folglich wird der Genotyp dieser Probe als A/D bezeichnet.



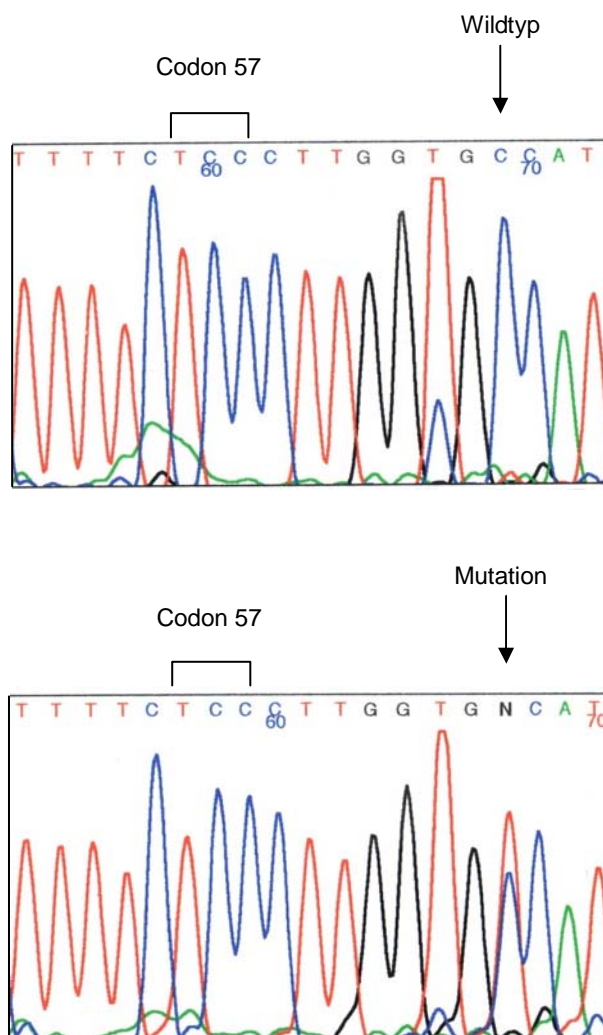
**Abb. 16:** Sequenzierung des Genabschnitts von Chromosom 10, Exon 1, der die Codons 52, 54 und 57 enthält. Die Sequenz ist von links nach rechts zu lesen. Dargestellt ist eine heterozygote Mutation in Codon 52 von CGT zu TGT, entsprechend dem Allel D.

### 3.5.3 Das Allel B (Codon 54)

Abbildung 17 zeigt eine Mutation im Codon 54, die dem Allel B entspricht. In der rückwärts und komplementär zu lesenden Sequenz werden an Position 71 (in der originalen Zählung Position 230) sowohl die Basen Adenin als auch Guanin angezeigt, wobei Adenin die mutierte Variante darstellt. Dieser Basenaustausch führt im Protein zum Einbau von Asparaginsäure anstelle von Glycin und einer dementsprechend veränderten Sekundärstruktur. Die Codons 52 und 57 sind in diesem Beispiel frei von Mutationen.



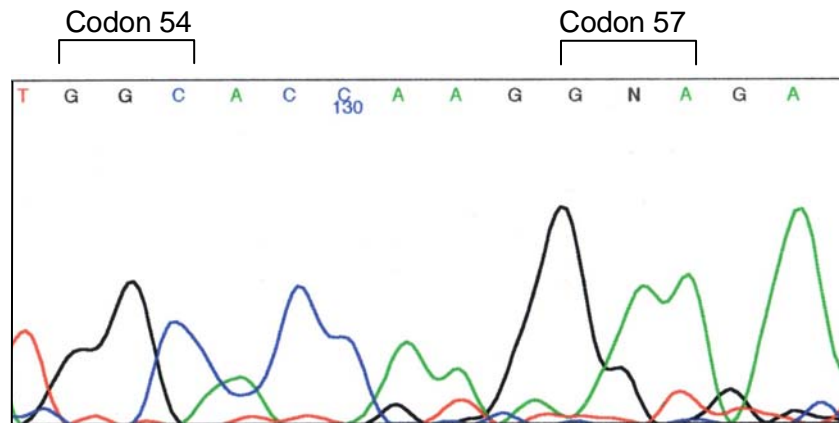
**Abb. 17:** Sequenzabschnitte aus Chromosom 10, Exon 1, der die Codons 52, 54 und 57 enthält. Die Sequenz ist komplementär und von rechts nach links (reverse) zu lesen. Dargestellt ist eine heterozygote Punktmutation in Codon 54 von GGC zu GAC, die dem Allel B entspricht. Die Codons 57 und 52 zeigen den Wildtyp.



**Abb. 18:** Direkter Vergleich eines Sequenzabschnitts mit heterozygoter Mutation und eines Sequenzabschnitts ohne Mutation in Codon 54. Das mitabgebildete Codon 57 zeigt keine Mutation.

### 3.5.4 Das Allel C (Codon 57)

Ebenfalls nachgewiesen werden konnte eine Punktmutation in Codon 57 von GGA zu GAA (Abbildung 19), entsprechend dem Allel C. Dieser Basenaustausch an Position 239 in der Originalzählung führt zum Einbau von Glutaminsäure anstelle von Glycin und einer dementsprechend veränderten Sekundärstruktur.



**Abb. 19:** Sequenzabschnitt aus Chromosom 10, Exon 1, der die Codons 54 und 57 enthält. In Codon 57 liegt eine heterozygote Punktmutation von GGA zu GAA vor.

### 3.6 MBL- und TNF $\alpha$ - Genotypen in der Patientengruppe

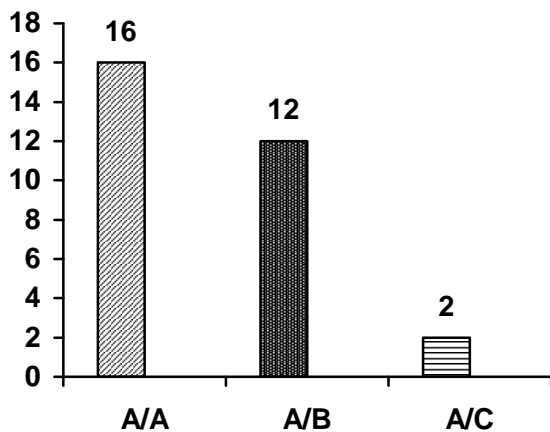
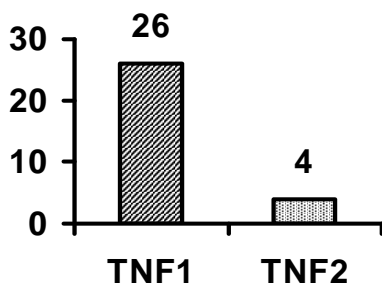
Für das MBL-Gen konnten die Genotypen A/A, A/B, A/C und A/D nachgewiesen werden. Zur Unterscheidungen vom Wildtyp A/A wurden alle mutierten Varianten unter der Bezeichnung A/O zusammengefasst. Im Bezug auf den TNF $\alpha$ - Promotor- Polymorphismus (-308 G/A) konnten die Genotypen TNF1 (-308 G) und TNF2 (-308 A) heterozygot und jeweils homozygot nachgewiesen werden.

Der homozygote Genotyp A/A lag bei 16 Patienten (53%) vor, der heterozygote Genotyp A/O lag bei 14 Patienten (40%) vor. Beim heterozygoten Genotyp handelte es sich zweimal um den Genotyp A/C (7%) und zwölfmal um den Genotyp A/B. 26 Patienten (87%) waren homozygot für den TNF $\alpha$ -Polymorphismus TNF1. Insgesamt vier Patienten (13%) zeigten den Genotyp TNF2, davon zwei in heterozygoter und zwei in homozygoter Ausprägung. In der Kontrollgruppe wurde für 11 Probanden (55%) der Genotyp A/A nachgewiesen. Insgesamt 7 Probanden (35%) zeigten den heterozygoten Genotyp A/B, 2 Probanden wiesen den Genotyp A/C auf (10%). Bei 16 (80%) der Probanden konnte der Genotyp TNF1 nachgewiesen werden, bei 4 Probanden der Genotyp TNF2 (20%). Hinsichtlich der Häufigkeiten der einzelnen Genotypen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppe festgestellt werden. Das D-Allel konnte bei den in die Studie eingeschlossenen Patienten und Probanden nicht nachgewiesen werden.



**Tab. 11:** Häufigkeit der gefundenen Genotypen in der Patienten- und Kontrollgruppe

	A/A	A/B	A/C	TNF1	TNF1/2	TNF2/2
Patientengruppe n=30	16	12	2	26	2	2
Kontrollgruppe n=20	11	7	2	16	4	0

**Abb. 20:** Darstellung der Häufigkeiten der MBL-Genotypen in der Gruppe der Patienten mit RA**Abb. 21:** Darstellung der Häufigkeiten der TNF $\alpha$ -Genotypen in der Gruppe der Patienten mit RA

### 3.7 Klinische und biochemische Daten der Patientengruppe

Bei den in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden neben Daten zu Geschlecht, Alter, Krankheitsbeginn und Krankheitsdauer klinische und biochemische Daten erhoben, die über Schwere, Ausprägung und Verlauf der Erkrankung Auskunft geben (s. Tabellen 12 - 15).

### 3.7.1 Charakteristika der Patientengruppe im Bezug auf die MBL-Genotypisierung

Die Gesamtgruppe der Patienten wurde in 2 Untergruppen aufgeteilt, jeweils eine Gruppe mit und eine Gruppe ohne Mutationen im MBL-Gen. Diese Gruppen wurden miteinander verglichen und die Daten statistisch ausgewertet. Tabelle 12 fasst die klinischen Charakteristika der Patienten in Abhängigkeit von ihrem Genotyp zusammen. Die beiden Gruppen unterscheiden sich signifikant nur in der Krankheitsdauer.

**Tab. 12:** Klinische Daten der untersuchten Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) in Abhängigkeit vom MBL-Genotyp

	Gesamtgruppe n=30 Median (Spannweite)	MBL A/A n=16 Median (Spannweite)	MBL A/0 n=14 Median (Spannweite)	P
Alter ( <i>Jahre</i> )	41.5 (26- 64)	43.0 (26- 59)	41.0 (30- 64)	ns
Geschlecht ( <i>m./ w.</i> )	23/ 7	13/ 3	10/ 4	ns
Alter zu Krankheitsbeginn*	37.5 (21- 62)	39.0 (21- 55)	31.5 (23- 62)	ns
Krankheitsdauer*	4.5 (1- 30)	4.0 (1- 15)	6.5 (1- 30)	<0.05
g. Gelenke <sup>1</sup>	5.5 (0- 21)	4.5 (0- 18)	6.5 (0- 21)	ns
sch. Gelenke <sup>2</sup>	6 (0- 38)	5. (0- 37)	6 (2- 38)	ns
Schmerzindex (%)	50 (25- 100)	50 (25- 75)	100 (25- 100)	ns
FFbH (%)	68.8 (16.8- 100)	75 (36.4- 95.8)	56.2 (16.8- 100)	ns
Morgensteifigkeit ( <i>Minuten</i> )	60 (5- 360)	30 (5- 360)	60 (5- 300)	ns
Ritchie Index	5 (0- 24)	6 (0- 24)	5 (2- 19)	ns
Steinbrocker Grad	3 (1- 4)	2 (1- 4)	3.5 (2- 4)	ns

MBL: Mannosebindungslektin, FfbH: Funktionsfragebogen Hannover, A/A: Wildtype Allele, A/0: mutierte Allele, \*: Jahre, \*\*:Anzahl, <sup>1</sup>: Anzahl der geschwollene Gelenke, <sup>2</sup>: Anzahl der schmerzhaften Gelenke, +: n=24, ns: nicht signifikant

Tabelle 13 fasst die biochemischen Charakteristika der beiden Patientengruppen zusammen.

**Tab. 13:** Biochemischen Daten der untersuchten Patienten mit RA in Abhängigkeit vom MBL-Genotyp

	Gesamtgruppe n=30 Median (Spannweite)	MBL A/A n=16 Median (Spannweite)	MBL A/0 n=14 Median (Spannweite)	P
MBL ( $\mu\text{g/ml}$ )	1258 (47- 4804)	2235 (403- 4804)	852 (47- 2114)	<0.05
TNF- $\alpha$ ( $\text{pg/ml}$ )	86.8 (23.6- 144)	87.5 (29.6- 144)	86.0 (23.6- 135)	ns
RF ( $\text{U/ml}$ )	195 (0- 2240)	163.0 (0- 2240)	209.5 (0- 549)	ns
CRP ( $\text{mg/dl}$ )	1.83 (0- 10)	2.27 (0- 10)	0.93 (0- 3.59)	ns
BSG ( $\text{mm/h}$ )	47.0 (5- 68)	37.5 (11- 59)	52.0 (5- 68)	ns
HA ( $\mu\text{g/ml}$ )	72.4 (16- 1000)	71.3 (16- 1000)	72.4 (21- 398)	ns
Hb ( $\text{g/dl}$ )	11.45 (8- 14.7)	11.45 (9.3- 14.0)	11.9 (8- 14.7)	ns
Erythrozyten ( $\text{Mill./mm}^3$ )	4.55 (3.5- 5.2)	4.6 (3.5- 5.1)	4.7 (3.7- 5.2)	ns
Leukozyten $/\text{mm}^3$	9.15 (6.2- 12.3)	10.25 (6.2- 11.5)	9.15 (7.3- 12.3)	ns
Thrombozyten $/\text{mm}^3$	2.4 (1.6- 4.6)	2.4 (1.6- 3.6)	2.8 (1.6- 4.6)	ns

MBL: Mannosebindungslektin, A/A: Wildtyp Allele, A/0: mutierte Allele, TNF: Tumornekrosefaktor, RF: Rheumafaktor, CRP: C- reaktives Protein, BSG: Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, HA: Hyaluronsäure, Hb: Hämoglobin, ns: nicht signifikant.

Die beiden Gruppen unterscheiden sich signifikant in ihren MBL-Serumkonzentrationen.

### 3.7.2 Charakteristika der Patientengruppe in Abhängigkeit von der TNF $\alpha$ -Genotypisierung

Die Gesamtgruppe der Patienten wurde wiederum in 2 Untergruppen eingeteilt, jeweils eine Gruppe mit und eine Gruppe ohne Mutation an Position -308 im TNF $\alpha$ -Promotor. Diese wurden miteinander verglichen und statistisch ausgewertet. Tabelle 14 zeigt die klinischen Daten, Tabelle 15 zeigt die biochemischen Daten beider Gruppen.

**Tab. 14:** Klinische Daten der untersuchten Patienten mit RA in Abhängigkeit von der Genotypisierung des TNF $\alpha$ -Promotorpolymorphismus

	TNF1 Median (Spannweite) (n= 26)	TNF2 Median (Spannweite) (n= 4)	P
Sex (m./ w.)	19/ 7	4/ 0	
Alter*	43.5 (26- 64)	39.0 (37- 52)	ns
Alter zu	38.8 (21- 62)	36.8 (27- 39)	ns
Krankheitsbeginn*			
Krankheitsdauer*	4.5 (1- 30)	5.8 (1- 15)	ns
g. Gelenke <sup>1</sup>	4 (0- 16)	13.5 (6- 18)	0.017
sch. Gelenke <sup>2</sup>	4 (0- 38)	20 (7- 18)	0.048
Schmerzindex (%)	50 (25 -100)	75 (75)	0.021
FFbH (%)	70.8 (16.8- 100)	56.3 (42- 83.3)	ns
Morgensteifigkeit (Minuten)	30 (5- 300)	240 (120- 360)	0.01
Ritchie Index	4 (0- 22)	13.5 (10- 16)	0.047
Steinbrocker Grade	3 (1- 4)	3 (2- 4)	ns

\*(n=22), \*\*(n=2), MBL: Mannosebindungslektin, TNF: tumor necrosis factor, <sup>1</sup>: Anzahl der geschwollenen Gelenke, <sup>2</sup>:Anzahl der schmerzhaften Gelenke  
FFbH: Funktionsfragebogen Hannover, ns: nicht sigifikant

**Tab. 15:** Biochemische Daten der untersuchten Patienten mit RA in Abhängigkeit von der Genotypisierung des TNF $\alpha$ -Promotorpolymorphismus

	TNF1	TNF2	P
	Median (Spannweite)	Median(Spannweite)	
	(n= 26)	(n= 4)	
MBL ( $\mu\text{g/ml}$ )	1391 (310- 4804)	875 (47- 3465)	ns
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	87.7 (23.6- 144)*	81.2 (76.4- 86) **	
RF U/ml	200 (0- 2240)	240 (37.2- 272)	ns
CRP (mg/dl)	2 (0- 9.9)	1.24 (0.39- 2.4)	ns
BSG (mm/h)	49.5 (5- 68)	39.5 (32- 54)	ns
HA ( $\mu\text{g/ml}$ )	78.0 (16 -1000)	53.0 (38- 86.6)	ns
Hb (g/dl)	11.5 (8- 14.7)	10.4 (9.9- 14.0)	ns
Erythrozyten (Mill./mm <sup>3</sup> )	4.7 (3.3- 5.2)	4.4 (4.15- 4.94)	ns
Leukozyten (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	9.15 (6.2- 16.8)	10.35 (7.8- 10.9)	ns
Thrombozyten (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	2.4 (1.6- 6.5)	3.05 (2.4- 3.4)	ns

HA: Hyaluronsäure, FFbH: Funktionsfragebogen Hannover, Hb: Hämoglobin, BSG: Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, CRP: C-reactive protein, RF: Rheumafaktor, ns: nicht signifikant, \*(n=22), \*\*(n=2)

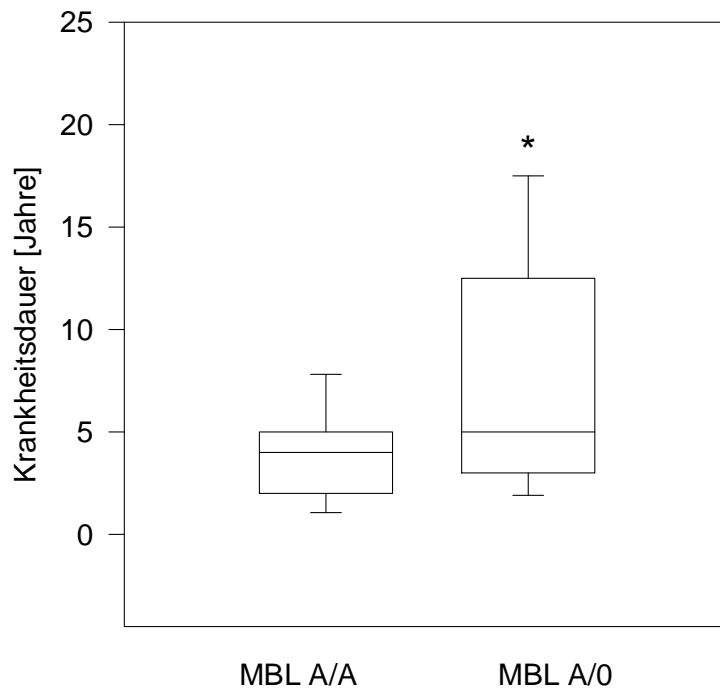
### 3.8 Daten zur medikamentösen Vorbehandlung der Patienten

Daten über die medikamentöse Vorbehandlung vor Studienbeginn konnten von insgesamt 25 Patienten erhoben werden. Ein Patient hatte keinerlei Therapie erhalten, fünf Patienten waren mit Cortison behandelt worden, zwei Patienten hatten eine traditionelle indische phytotherapeutische Behandlung im Rahmen des ayurvedischen Medizinsystems erhalten und 17 Patienten hatten nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAID) eingenommen. Keiner der Patienten hatte „disease modifying antirheumatic drugs“ (DMARD) erhalten. Aufgrund der sozialen und finanziellen Situation der verbleibenden fünf Patienten konnte auch für diese die Einnahme von DMARDs ausgeschlossen werden. Zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses waren insgesamt 15 Patienten seit mindestens sechs Wochen ohne medikamentöse Therapie.

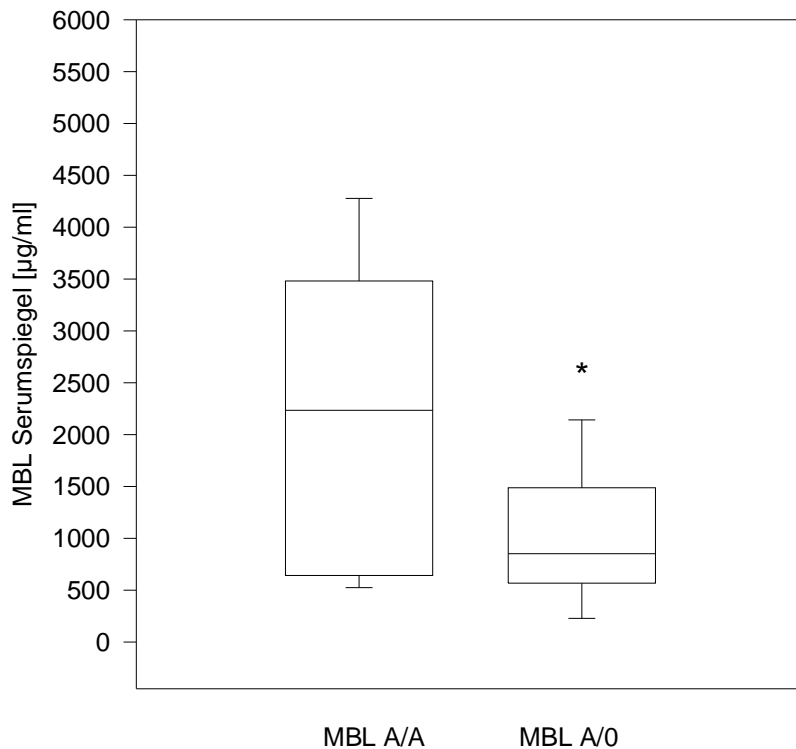
Die anderen 15 Patienten hatten über unterschiedlich lange Zeiträume eine phytotherapeutische Medikation erhalten (1-3 Monate: n= 13; 4 Monate: n= 1; 7 Monate: n= 1). Von diesen 15 Patienten nahmen sechs zusätzlich NSAID ein (Diclofenac 50-200 mg), ein Patient erhielt Phenylbutazon. Um einen Einfluss der phytotherapeutischen Medikation auf die Krankheitsaktivität auszuschließen, wurden die klinischen Daten vor Beginn der phytotherapeutischen Medikation mit den Daten zu Beginn des Studieneinschlusses verglichen. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

### **3.9 Statistische Auswertung**

Im Bezug auf die Mutationen im Bereich des MBL-Gens zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den zwei Unterguppen hinsichtlich der Krankheitsdauer und der Höhe des MBL-Spiegels im Blut. In der A/A-Gruppe betrug die Krankheitsdauer zum Untersuchungszeitpunkt im Median 4,0 Jahre, in der A/O-Gruppe lag sie bei 6,5 Jahren. Der MBL- Serumspiegel lag in der A/A- Gruppe im Median bei 2235 µg/ml mit einer Spannweite von 403- 4804 µg/ml. In der A/O-Gruppe lag der MBL-Serumspiegel signifikant niedriger ( $p < 0.05$ ) und betrug im Median 852µg/ml mit einer Spannweite von 47- 2114µg/ml (s. Tabelle 12 und 13).



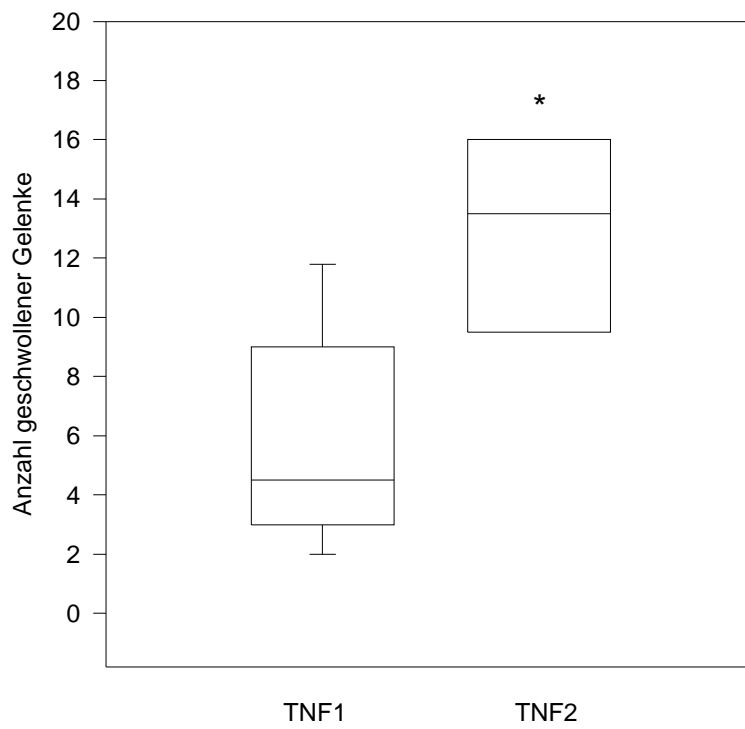
**Abb. 22:** Die Krankheitsdauer war in der MBL A/0-Gruppe signifikant höher als in der MBL A/A-Gruppe (MBL A/A: Median 4,0 Jahre; MBLA/0: Median 6,5 Jahre). Die Boxen umfassen alle Werte innerhalb der 25% und 75% Perzentile. Die Linie in der Mitte der Box stellt den Median dar. Die Verlängerungen geben die 10% und die 90% Perzentile an. \*:  $p < 0.05$ .



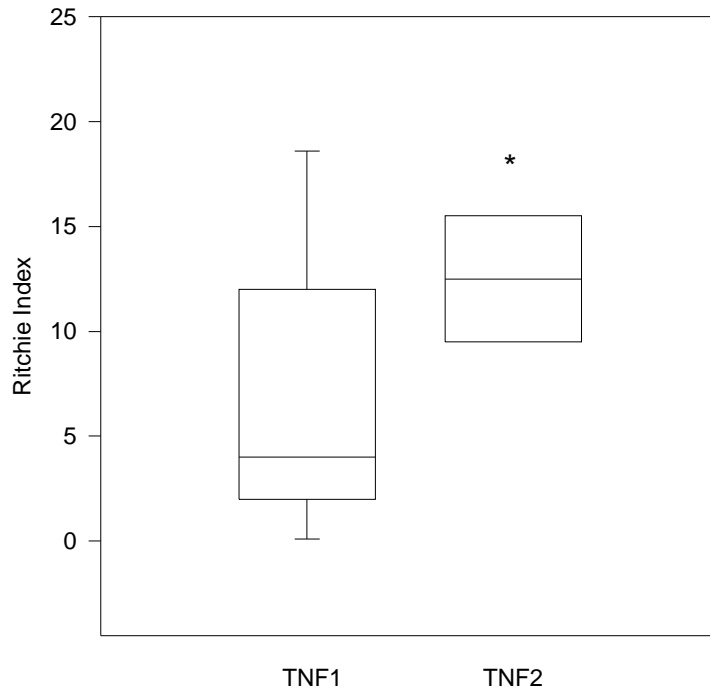
**Abb. 23:** Der MBL- Serumspiegel war in der MBL A/O-Gruppe signifikant niedriger als in der MBL-A/A-Gruppe (MBL A/A: 2235 µg/ml; MBL A/O: Median 852µg/ml). \*: p<0.05.

Hinsichtlich der Mutationen des TNF $\alpha$ -Promotors zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen beiden Untergruppen im Bezug auf die Anzahl geschwollener Gelenke, die Anzahl schmerzhafter Gelenke, den Schmerzindex, die Morgensteifigkeit und den Ritchie-Index. Die Patienten, die den -308 A- Polymorphismus im TNF $\alpha$ - Promotor aufwiesen, hatten deutlich mehr geschwollene und schmerzhaft Gelenke als die Patienten mit dem Genotyp -308 G. Keiner der Patienten mit dem Genotyp -308 A hatte weniger als sechs geschwollene bzw. sieben schmerzhaft Gelenke.



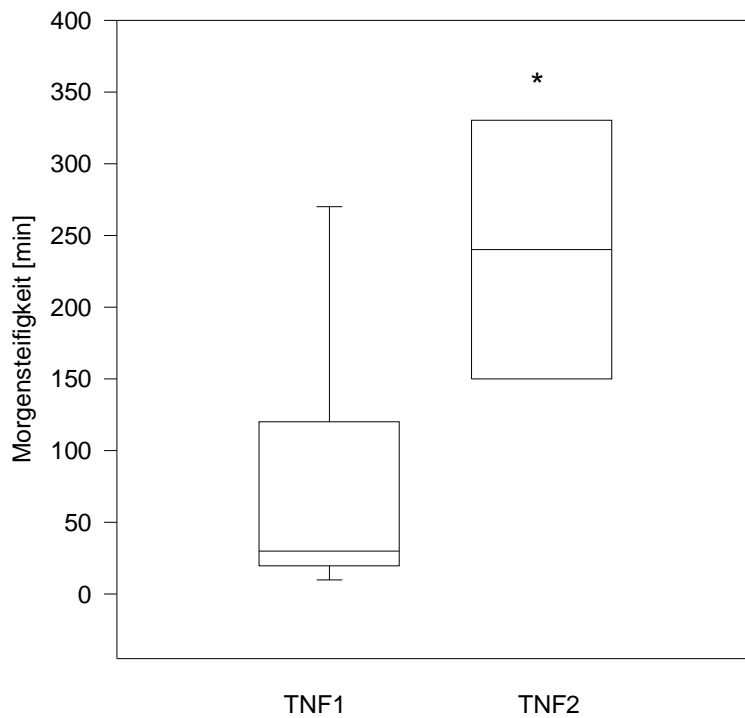


**Abb. 24:** Die Anzahl geschwollener Gelenke war in der TNF2-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zur TNF1-Gruppe. \*:  $p < 0.05$ .



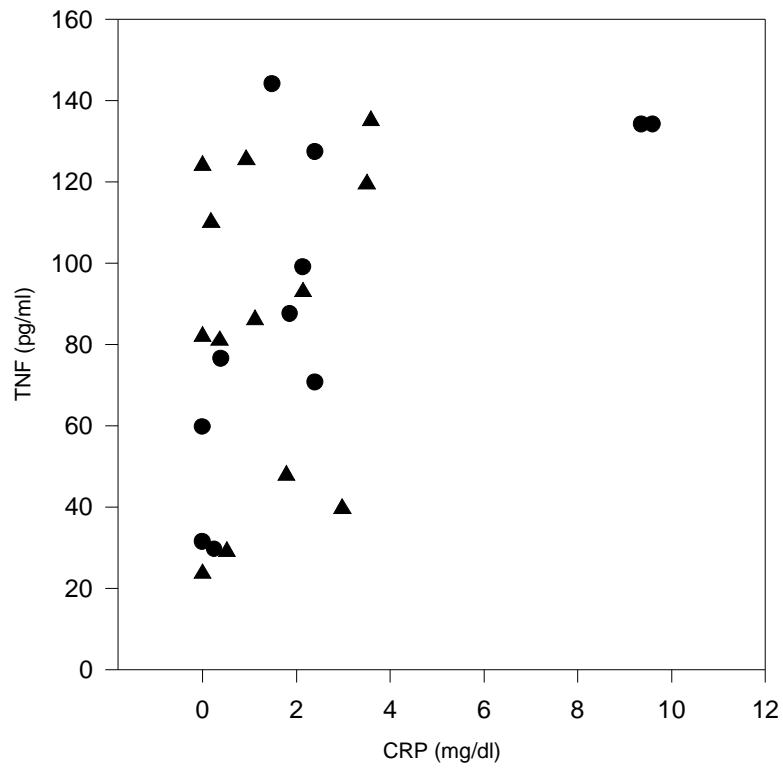
**Abb. 25:** Der Ritchie Index war in der TNF2-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zur TNF1-Gruppe. \*:  $p < 0.05$ .

Der Schmerzindex auf der visuellen Analogskala lag mit im Median 75% bei den TNF2-Patienten signifikant höher als bei den TNF1-Patienten (Median 50%). Dasselbe gilt für den Ritchie-Index (s. Anhang) (TNF1: Median 4, TNF2: Median 13,5). In der Gruppe der Patienten mit der Mutation im  $\text{TNF}\alpha$ -Promotor war die Dauer der Morgensteifigkeit signifikant erhöht, alle in dieser Gruppe erhobenen Werte lagen über 120 Minuten. Im Vergleich dazu lag der Median der TNF1 Gruppe bei 30 Minuten.



**Abb. 26:** In der TNF2-Gruppe lagen signifikant höhere Werte für die Dauer der Morgensteifigkeit in Minuten vor.  
\*:  $p < 0.05$ .

Zusätzlich wurden auch Korrelationsanalysen durchgeführt. Es zeigte sich eine hohe signifikante Korrelation zwischen  $\text{TNF}\alpha$ -Serumspiegel und CRP in der MBL-Wildtyp-Gruppe (MBL A/A) mit einem Korrelationskoeffizienten  $r_s = 0,70$  ( $p = 0,015$ ). Diese Korrelation konnte für die MBL-defiziente Gruppe nicht gezeigt werden ( $r_s = 0,28$ ;  $p = 0,35$ ). Für die Gesamtgruppe ließ sich ein Korrelationskoeffizient von  $r_s = 0,51$  ( $p = 0,01$ ) errechnen.



**Abb. 27:** Assoziation von CRP und TNF $\alpha$  in der Gruppe der Patienten mit RA. ●: MBL A/A ▲: MBL A/O

## 4 Diskussion

---

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss verschiedener MBL- und TNF $\alpha$ -Genotypen auf den Verlauf und die Krankheitsaktivität der rheumatoiden Arthritis zu untersuchen. Gelänge es, genetische Marker zu bestimmen, die schon bei Erkrankungsbeginn auf ein hohes Risiko für einen ungünstigen, d.h. rasch progredienten oder aggressiven Krankheitsverlauf, schließen lassen, könnte eine stärker individualisierte Therapie entwickelt werden. Eine stärkere Individualisierung der Therapie dient dazu, eine maßgeschneiderte medikamentöse Therapie bereit zu stellen, die langfristige Krankheitsfolgen verhindern und gleichzeitig unerwünschte Medikamentenwirkungen vermeiden soll. Bei der rheumatoiden Arthritis ist entscheidend, dass die medikamentöse Therapie früh begonnen wird, schnell wirkt, und gleichzeitig anhaltend erfolgreich ist. Eine frühe Unterdrückung der entzündlichen Aktivität ist bei der rheumatoiden Arthritis besonders wichtig, da in den ersten zwei Jahren nach Diagnosestellung der radiologisch darstellbare Progress der Gelenkdestruktion am stärksten ausgeprägt ist (Fex et al., 1996).

Die entzündliche Reaktion im Gelenk verursacht irreparable Umbauvorgänge, die zu Gelenkdeformierung und Einsteifung führen können. Der damit einhergehende Funktionsverlust führt nicht nur zu einer starken Beeinträchtigung der Lebensqualität, sondern hat auch große sozioökonomischen Auswirkungen, da die Fähigkeit einen Beruf auszuüben eingeschränkt wird und die Bewältigung des Alltags einen hohen personellen und finanziellen Aufwand erfordert (Huscher et al., 2006).

Die hier vorgelegte Studie unterscheidet sich von anderen Studien durch die besondere Zusammensetzung des Patientenkollektivs. Die eingeschlossenen Patienten hatten trotz fortgeschrittener Krankheitsstadien (Steinbrocker Stadien III und IV) keine Therapie mit „disease modifying antirheumatic drugs (DMARD)“ erhalten. Darunter fallen immunsuppressive Substanzen wie Methotrexat, Leflunomid, Sulfasalazin oder Hydroxychloroquin. Diese Medikamente werden in Ländern mit einem hoch entwickelten und für die Allgemeinbevölkerung zugänglichen Gesundheitssystem routinemäßig entsprechend den jeweiligen Empfehlungen der Fachgesellschaften eingesetzt (Schneider et al., 2007), waren jedoch für die im Rahmen dieser Studie untersuchten indischen Patienten nicht verfügbar. Ebenso wenig waren die sogenannten *Biologicals* wie TNF $\alpha$ -Antagonisten (Etanercept, Infliximab,

Adalimumab) oder Interleukin-Antagonisten (Anakinra) zum Einsatz gekommen. Diese besonderen Studienbedingungen ermöglichten die Untersuchung der Zusammenhänge von Krankheitsverlauf, Entzündungsmarkern im Blut, MBL- und TNF $\alpha$ -Serumspiegeln und Genotyp unter Ausschluss der immunmodulatorischen Wirkung der genannten Medikamente.

Auch wenn Patienten- und Kontrollkollektive für einen repräsentativen Häufigkeitsvergleich, der nicht Ziel der Studie war, zu klein war, sollte ein Vergleich der hier festgestellten Häufigkeiten mit den in der Literatur beschriebenen zur Orientierung, durchgeführt werden. Hinsichtlich der Häufigkeiten der einzelnen Polymorphismen, die das MBL-Gen betreffen, zeigte sich in dieser Untersuchung kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten- und der Kontrollgruppe. Am häufigsten lag der Genotyp A/A (Wildtyp) vor (53% bzw. 55%). In einem vergleichsweise hohen Prozentsatz lag der Genotyp A/B vor (33% bzw. 35%), entsprechend dem Allel B. Dieser Prozentsatz ist im Vergleich zu Studien in kaukasischen (Kilpatrick, 2000; Jacobsen et al., 2001), afrikanischen (Garred et al., 1992) oder chinesischen (Kilpatrick, 2000) Bevölkerungsgruppen hoch. Im Rahmen einer Untersuchung zur Relevanz von MBL bei Patienten mit Systemischem Lupus erythematosus in Deutschland wurde allerdings in der Kontrollgruppe das 0-Allel (B,C,D-Allel) in 60 von 120 Personen (50%) nachgewiesen (Momot et al. 2006). Dieser Prozentsatz liegt noch deutlich über den von uns gefundenen zusammengefassten Häufigkeiten für das 0-Allel.

International konnte am seltensten das C-Allel, d.h. der Genotyp A/C nachgewiesen werden (7% in der Patientengruppe und 10% in der Kontrollgruppe). C- und D-Allel sind auch die in Europa am seltensten anzutreffenden Allele. In afrikanischen Studien konnte das C-Allel in einem vergleichsweise hohen Prozentsatz mit bis zu 60% (Lipscombe et al., 1992) festgestellt werden, wohingegen das C-Allel in kaukasischen Bevölkerungsgruppen eher selten nachgewiesen wird, beispielsweise bei 2% der Individuen (Madsen et al., 1994). Das D-Allel scheint weltweit nur sehr selten vorzukommen und konnte beispielsweise mit einer Frequenz von 0.06 in europäischen und 0.02 in afrikanischen Bevölkerungsgruppen nachgewiesen werden. Nicht nachweisbar war es unter anderem bei chinesischen und japanischen Probanden (Kilpatrick 2002).

Ein Vergleich der im Rahmen dieser Studie festgestellten Genotyp-Häufigkeiten mit anderen Studien auf dem indischen Subkontinent ist schwierig, da bisher keine diesbezüglichen Studien mit repräsentativen Fallzahlen durchgeführt wurden. Gupta et al. konnten in einer Fall-Kontroll-

Studie mit an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten das Allel B bei 6% der Patienten und 20% bzw. 18% der Kontrollen nachweisen. In der Patientengruppe war damit - anders als in der vorliegenden Studie - die Häufigkeit des B-Allels signifikant erniedrigt im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Allel C wurde in dieser Studie mit einer Häufigkeit von 3-5% nachgewiesen, das Allel D mit einer Häufigkeit von 4-8%. (Gupta et al., 2005).

Im Vergleich dazu konnten verschiedene Arbeitsgruppen in Nordeuropa auch keine erhöhte Frequenz varianter MBL-Allele bei Patienten mit rheumatoider Arthritis feststellen (Graudal et al. 2000). Diese Ergebnisse wurden durch eine kürzlich veröffentlichte Studie von van de Geijn et al. 2008, in der zwei RA-Kohorten (378 bzw. 261 Patienten) mit einer Kontrollgruppe (n=648) verglichen wurden, bestätigt. Die früheren Studien sowie diese Kohortenstudien kamen zum Schluss, dass die varianten MBL-Gene nicht zu einer rheumatoiden Arthritis prädisponieren (Graudal et al. 2000, van de Geijn 2008). Inwieweit hier die indische Kohorte von Gupta et al. eine landesspezifische Ausnahme bildet, bleibt durch weitere Studien zu belegen.

Die hier vorliegende Studie konnte einen signifikant erniedrigten MBL-Serumspiegel bei den MBL-varianten Genotypen, d.h. den Genotypen A/B oder A/C, nachweisen (s. Abb. 23). In der MBL-varianten Gruppe lag der Serumspiegel im Median bei 852µg/ml, verglichen mit 2235 µg/ml in der A/A-Gruppe. Damit stimmen die Ergebnisse dieser Studie mit einer Vielzahl anderer Studien überein, die ebenfalls eine starke Assoziation zwischen Genotyp und MBL-Serumspiegel zeigen konnten. Für die Genotypen A/B und A/C konnten sowohl in europäischen als auch in afrikanischen und asiatischen Bevölkerungsgruppen signifikant niedrigere MBL-Serumspiegel gezeigt werden (Madsen et al., 1994; Ip et al., 2000, Tsutsumi et al. 2005). Auffällig bleibt die große Spannweite der MBL-Serumspiegel in der Genotyp-A/A-Gruppe, die von 403 bis 4804µg/ml reicht. Auch diese große Spannweite wurde in anderen Studien beschrieben (z.B. Madsen et al., 1994; Lipscombe et al., 1992). Sie lässt vermuten, dass neben weiteren unterschiedlichen Genotypen -beispielsweise den Promotorvarianten H/L und X/Y an Position -550 bzw. -221 (Madsen et al., 1995)- auch andere Mechanismen die MBL-Syntheserate oder den MBL-Abbau beeinflussen. Ytting et al. (2007) konnten in diesem Zusammenhang kürzlich zeigen, dass abgesehen vom Erkrankungsfall, die zirkulierenden MBL-Spiegel in gesunden Individuen über die Zeit stabil bleiben und offenbar auch unabhängig von Alter und Geschlecht sind. Dies deutet darauf hin, dass der Genotyp den maßgeblichen Einfluss auf die

MBL-Grundserumspiegel besitzt, wobei noch nicht alle Haplotypen bisher systematisch untersucht wurden.

Kürzlich wurde im Kontext kardiovaskulärer Erkrankungen gezeigt, dass nicht nur die oben genannten MBL-5'-Haplotypen eine pathogenetische Rolle spielen können, sondern dass die Kombination des MBL2 5' LYQA „Sekretor Haplotyps (CGTCGG)“ mit dem 3' Haplotyp (CGGG) ein potentieller unabhängiger Risikofaktor für postoperative Herzinfarkte bei Kaukasiern darstellt (Collard et al., 2007). Möglicherweise existieren darüber hinaus noch weitere bislang unentdeckte Polymorphismen, die den MBL-Serumspiegel beeinflussen und von pathogenetischer Bedeutung sind. Festzuhalten ist allerdings, dass die Genotypen A/B und A/C, d.h. das B- und C-Allel im Vergleich zu möglicherweise zusätzlich vorliegenden Polymorphismen einen dominanten Effekt auf den MBL-Serumspiegel haben, da sie zu einer deutlichen Senkung des MBL-Spiegels führen.

In der MBL-varianten Gruppe zeigte sich eine im Median deutlich längere Krankheitsdauer. Sie betrug 6,5 Jahre im Vergleich zu 4 Jahren in der A/A-Gruppe und bestätigt damit Studien von Garred et al., 2000, der in einer Querschnittsstudie mit 189 Patienten einen früheren Beginn der rheumatoiden Arthritis zeigte. Insgesamt wird der Einfluss der MBL-Serumspiegel und der MBL-Promotorpolymorphismen auf den Krankheitsverlauf der rheumatoiden Arthritis jedoch immer noch kontrovers diskutiert. Die MBL-Defizienz konnte bei den Patienten mit rheumatoider Arthritis neben einem früheren Krankheitsbeginn (Garred et al., 2000) auch mit einer höheren Krankheitsaktivität (Jacobsen et al., 2001), stärkeren Gelenkerosionen (Jacobsen et al., 2001, Saevasdottir et al., 2001, Garred et al., 2000) und einem schlechten therapeutischen Ansprechen in Verbindung gebracht werden (Saevasdottir et al., 2001). Gleichzeitig wurden erhöhte MBL-Spiegel mit einer hohen Krankheitsaktivität in Verbindung gebracht, allerdings nur bei Patienten mit spätem Krankheitsbeginn und in fortgeschrittenen Krankheitsstadien. Es wurde vermutet, dass hier MBL über die zusätzliche Komplementaktivierung die Entzündungsaktivität verstärkt (Garred et al., 2000).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie (van de Geijn et al., 2008), die den Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Erkrankung RA und dem Vorhandensein varianter MBL-Allele an zwei Patientenkohorten (n=378 und n=261) und einer Kontrollgruppe (n=648) untersuchte,



konnte kein diesbezüglicher Zusammenhang festgestellt werden. Auch die Untersuchung von Subgruppen aufgeteilt nach niedrigen, mittleren und hohen MBL-Spiegeln ließ keinen Einfluss von MBL auf die Krankheitsaktivität erkennen, so dass van de Geijn et al. (2008) zum Schluss kam, dass in diesen großen Patientengruppen MBL allein nicht mit dem Schweregrad der Erkrankung assoziiert ist. Dies weist klar darauf hin, dass MBL kein unabhängiger Risikofaktor für den Schweregrad der rheumatoiden Arthritis ist. Andererseits handelt es sich bei den von van de Geijn et al. (2008) untersuchten Patienten um solche unter Therapie. Der Einfluss der Therapie mit DMARDs auf das Krankheitsgeschehen ist daher trotz eines vergleichsweise großen Patientenkollektives nicht auszuschließen. So kommen van de Geijn et al. (2008) auch zum Schluss, dass noch weitere Studien notwendig sind. Für unsere Daten können wir einen Einfluss der DMARDs auf den Krankheitsverlauf ausschließen. Gleichzeitig befand sich unser Patientenkollektiv in der Mehrheit in fortgeschrittenen Krankheitsstadien. Diese Kombination von fortgeschrittenem Krankheitsstadium und fehlender DMARDs-Therapie könnte dazu geführt haben, dass wir einen Zusammenhang zwischen den varianten MBL-Allelen und der Krankheitsdauer nachweisen konnten.

Eine ähnlich widersprüchliche Datenlage zeigt sich bei einer weiteren Autoimmunerkrankung, dem systemischen Lupus erythematosus (SLE). In zwei Fall-Kontroll Studien konnte trotz einem Trend keine signifikante Assoziation zwischen dem MBL-Genotyp und der Erkrankung festgestellt werden (Lee et al., 2005). Wurden die Daten jedoch in eine Meta-Analyse von 15 Studien zur Assoziation von MBL und SLE integriert, zeigte sich dass das B-Allel sowie die Promotorpolymorphismen -550L und -221X Risikofaktoren für diese Erkrankung darstellen. Gleichzeitig zeigte eine Stratifizierung nach ethnischen Gruppen eine signifikant erhöhte *Odds ratio* für die Assoziation des B-Allels mit SLE in den afrikanischen, asiatischen und kaukasischen Kohorten. Derartige Metaanalysen liegen für die Rolle der varianten MBL-Allele in der RA noch nicht vor. Ein Zusammenhang zwischen dem MBL-Genotyp und SLE lässt sich allerdings auch auf der Grundlage des bisher bekannten Pathomechanismus von SLE zwanglos erklären. In SLE steht die mangelnde Entfernung von Immunkomplexen und von apoptotischem Zellmaterial im Vordergrund (Montecielo et al., 2007). Es konnte schon früh gezeigt werden, dass genetisch bedingtes Fehlen an Komplementfaktoren - speziell des klassischen Komplementweges (C1q, C1r, C1s, C2 und C4) - stark mit SLE assoziiert ist (Walport, 1993). Dass MBL als Schlüsselmolekül des erst in den 90ziger Jahren entdeckten Lektinweges der

Komplementaktivierung hierüber auch zum Krankheitsprozess von SLE beitragen kann, ist gut vorstellbar. Die rheumatoide Arthritis ist wie SLE eine multifaktorielle Autoimmunerkrankung, wobei die Rolle und Wichtigkeit der drei Wege der Komplementaktivierung bei beiden Erkrankungen unterschiedlich ist und sich eine isolierte Rolle von MBL als maßgeblichem Risikofaktor für die rheumatoide Arthritis weder aus der derzeitigen Datenlage noch aus den bisher bekannten Pathophysiologie ableiten lässt. Unsere Ergebnisse gehen konform mit den Aussagen, dass der MBL-Genotyp nicht allein sondern in Verbindung mit anderen Faktoren (genetischen und/ oder Umweltfaktoren) eine modulierende Rolle auf das Krankheitsgeschehen der rheumatoiden Arthritis ausübt. Eine kürzlich veröffentlichte Studie belegt einen Zusammenhang zwischen erhöhten MBL-Serumspiegeln in Kombination mit agalaktosiertem IgG und dem erhöhten Auftreten koronarer Herzerkrankungen und Myokardinfarkten bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (Troelsen et al., 2007). Die Autoren kommen zum Schluss, dass MBL zur frühen Mortalität der -Patienten beiträgt. Gleichzeitig konnten Walsh et al. (2005) sowie Hart et al. (2005) in Mausmodellen zeigen, dass der MBL-Komplementweg ein unabhängiger Schlüsselregulator für ischämische Reperfusionsschäden am Herzen bzw. am Gastrointestinaltrakt ist. Die Abwesenheit von MBL wirkte sich in beiden Mausmodellen protektiv auf die durch die Reperfusion verursachten Verletzungen aus. (Walsh et al., 2005 ; Hart et al., 2005). Keller et al. zeigten kürzlich (2006) in einer Fall-Kontroll Studie bei 946 Patienten und 1799 gesunden Probanden, dass erhöhte MBL-Serumkonzentrationen mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für die KHK bei Männern verbunden waren. Diese Daten unterstützen die Annahme, dass der MBL-Lektinweg nicht nur bei Autoimmunerkrankungen sondern allgemein einen grundlegenden Einfluss auf Entzündungsprozesse besitzt.

Die oft widersprüchlichen Studienergebnisse legen allerdings den Schluss nahe, dass zu varianten MBL-Allelen noch andere Faktoren hinzukommen müssen, um das Krankheitsgeschehen maßgeblich zu beeinflussen. Insofern wurde in unserer Studie ein weiterer für die RA relevanter Polymorphismus untersucht, der TNF $\alpha$ -Promotor-Polymorphismus -308.

Hinsichtlich der Häufigkeiten der zwei hier untersuchten TNF $\alpha$ -Promotor-Varianten stimmen unsere Ergebnisse mit denen anderer Studien überein. Der TNF1-Genotyp ohne Basenaustauschmutation an Position -308 lag in 80-87% der Fälle vor, der TNF2-Genotyp mit Basenaustauschmutation von Guanin zu Adenin in 13-20%. Ähnliche Häufigkeiten zeigten

beispielsweise Schlüter et al., 2002 (TNF1: 84%, TNF2: 16%) oder Cuenca et al., 2002 (TNF1: 77-90%, TNF2: 10-23%). Von Das et al. (2006) wurden im Rahmen einer Studie zur Assoziation von Typ I-Diabetes mellitus und TNF $\alpha$  ähnliche Häufigkeiten für den indischen Subkontinent ermittelt (TNF1: 61.5-85.7%; TNF2: 0-35%). Studien mit repräsentativen Fallzahlen liegen wie auch im Bezug auf die MBL-Polymorphismen für den indischen Subkontinent nicht vor. In der vorliegenden Studie bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe hinsichtlich der Häufigkeiten der Genotypen TNF1 und TNF2, was eine prädisponierende Funktion für die Entstehung einer rheumatoiden Arthritis durch einen dieser Genotypen unwahrscheinlich macht. Auch dieses Ergebnis stimmt mit einer Vielzahl anderer Studien überein (Wilson et al., 1995; Brinkman et al., 1997). Cuenca et al. (2002) und Danis et al. (1994) zeigten allerdings eine 2 bis 3 fach erhöhte Rate des Genotyps TNF2 bei Patienten mit rheumatoider Arthritis für eine chilenische bzw. australische Bevölkerungsgruppe. Diese Ergebnisse legen eine pathogenetische Bedeutung des Genotyps TNF2 nahe (Cuenca et al., 2002; Danis et al., 1994). Eine kürzlich veröffentlichte Untersuchung von Rezaieyazdi et al. (2007) an 34 Patienten mit RA und 30 Gesunden aus dem Iran fand eine gleiche Verteilung der beiden TNF $\alpha$  Promotor-Polymorphismen in Patienten und Gesunden. Gleichzeitig konnten sie jedoch einen Zusammenhang zwischen den TNF $\alpha$ -308 Promotor-Polymorphismen und radiologisch nachweisbaren Gelenkerosionen der Hände zeigen. Diese Ergebnisse lassen sich durch unsere Daten erklären. Hinsichtlich der Mutationen des TNF $\alpha$ -Promotors zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Untergruppen TNF1 und TNF2 im Bezug auf die Anzahl geschwollener Gelenke, die Anzahl schmerzhafter Gelenke, den Schmerzindex, die Morgensteifigkeit und den Ritchie-Index. Das bedeutet, dass im Rahmen dieser Studie die Genotypen TNF2/2 bzw. TNF1/2, d.h. die Genotypen mit einer homozygoten oder heterozygoten Basenaustauschmutation von Guanin zu Adenin an Position -308 mit einer deutlich erhöhten Krankheitsaktivität einhergehen. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine schwedische Studie von Cvetkovic et al. (2002), die ein jüngeres Alter bei Krankheitsbeginn und einen schwereren Krankheitsverlauf gemessen anhand des „accumulated disease activity score“ bei Patienten, die an rheumatoider Arthritis erkrankt waren und die Genotypen TNF1/2 oder TNF2/2 aufwiesen, dokumentieren konnte. Wilson et al. (1995) zeigten einen Trend zu einer höheren Anzahl von Erosionen bei Probanden mit dem Genotyp TNF1/2. Vinasco et al. (1997) zeigten ebenfalls einen signifikanten Unterschied im Krankheitsverlauf, der sich in einer signifikant erhöhten Rate im Vorhandensein von Rheumaknoten („nodular disease“) besonders beim Genotyp TNF2/2 äußerte,

die allerdings ebenfalls beim Genotyp TNF1/1 im Vergleich zum heterozygoten Genotyp TNF1/2 leicht erhöht war.

Demgegenüber stehen u.a. Studien von Pawlik et al. und Brinkman et al., die keinen Zusammenhang zwischen verschiedenen TNF $\alpha$ -Genotypen an Position -308 und dem Krankheitsverlauf nachweisen konnten (Pawlik et al., 2005; Brinkman et al., 1997). Bei Brinkman et al. zeigten sich allerdings Hinweise für ein „linkage disequilibrium“ eines anderen TNF $\alpha$ -Promotor-Polymorphismus an Position -238 (-238 G), der mit einem ungünstigeren Krankheitsverlauf einherzugehen scheint, mit dem Genotyp – 308 A, d.h. TNF 2. Interessanterweise zeigte ein Patient, der sowohl einen MBL-varianten Genotyp als auch den Genotyp TNF2 aufwies, einen deutlich schlechteren Krankheitsverlauf sowie eine lange Krankheitsdauer. Zu bedenken bleibt jedoch, dass der hier festgestellte Zusammenhang von TNF $\alpha$ -Genotyp und Krankheitsverlauf durch weitere Polymorphismen beeinflusst sein könnte, die mit dem TNF $\alpha$ -Genotyp in einem „linkage disequilibrium“ stehen. Beispielsweise ist der TNF2-Genotyp mit dem HLA-A1-B8-DR3-DQ2-Haplotyp assoziiert, der wiederum mit Autoimmunerkrankungen und einer hohen TNF $\alpha$ -Produktion assoziiert ist (Verweij, 1999). Bezüglich des absoluten TNF $\alpha$ -Serumspiegels zeigte sich in unserer Studie kein signifikanter Unterschied zwischen der TNF1 und der TNF2 Gruppe.

Im Rahmen der Korrelationsanalysen fiel ein deutlicher Unterschied zwischen beiden MBL-Gruppen auf. Während in der MBL-Wildtyp-Gruppe der Korrelationskoeffizient im Bezug auf den CRP- und den TNF $\alpha$ -Serumspiegel signifikant war, konnte für die MBL-variante Gruppe keine signifikante Korrelation zwischen CRP- und TNF $\alpha$ -Serumspiegel nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine modulatorische Wirkung von MBL auf die TNF $\alpha$ -Ausschüttung im Rahmen der entzündlichen Reaktion bei der rheumatoiden Arthritis hin. In vitro konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Bindung von MBL an Makrophagen im Gegensatz zur Bindung von C1q nicht zur TNF $\alpha$ -Ausschüttung führt (Bajtay et al., 2000). Das weist darauf hin, dass die MBL-vermittelte Komplementaktivierung bzw. Entzündungskaskade unabhängig oder zumindest weniger abhängig von TNF $\alpha$  ist. In diesem Fall würde die entzündliche Reaktion bei MBL-defizienten Personen in weitaus stärkerem Maße auf andere, beispielsweise TNF $\alpha$ -abhängige Wege ausweichen. Daraus würde im Endeffekt eine höhere TNF $\alpha$ -Ausschüttung bei MBL-

defizienten Patienten resultieren, was einem lokalen Ungleichgewicht von  $\text{TNF}\alpha$  entspricht. Entscheidend wäre dann nicht der im Serum messbare  $\text{TNF}\alpha$ -Spiegel sondern der lokal - beispielsweise im Gelenk- wirksame Spiegel. MBL-Defizienz könnte insgesamt zu einem Zustand führen, der eine proinflammatorische Ausrichtung des Immunsystems begünstigt, aus der ein höheres Risiko für einen frühen Krankheitsbeginn und damit auch eine längere Krankheitsdauer resultiert. Studien, die zeigen, dass MBL-Defizienz mit einem erosiveren Krankheitsverlauf einhergeht, sind mit einem zumindest lokalen  $\text{TNF}\alpha$ -Überschuss gut vereinbar (Jacobson et al., 2001; Saevarsdottir et al., 2001). Sicherlich spielt auch die immunologische Vorgeschichte durch frühere Infektionen und entsprechende Immunantworten eine Rolle. Eine Reihe von kürzlich durchgeführten experimentellen Studien zum Zusammenhang von MBL und Infektionsgeschehen unterstützen unsere Hypothese einer Modulation der  $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung durch MBL.

Nadesalingam et al. (2005) konnten zeigen, dass die Peptidoglykan-induzierte Bildung proinflammatorischer Zytokine durch MBL inhibiert wird, während die Bildung von Chemokinen durch Makrophagen verstärkt wird. Sie schlossen daraus, dass MBL die Makrophagen vermittelte Entzündung herunterreguliert und gleichzeitig die Phagozytenbereitstellung fördert. Die Anwesenheit von MBL reduziert die Freisetzung von  $\text{TNF}\alpha$  und erhöht die Freisetzung von IL-8 und RANTES (Nadesalingam et al., 2005).

Auch Ergebnisse von Studien an Knock-out Mäusen schlagen vor, dass MBL zur Herunterregulierung von  $\text{TNF}\alpha$  im Blut notwendig ist und hierüber einen septischen Schock verhindern kann (Shi et al., 2004). Weiterhin konnte in verschiedenen Zellkulturinfektionsmodellen und Mausmodellen gezeigt werden, dass die Bindung von MBL an Mikroben (1,3  $\beta$ -Glukane) die Bildung von  $\text{TNF}\alpha$  unterdrückt (Koneti et al. 2008). Diese Daten weisen darauf hin, dass MBL als Molekül des unspezifischen Immunsystems eine modulierende Funktion im Sinne einer Herunterregulierung auf die  $\text{TNF}\alpha$ -Bildung ausübt und dass diese bei genetisch bedingter MBL-Defizienz verloren geht.

Den zentralen Einfluss des  $\text{TNF}\alpha$ -Promotor Polymorphismus -308 und damit  $\text{TNF}\alpha$  auf den Krankheitsverlauf der RA belegen kürzlich veröffentlichte Studien, die zeigen dass die  $\text{TNF}\alpha$ -

Promotorvarianten TNF1 und TNF2 relevante Faktoren für den Therapieerfolg sind. Seitz et al. (2007) konnte zeigen, dass Patienten mit rheumatoider Arthritis (n=54), Psoriasis-Arthritis (n=10) und ankylosierender Spondylitis (n=22) und dem Genotyp TNF $\alpha$ -308 G/G (TNF 1) besser auf eine anti-TNF $\alpha$ -Therapie ansprechen also solche mit dem Genotyp A/A (TNF 2) oder A/G (TNF1/2). Dies unterstützt Untersuchungen von Mugnier et al. (2003), die bei Patienten mit RA ein besseres Ansprechen auf die Infliximab-Therapie dokumentieren konnten, wenn sie Träger des TNF1-Allels waren. Gleichzeitig wurde postuliert, dass die medikamentöse Vorbehandlung mit MTX einen Einfluss auf das therapeutische Ansprechen hat. Intensive MTX-Therapie dürfte den Grundspiegel proinflammatorischer Zytokine so beeinflussen, dass die Patienten damit besonders sensibel für eine anti-TNF $\alpha$ -Therapie bzw. eine Neutralisierung von TNF $\alpha$  werden (Seitz et al. 2006). In unserer Patientengruppe können Einflüsse von DMARDS auf die Zytokinspiegel vor und während der Therapie ausgeschlossen werden. Die klinischen Daten zeigen damit den Zusammenhang zwischen Geno- und Phänotyp der Erkrankung ohne den Einfluss einer DMARD-Therapie, was den besonderen Wert der Daten unterstreicht.

## 5 Zusammenfassung

---

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine systemische chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung, die vor allem durch entzündliche Gelenkveränderungen gekennzeichnet ist. Eine multifaktorielle Ätiologie gilt als gesichert. Die varianten Allele des Mannosebindungslektins (MBL) und der TNF $\alpha$ -Promotor-Polymorphismus (-308) wurden mit der Ätiologie und der Pathogenese der RA in Verbindung gebracht. Das MBL-Molekül ist gemeinsam mit den MBL-assoziierten Serinproteinasen (MASP) das zentrale Molekül des „Lektinwegs“ der Komplementaktivierung. Niedrige MBL-Serumkonzentrationen können im Kindesalter zu einer verminderten Infektabwehr führen, werden aber auch mit Autoimmun- und kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht. Maßgebliche Ursache geringer MBL-Serumkonzentrationen sind die varianten Allele im Exon 1 (Codon 52, 54, 57) des MBL-Gens. Eine zentrale Rolle der TNF $\alpha$ -Spiegel bei der RA ist durch die Wirksamkeit der Therapie mit TNF $\alpha$ -Antagonisten belegt. Das Ansprechen auf diese Therapie variiert jedoch, als Ursache wird der unterschiedliche genetische Hintergrund vermutet. Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss der varianten Allele des MBL auf Exon 1 und der Promotor-Polymorphismen des TNF $\alpha$ -Gens (-308 G/A, TNF1/2) auf den Verlauf und die Krankheitsaktivität der RA zu untersuchen. Hierzu wurde ein Patientenkollektiv untersucht, das zuvor nicht mit *disease modifying antirheumatic drugs* (DMARDs) oder anti-TNF $\alpha$ -Antagonisten vorbehandelt worden war. Die Genvarianten der beiden Moleküle wurden in 50 indischen Probanden (30 Patienten mit RA und 20 gesunden Probanden) bestimmt. Als Parameter für die Krankheitsaktivität wurden die Steinbrocker-Klassen, die Anzahl der geschwollenen und druckschmerzhaften Gelenke (n=60), der Schmerzindex (visuelle Analogskala), der Ritchie Index (RI), die Morgensteifigkeit (MST), der Funktionsstatus (FFbH) sowie die Blutsenkung, das C-reaktive Protein, der Rheumafaktor, die Hyaluronsäure-Serumkonzentrationen (ELISA) und das Blutbild erfasst. Gleichzeitig wurden auch die MBL-Serumkonzentrationen (ELISA) sowie die TNF $\alpha$ -Serumkonzentrationen jeweils mittels ELISA bestimmt. Für die Genotypisierung wurde die DNA der Probanden aus dem Vollblut isoliert. Mittels Polymerasekettenreaktionen (PCR) und Restriktionsfragmentanalysen (RFLP) wurden die jeweiligen Genotypen bestimmt und mittels Sequenzierung überprüft. Von den 20 gesunden Probanden trugen 11 (55 %) die Wildtyp-Allele A/A. Sieben Probanden (35%) waren heterozygot für das B-Allel (A/B) und zwei Probanden (10%) waren Träger des C-Allels

(A/C). 16 der Patienten (53%) trugen die Wildtyp-Allele (A/A), 12 (40%) die B-Allele (A/B) und zwei Patienten besaßen A/C-Allele. Das D-Allel wurde in beiden Gruppen nicht nachgewiesen. Zusammengenommen trugen 45% der Gesunden und 47% der Patienten ein B- oder C-Allel. Es bestand damit, vergleichbar mit Daten aus Großstudien, kein Unterschied bei beiden Gruppen hinsichtlich der Verteilung der Genotypen. Dies galt auch für den TNF1/2-Promotor-Polymorphismus. Hier waren 4 gesunde Probanden (20%) heterozygot für das TNF2-Allel und 16 Probanden (80%) homozygot für das TNF1-Allel. In der Patientengruppe waren zwei Patienten heterozygot für das TNF2-Allel, zwei waren homozygot für das TNF2-Allel und 26 (87%) waren homozygot für die TNF1-Allele. Die Mehrzahl der Patienten befand sich in einem fortgeschrittenen chronischen Krankheitsstadium mit mittlerer Krankheitsaktivität, ersichtlich u.a. an der Anzahl der Patienten mit dauerhaften Deformierungen (n=10), der Krankheitsdauer (Median=4.5 Jahre), den Steinbroker Klassen (Median=3) und den Funktionsindices. Die Gruppe der Patienten mit MBL-Wildtyp-Allelen unterschied sich signifikant von der Gruppe mit den varianten Allelen in der MBL-Serumkonzentrationen (2235 µg/ml vs 852 µg/ml,  $p < 0.05$ ) und in der Erkrankungsdauer (4.0 Jahre vs. 6.5 Jahre,  $p < 0.05$ ). Auch die Korrelationskoeffizienten zwischen CRP und TNF $\alpha$  waren verschieden. In der Gruppe der Patienten mit Wildtyp-Allelen war der Korrelationskoeffizient hoch ( $r_s = 0.70$ ,  $p = 0.015$ ), während in der Patientengruppe mit varianten Allelen keine Korrelation ( $r_s = 0.28$ ,  $p = 0.35$ ) gefunden wurde. Die TNF $\alpha$ -Serumkonzentrationen waren in beiden Gruppen vergleichbar. Beim Vergleich der Patienten mit TNF1 und TNF2-Allelen wiesen diejenigen mit heterozygotem TNF2-Allel eine höhere Anzahl geschwollener ( $p < 0.02$ ) und druckschmerzhafter Gelenke ( $p < 0.05$ ), einen höheren Schmerzindex ( $p < 0.02$ ), einen höheren RI ( $p < 0.05$ ) und eine längere Dauer der Morgensteifigkeit ( $p < 0.01$ ) auf. Berichte über eine Assoziation des TNF2-Allels mit der Krankheitsaktivität der RA variieren. Unsere Daten unterstützen das Vorhandensein einer Assoziation. Jüngste Studien schlagen den TNF1/2-Polymorphismus als Marker für die Therapieansprechbarkeit auf TNF $\alpha$ -Antagonisten vor. Die untersuchten MBL- und TNF $\alpha$ -Allele waren in dieser nicht mit DMARDs und Biologica vorbehandelten Patientengruppe mit verschiedenen klinischen Aspekten der RA assoziiert. Ihre Bestimmung kann zum Aufbau eines genetischen Biomarkerpools zur Identifizierung von RA-Untergruppen mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf und Therapieansprechen beitragen. Weiterhin sind die Daten eine erste klinische Evidenz, dass MBL in die Modulation der TNF- $\alpha$ -Konzentrationen während des Entzündungsprozesses eingreift.



## 6 Tabellenverzeichnis

---

Tab. 1: Kriterien zur Diagnose der rheumatoiden Arthritis (nach Arnett et al., 1988; deutsche Übersetzung nach Hettenkofer, 2001).....	7
Tab. 2: In den verschiedenen Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) eingesetzte Primer.....	29
Tab. 3: Primer für die Mutagenically seperated-PCR (MS-PCR), nach Schlüter et al., 2002. ....	38
Tab. 4: Reaktionsansatz für MBL Exon 1: A-Allel, B-Allel und C-Allel.....	39
Tab. 5: Reaktionsansatz für MBL Exon 1, D-Allel: SDM-PCR .....	40
Tab. 6: Reaktionsansatz für den TNF $\alpha$ -Promotor-Polymorphismus (-308 G/A): MS-PCR.....	40
Tab. 7: Ansatz zur Herstellung der Agarosegele .....	42
Tab. 8: Ansatz zur Herstellung der Nusieve Agarose Gele.....	42
Tab. 9: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau des A-,B-, und C-Allels .....	44
Tab. 10: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau des D-Allels.....	44
Tab. 11: Häufigkeit der gefundenen Genotypen in der Patienten- und Kontrollgruppe.....	57
Tab. 12: Klinische Daten der untersuchten Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) in Abhängigkeit vom MBL-Genotyp .....	58
Tab. 13: Biochemischen Daten der untersuchten Patienten mit RA in Abhängigkeit vom MBL-Genotyp.....	59
Tab. 14: Klinische Daten der untersuchten Patienten mit RA in Abhängigkeit von der Genotypisierung des TNF $\alpha$ -Promotorpolymorphismus .....	60
Tab. 15: Biochemische Daten der untersuchten Patienten mit RA in Abhängigkeit von der Genotypisierung des TNF $\alpha$ -Promotorpolymorphismus .....	61

## 7 Abbildungsverzeichnis

---

Abb. 1: Charakteristisches Bild der Folgezustände einer rheumatoiden Arthritis der Finger- und Handgelenke. Die Abbildung zeigt den typischen Befall der MCP-Gelenke und die Ulnardeviation. (Ulrich-Merzenich, 1998). ....	9
Abb. 2: Die Abbildung zeigt die Schwanenhalsdeformität der Fingergelenke (Ulrich-Merzenich, 1998). ....	9
Abb. 3: Charakteristisches Bild der Folgezustände einer rheumatoiden Arthritis der Zehengelenke mit Ausbildung eines Hallux valgus.....	9
Abb. 4: Molekülstruktur eines MBL-Trimer; nach Ezekowitz et al., 2003 .....	17
Abb. 5: Genstruktur des Mannosebindungslektins nach Kilpatrick, 2002.....	18
Abb. 6: Ablaufschema der SDM-PCR in Anlehnung an Madsen et al., 1994. ....	37
Abb. 7: Primer-Design zur Genotypisierung des TNF $\alpha$ -Polymorphismus (-308 G/A) mittels MS-PCR.....	38
Abb. 8: Gelelektrophorese zur Darstellung der Produkte der PCR des A-, B- und C-Allels.....	48
Abb. 9: Gelelektrophorese zur Darstellung der PCR und des Restriktionsverdau zur Genotypisierung des D-Allels. Die PCR erfolgte als SDM-PCR (s.2.3.3). HhaI spaltet das 125bp-PCR-Produkt in ein 100bp- und ein 25bp-Fragment sofern ein A-, B- oder C-Allel vorliegt. MluII spaltet das PCR-Produkt in ein 100bp- und ein 25bp-Fragment, wenn das D-Allel vorliegt. Hier liegt bei keiner Probe ein D-Allel vor. ....	49

- Abb. 10: Mutagenically seperated-PCR (MS-PCR) zur Genotypisierung des TNF $\alpha$ -Polymorphismus -308 (G/A). Durch die Verwendung unterschiedlich langer allelspezifischer Primer (pTNF1 und pTNF2) werden zwei allelspezifische PCR-Produkte generiert: das PCR-Produkt für TNF1 (-308 G) mit einer Länge von 162bp und das PCR-Produkt für TNF2 (-308 A) mit einer Länge von 147bp. .... 49
- Abb. 11: Restriktionsverdau durch die Restriktionsendonukleasen BanI und MboI: BanI spaltet das 349bp-Produkt, bei Vorhandensein des A-Allels in ein 260bp- und ein 89bp-Fragment, nicht aber, wenn das B-Allel vorliegt. MboII spaltet nur bei Vorhandensein des C-Allels in ein 279- und ein 70bp-Fragment. Die jeweils kleineren Fragmente sind nicht identifizierbar, da sie mit Überresten der PCR zusammenlaufen. .... 50
- Abb. 12: Restriktionsverdau zur Genotypisierung des D-Allels. HhaI spaltet, wenn ein A-, B-, oder C-Allel vorliegt in ein 100bp- und ein 25bp-Fragment, MluII spaltet, wenn ein D-Allel vorliegt. Hier liegt kein D-Allel vor. .... 51
- Abb. 13: Restriktionsverdau zur Genotypisierung des D-Allels. HhaI spaltet, wenn ein A-, B-, oder C-Allel vorliegt in ein 100bp- und ein 25bp-Fragment, MluII spaltet, wenn ein D-Allel vorliegt. Hier liegen die Genotypen A/D und A/X (d.h. A/A, A/B oder A/C) vor. Unv.: unverdaute Kontrolle ..... 51
- Abb. 14: Gelelektrophorese zur Kontrolle der DNA-Aufreinigung; L: Molekulargewichtsstandard; 1-19: Patientenproben; ..... 52
- Abb. 15: Sequenzierung des Genabschnitts von Chromosom 10, Exon 1, der die Codons 52, 54 und 57 enthält. Die Sequenz ist rückwärts (reverse) und komplementär zu lesen. Der dargestellte Abschnitt ist frei von Mutationen. .... 53
- Abb. 16: Sequenzierung des Genabschnitts von Chromosom 10, Exon 1, der die Codons 52, 54 und 57 enthält. Die Sequenz ist von links nach rechts zu lesen. Dargestellt ist eine heterozygote Mutation in Codon 52 von CGT zu TGT, entsprechend dem Allel D. .... 54
- Abb. 17: Sequenzabschnitte aus Chromosom 10, Exon 1, der die Codons 52, 54 und 57 enthält. Die Sequenz ist komplementär und von rechts nach links (reverse) zu lesen. Dargestellt ist eine heterozygote Punktmutation in Codon 54 von GGC zu GAC, die dem Allel B entspricht. Die Codons 57 und 52 zeigen den Wildtyp. .... 54
- Abb. 18: Direkter Vergleich eines Sequenzabschnitts mit heterozygoter Mutation und eines Sequenzabschnitts ohne Mutation in Codon 54. Das mitabgebildete Codon 57 zeigt keine Mutation. .... 55
- Abb. 19: Sequenzabschnitt aus Chromosom 10, Exon 1, der die Codons 54 und 57 enthält. In Codon 57 liegt eine heterozygote Punktmutation von GGA zu GAA vor. .... 56
- Abb. 20: Darstellung der Häufigkeiten der MBL-Genotypen in der Gruppe der Patienten mit RA ..... 57
- Abb. 21: Darstellung der Häufigkeiten der TNF $\alpha$ -Genotypen in der Gruppe der Patienten mit RA ..... 57
- Abb. 22: Die Krankheitsdauer war in der MBL A/0-Gruppe signifikant höher als in der MBL A/A-Gruppe (MBL A/A: Median 4,0 Jahre; MBL A/0: Median 6,5 Jahre). Die Boxen umfassen alle Werte innerhalb der 25% und 75% Perzentile. Die Linie in der Mitte der Box stellt den Median dar. Die Verlängerungen geben die 10% und die 90% Perzentile an. \*: p<0.05. .... 63
- Abb. 23: Der MBL- Serumspiegel war in der MBL A/0-Gruppe signifikant niedriger als in der MBL-A/A-Gruppe (MBL A/A: 2235  $\mu$ g/ml; MBL A/0: Median 852 $\mu$ g/ml). \*: p<0.05. .... 64
- Abb. 24: Die Anzahl geschwollener Gelenke war in der TNF2-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zur TNF1-Gruppe. \*: p<0.05. .... 65

Abb. 25: Der Ritchie Index war in der TNF2-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zur TNF1-Gruppe. *: $p < 0.05$ .....	66
Abb. 26: In der TNF2-Gruppe lagen signifikant höhere Werte für die Dauer der Morgensteifigkeit in Minuten vor. *: $p < 0.05$ .....	67
Abb. 27: Assoziation von CRP und TNF $\alpha$ in der Gruppe der Patienten mit RA. ●: MBL A/A ▲: MBL A/O.....	68

## **8 Anhang**

---

### Ritchie Index (Ritchie et al., 1968):

Erfassung von 26 definierten Gelenkreaktionen auf Druck: kein Schmerz (= 0); schmerzhaft (= 1); schmerzhaft mit Zucken (= 2); schmerzhaft mit Zucken u. Wegziehen (= 3). Die Summe der Bewertung aller Gelenke ergibt den Index.

### Steinbrocker-Kriterien (Steinbrocker et al., 1949):

#### Klasse Funktionskapazität

- 1 Vollständige Fähigkeit, alle üblichen Verrichtungen im Tagesablauf ohne Behinderung auszuführen
- 2 Funktionskapazität ausreichend für normale Tätigkeiten trotz Beschwerden oder beschränkter Bewegungsfähigkeit eines oder mehrerer Gelenke
- 3 Funktionskapazität auf kleine (bzw. gar keine) Tätigkeiten des alltäglichen Lebens oder der Selbstversorgung beschränkt
- 4 Weitgehende oder völlige Behinderung: Bettlägerigkeit, Rollstuhlbedürftigkeit, wenig oder keine Selbstversorgung

### Functional Status Score nach Raspe (Raspe 1990) entsprechend dem Funktionsfragebogen Hannover (FfbH):

FFbH-P – Funktionsfragebogen Hannover für Polyarthritiker umfasst die folgenden 12 Fragen zu Tätigkeiten des täglichen Lebens:

- Können Sie Brot streichen?
- Können Sie aus einem normal hohen Bett aufstehen?
- Können Sie mit der Hand schreiben (mindestens eine Postkarte)?
- Können Sie Wasserhähne auf- und zudrehen?
- Können Sie einen 10 kg schweren Gegenstand (Wassereimer) hochheben und 10 Meter weit tragen?
- Können Sie sich von Kopf bis Fuß waschen und abtrocknen?
- Können Sie sich bücken und einen leichten Gegenstand (z. B. Geldstück) vom Fußboden aufheben?
- Können Sie einen Wintermantel an- und ausziehen?
- Können Sie ca. 100 Meter schnell laufen, etwa um einen Bus zu erreichen?
- Können Sie öffentliche Verkehrsmittel benutzen?
- Können Sie ein Telefon mit Wählscheibe oder Tasten benutzen?

Die Fragen werden mit „ja“ (2 Punkte), „ja, aber mit Mühe“ (1 Punkt), „nein“ oder nur „mit fremder Hilfe“ (0 Punkte) beantwortet. Angegeben wird die Summe der erzielten Punkte.

## 9 Literaturverzeichnis

---

Aho K, Koskenovou M, Tuominen J, Kaprio J . Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins. *J Rheumatol* 1986; 13: 899-902

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-324

Arnold JN, Dwek RA, Rudd P, Sim RB. Mannan binding lectin and its interaction with immunoglobulins in health and disease. *Immunol letters* 2006; 106: 103-110

Bajtay Z, Jozsi M, Banki Z, Thiel S, Thielens N, Erdei A. Mannan-binding lectin and C1q bind to distinct structures and exert differential effects on macrophages. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1706-1713

Balazs EA, Watson D, Duff IF, Roseman S. Hyaluronic acid in synovial fluid. Molecular parameters of hyaluronic acid in normal and in arthritis human fluids. *Arthritis Rheum* 1967; 10: 375-376

Barton A. HLA and other susceptibility genes in rheumatoid arthritis. UpToDate, Version 14.2 April 2006; [www.UpToDate.com](http://www.UpToDate.com)

Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors. *Nature* 1986; 319: 516-518

Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, Kolkman JJ, von Blomberg BM, Kostense PJ, Giphart MJ, Schreuder GM, Meuwissen SG, Peña AS. Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 1996; 43: 456-463.

Brennan FM, Maini RN, Feldman M. TNF $\alpha$ - a pivotal role in rheumatoid arthritis? *Br J Rheumatol*; 1992; 31: 293-298

Brinkman BMN, Zuijdeest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CL. Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) -308 promoter polymorphism in TNF alpha gene regulation. *J Inflamm* 1996; 46: 32- 41

Brinkman BM, Huizinga TW, Kuban SS. Tumour necrosis factor alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease? *Brit J Rheum* 1997; 36: 516-521

Castor WC, Dorstewitz EL. Abnormalities of connective tissue cells cultured from patients with rheumatoid arthritis. I. Relative unresponsiveness of rheumatoid synovial cells to hydrocortisone. *J Lab Clin Med* 1966; 68: 301-313

Collard CD, Shernan SK, Fox AA, Bernig T, Chanock SJ, Vaughn WK, Takahashi K, Ezekowitz AB, Jarolim P, Body SC. The MBL2 „LYQA Secretor“ Haplotype is an independent predictor of postoperative myocardial infarction in whites undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Circulation* 2007; 116:106-112.

Cuenca J, Cuchacovich M, Pérez C, Ferreira L, Aguirre A, Schiattino I, Soto L, Cruzat A, Salazar-Onfray F, Aguillón JC. The -308 polymorphism in the tumour necrosis factor (TNF) gene promoter region and ex vivo lipopolysaccharide-induced TNF expression and cytotoxic activity in Chilean patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2002; 42: 308-313

Cvetkovic JT, Wallberg-Jonsson S, Stegmayr B, Rantapaa-Dahlqvist S, Lefvert AK. Susceptibility for and clinical manifestations of rheumatoid arthritis are associated with polymorphisms of the TNF-alpha, IL-1beta, and IL-1Ra genes. *Rheumatology* 2002; 41: 988-995

Danis VA, Millington M, Hyland V, Lawford R, Huang Q, Grennan D. Increased frequency of the uncommon allele of a tumor necrosis factor alpha gene polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Dis Markers* 1994; 12: 127-133

Das SN, Banisadi V, Kapuria V. Association of -308 TNF- $\alpha$  promoter Polmorphism with type 1 diabetes in North Indians. *Int Journal Immunogenet* 2006; 33: 411-416

Dayer JM, Beutler B, Cerami A. Cachectin/ tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 1985; 162: 2163-2168

Del Puente A, Knowle WC, Pettitt DJ. High incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in Pima Indians. *Am J Epidemiol* 1989; 129: 218-227

El Sahly HM, Reich RA, Dou SJ, Musser JM, Graviss EA. The effect of mannose binding lectin gene polymorphisms on susceptibility to tuberculosis in different ethnic groups. *Scand J Infect Dis* 2004; 36: 106-108

Engström-Laurent A, Hällgren R. Circulating hyaluronate in rheumatoid arthritis: relationship to inflammatory activity and the effect of corticosteroid therapy. *Ann Rheum Dis* 1985; 44: 83-88

Ezekowitz RA. Role of the Mannose Binding Lectin in Innate Immunity. *J Infect Dis* 2003; 187: 335-339

Felson DT. Epidemiology of the Rheumatic Diseases. In: Koopman WJ, Moreland LW, ed. *Arthritis and Allied Conditions*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2005: 1-36

Fex E, Jonsson K, Johnson U, Eberhardt K. Development of radiographic damage during the first 5-6 yr of rheumatoid arthritis. A prospective follow-up study of a Swedish cohort. *Br J Rheumatol* 1996; 35:1106-1115

Field F. Tumor necrosis factor polymorphisms in rheumatic diseases. *Q J Med* 2001; 94: 237-246

- Firestein GS, Alvaro-Garcia JM, Maki R. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1990; 144: 3347-3353
- Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; 423: 356-361
- Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RA. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 1998; 10: 363-372
- Garred P, Madsen HO, Kurtzhals LU, Lamm LU, Thiel S, Hey AS, Svejgaard A. Diallelic polymorphism may explain variations of the blood concentration of mannan-binding protein in eskimos, but not in black Africans. *Eur J Immunogenetics* 1992; 19: 403-412
- Garred P, Madsen HO, Marquart TM, Hansen TM, Sørensen SF, Petersen J, Volck B, Svejgaard A, Graudal NA, Rudd PM, Dwek RA, Sim RB, Andersen V. Two edged role of mannose binding lectin in rheumatoid arthritis: a cross sectional study. *J Rheumatol* 2000; 27: 26 - 34
- Garred P, Strom JJ, Quist L, Taaning E, Madsen HO. Association of mannose-binding lectin polymorphisms with sepsis and fatal outcome, in patients with systemic inflammatory response syndrome. *J Infect Dis* 2003; 188: 1394- 1403
- Garrod AB. The great practical experience of separating rheumatoid arthritis from gout. *Lancet* 1892; 2: 1033-1037
- Goldsby R, Kindt TJ, Osborne BA. *Kuby Immunology*, New York: W.H. Freeman and Company, 2000: 53
- Graudal NA, Homann C, Madsen HO, Svejgaard A, Jurik AG, Graudal HK, Garred P. Mannan binding lectin in rheumatoid arthritis. A longitudinal study. *J Rheumatol* 1998; 25: 629- 635
- Graudal NA, Madsen HO, Tarp U, Svejgaard A, Jurik G, Graudal HK, Garred P. The association of variant mannose binding lectin genotypes with radiographic outcome in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 515-521
- Gupta B, Agrawal C, Raghav SK, Das SK, Das RH, Chaturvedi VP, Das HR. Association of mannose-binding lectin (MBL2) polymorphisms with rheumatoid arthritis in an Indian cohort of case-control samples. *J Human Genet* 2005; 50: 583-591
- Harris D, Schur PH, 2006: Pathogenesis of rheumatoid arthritis. UpToDate, Version 14.1 December 2006. [www.UpToDate.com](http://www.UpToDate.com) (14.05.2007)
- Harvey J, Lotze M, Stevens MB, Lambert G, Jacobson D. Rheumatoid arthritis in a Chippewa band. I. Pilot screening study of disease prevalence. *Arthritis Rheum* 1981; 24: 717- 721
- Hart ML, Ceonzo KA, Shaffer LA, Takahashi K, Rother RP, Reenstra WR, Buras JA, Stahl GL. Gastrointestinal Ischemia-Reperfusion Injury is lectin complement pathway dependent without involving C1q<sup>1</sup>. *J Immunol* 2005, 174: 6373-6380

Heise CT, Nicholls JR, Leamy CE, Wallis R. Impaired secretion of rat mannose-binding protein resulting from mutations in the collagen-like domain. *J Immunol* 2000; 165: 1403-1409

Hettenkofer HJ, ed. *Rheumatologie: Diagnostik-Klinik-Therapie*, Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag, 2001: 89

Hung T, Mak K, Fong K. A specificity enhancer for polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 4953

Huscher D, Merkesdahl S, Thiele K, Zeidler H, Schneider M, Zink A; German Collaborative Arthritis Centres. Cost of illness in rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis and systemic lupus erythematosus in Germany. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 1175-1183

Ip WK, Chan SY, Lau CS, Lau YL. Association of systemic lupus erythematosus with promoter polymorphisms of the mannose-binding lectin gene. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1663-1668

Ip WK, Lau YL, Chan SY, Mok CC, Chan D, Tong KK, Lau CS. Mannose binding lectin and rheumatoid arthritis in southern Chinese. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1679-1687

Jacobson S, Madsen HO, Klarlund M, Jensen T, Skjødt H, Jensen KE, Svejgaard A, Garred P; TIRA Group. The influence of mannose binding polymorphisms on disease outcome in early polyarthritis. *J Rheumatol* 2001; 28: 935- 942

Jakab L, Laki J, Sallai K, Temesszentandrási G, Pozsonyi T, Kalabay L, Varga L, Gombos T, Blaskó B, Bíró A, Madsen HO, Radics J, Gergely P, Füst G, Czirják L, Garred P, Fekete B. Association between early onset and organ manifestations of systemic lupus erythematosus (SLE) and a down-regulating promoter polymorphism in the MBL2 Gene. *Clin Immunol* 2007; 125: 230-236

Jasin HE. Autoantibody specificities of immune complexes sequestered in articular cartilage of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1985; 28: 241-248

Jones MA, Silman AJ, Whiting S, Barrett EM, Symmons DP. Occurrence of rheumatoid arthritis is not increased in the first degree relatives of a population based inception cohort of inflammatory polyarthritis. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 89-93

Kaiser H. A. J. Landré-Beauvais (1772–1840)- der wirkliche Erstbeschreiber der rheumatoiden Arthritis. *Z Rheumatol* 2004; 63: 430-435

Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G. Transgenic mice-expressing human tumor necrosis factor: A predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 1991; 10: 4025-4031

Keller TT, van Leuven SI, Meuwese MC, Wareham NJ, Luben R, Stroes ES, Hack CE, Levi M, Khaw KT, Boekholdt SM. Serum levels of mannose-binding lectin and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2345-2350



- Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1572: 401-413
- Klippel JH. Biologic therapy for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2000; 343: 1640-1641
- Koneti AK, Linke MJ, Brummer E, Stevens DA. Evasion of Innate immune responses: evidence for mannose binding lectin inhibition of tumor necrosis factor alpha production by macrophages in response to *Blastomyces dermatidis*. *Infect Immunol* 2008; 76: 994-1002
- Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997; 34: 391-399
- Kroeger KM, Steer JH, Joyce DA, Abraham LJ. Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumor necrosis factor promoter polymorphism. *Cytokine* 2000; 12: 110-119
- Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill A. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Gen* 1992; 1: 709-715
- Listing J, Strangfeld A, Rau R, Kekow J, Gromnica-Ihle E, Klopsch T, Demary W, Burmester GR, Zink A. Clinical and functional remission: even though biologics are superior to conventional DMARDs overall success rates remain low- results from RABBIT, the German biologics register. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R66. Epub 2006 Apr 5.
- Luty AJ, Kun JF, Kremser PG. Mannose binding-lectin plasma levels and gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 1998; 178: 1221- 1224
- MacGregor AJ, Riste LK, Hazes JMW, Silman AJ. Low prevalence of rheumatoid arthritis in black caribbeans compared with whites in inner city Manchester. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 293-297
- Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JAL, Lamm LU, Ryder LP, Thiel S, Svejgaard A. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics* 1994; 40: 37-44
- Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Svejgaard A. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol* 1995; 155: 3013-3020
- Masoud SA, Johnson LB, White FF. The sequence within two primers influences the optimum concentration of dimethyl sulfoxide in the PCR. *PCR Methods Appl* 1992; 2: 89-90
- Maxwell JR, Potter C, Hyrich KL, Biologics in Rheumatoid arthritis genetics and genomics study syndicate, Barton A, Worthington J, Isaacs JD, Morgan AW, Wilson AG. Association of the tumour necrosis factor -308 variant with differential response to anti-TNF-agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 332-338

- McNeil J, Wiebkin OW, Betts HW, Cleland LG. Depolymerisation products of hyaluronic acid after exposure to oxygen-derived free radicals. *Ann Rheum Dis* 1985; 44: 780-789.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215
- Monticelo OA, Mucenic T, Xavier RM, Brenol JC, Chies JA. The role of mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2008, 27: 413-419
- Nadesalingam J, Doods AW, Reid KBM, Paniyar N. Mannose-binding lectin recognizes peptidoglycan via the N-Acetyl Glucosamine moiety, and inhibits ligand-induced proinflammatory effect and promotes chemokine production by macrophages. *J Immunol* 2005; 175: 1785-1794
- Naito H, Ma Y, Uemura K, Arano Y, Kawasaki T. Metabolic properties of normal and mutant mannan-binding proteins in mouse plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256: 231-234
- Nissim A, Winyard PG, Corrigan V, Fatah R, Perrett D, Panayi G, Chernajovsky Y. Generation of neoantigenic epitopes after posttranslational modification of type II collagen by factors within the inflamed joint. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3829-3838
- Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA, Henson PM. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and cd91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med* 2001; 194: 7817-7896
- Pavasant P, Shizari T, Underhill CB. Hyaluronan synthesis by epiphyseal chondrocytes is regulated by growth hormone, insulin-like growth factor-1, parathyroid hormone and transforming growth factor- $\beta$ 1. *Matrix biology* 1994; 15: 4234-4232
- Pawlik A, Florczak M, Ostanek L, Brzosko M, Brzosko I, Szklarz BG. TNF alpha -308 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Scan J Rheumatol* 2005; 34: 22-26
- Peterslund NA, Koch C, Jensenius JC, Thiel S. Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy. *Lancet* 2001; 358: 637-678
- Ramasawmy R, Spina GS, Kellen CF, Pereira AC, Nisihara R, Messias Reason IJM, Grinberg M, Tarasoutchi F, Kalil J, Guilherme L. Association of Mannose-binding lectin gene Polymorphism but not of mannose-binding serine protease 2 with chronic severe aortic regurgitation of rheumatic etiology. *Clin vaccine Immunol* 2008; 15: 932-936
- Rantapaa-Dahlqvist S, De Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U, van Venrooij WJ. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1831-1835
- Raspe HH. Psychosoziale Untersuchungen. In: Zeidler H, ed. *Rheumatologie Teil A/B*. Urban&Schwarzenberg München, Wien, Baltimore, 1990: 162

- Rezaieyazdi Z, Afshari JT, Sandooghi M, Mohajer F. Tumor necrosis factor  $\alpha$ -308 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2007; 28: 189-191
- Ritchie DM, Woods RJ, McInnes JM, Jasani MK, Dalakos TG, Grieveon P, Buchanan WW. Clinical studies with an articular index for the assessment of joint tenderness in patients with rheumatoid arthritis. *Q J Med* 1968, 37: 393-406
- Rothschild BM, Woods RJ. Symmetrical erosive peripheral arthritis in the late archaic period of Alabama. *Science* 1988; 241: 1498-1501
- Rust S, Funke H, Assmann G. Mutagenically separated PCR (MS-PCR): a highly specific one step procedure for easy mutation detection. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 3623-3629
- Saevarsdottir S, Vikingsdottir T, Vikingsson A, Manfredsdottir V, Geirsson AJ, Valdimarsson H. Low mannose binding lectin predicts poor prognosis in patients with early rheumatoid arthritis. A prospective study. *J Rheumatol* 2001; 28: 728- 734
- Saklatvala J. Tumor necrosis factor  $\alpha$  stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature* 1986; 322: 547-549
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Second Edition)*, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467
- Santos IK, Costa CH, Krieger H, Feitosa MF, Zurakowski D, Fardin B, Gomes RB, Weiner DL, Harn DA, Ezekowitz RA, Epstein JE. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 2001; 69: 5212- 5225
- Sastry K, Herman GA, Day L, Deignan E, Bruns G, Morton CC, Ezekowitz RA. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a pulmonary surfactant gene and its localization to chromosome 10. *J Exp Med* 1989; 170: 1175-1189
- Schafranski MD, Stier A, Nisihara R, Messias-Reason IJT. Significantly increased levels of mannose-binding lectin (MBL) in rheumatic heart disease: a beneficial role for MBL deficiency. *Clin Exp Immunol* 2004; 138: 521-525
- Schlüter B, Erren M, Schotte H, Junker R, Rust S, Assmann G. The mutagenically separated polymerase chain reaction is a rapid and reliable method for genotyping of the tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter polymorphism (-308G/A). *Clinica Chimica Acta* 2002; 320: 135-138
- Schneider M, Lelgemann M, Abholz HH, Caratti R, Flügge C, Jäniche H, Kunz R, Krüger K, Rehart S, Specker C. DGRh-Leitlinie. Interdisziplinäre Leitlinie Management der frühen rheumatoiden Arthritis. Darmstadt: Steinkopff Verlag, 2007

Schweinle JE, Ezekowitz RAB, Tenner AJ, Kuhlmann M, Joiner KA. A human mannose-binding protein activate the alternative complement pathway and enhances serum bactericidal activity on mannose-rich isolate of salmonella. *J Clin Invest* 1989; 84: 1821-1829

Seitz M, Withmüller U, Möller B, Villiger PM. The -308 tumour necrosis factor-alpha gene polymorphism predicts therapeutic response to TNFalpha-blockers in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients. *Rheumatol* 2007; 46: 93-96

Shi L, Takahashi K, Dundee J, Shahroor-Karnie S, Thiel J, Jensenius C, Gad F, Hamblin MR, Sastry KN, Ezekowitz RA. Mannose binding lectin-deficient mice are susceptible to infection with *Staphylococcus aureus*. *J Exp Med* 2004; 199: 1379-1390

Shmerling RH, 2006: Origin and utility of measurement of rheumatoid factors. UpToDate version 14.2 April 2006. [www.UpToDate.com](http://www.UpToDate.com) (28.08.2006)

Silman AJ, Ollier W, Holligan S, Birrell F, Adebajo A, Asuzu MC, Thomson W, Pepper L. Absence of rheumatoid arthritis in a rural Nigerian population. *J Rheumatol*. 1993; 20: 618-622

Silman AJ, MacGregor AJ, Thjomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, Ollier WE. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: Results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 1993; 32: 903-907

Silman AJ, Hochberg MC, ed. Rheumatoid Arthritis. In: *Epidemiology of the rheumatic diseases*, 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2001: 124

Steinbrocker O, Traeger CH, Batterman RC. Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. *J Am Med Assoc* 1949; 140: 659-652

Sumiya M, Super M, Tabona P, Levinsky RJ, Arai T, Turner MW, Summerfield JA. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet* 1991; 337: 1569-1570

Summerfield JA, Ryder S, Sumi M, Thursz M, Gorchein A, Monteil MA, Turner MW. Mannose binding protein mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet* 1995; 345: 886-889

Symmons DP, Barrett EM, Bankhead R, Scott DG, Silman AJ. The incidence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: results from the Norfolk Arthritis Register. *Br J Rheumatol* 1994; 33: 735-739

Taylor ME, Brickell PM, Craig RK, Summerfield JA. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human mannose-binding protein. *Biochem J* 1989; 262: 763-771

Troelsen LN, Garred P, Madsen HO, Jacobsen S. Genetically determined high serum levels of mannose-binding lectin and agalactosyl IgG are associated with Ischemic heart disease in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 21-29

Ulrich-Merzenich G. Hyaluronsäure und andere Glycosaminoglykane in der chronischen Polyarthritis. Dissertation Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn 1998, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

Ulrich-Merzenich G, Kraft K, Singh LM. Rheumatic diseases in Ayurveda: a historical perspective. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1553-1555

Van de Geijn FE, Hazes JM, Geleijns K, Emonts M, Jacobs BC, Dufour-van den Goorbergh BC, Dolhain RJ. Mannose-binding lectin polymorphisms are not associated with rheumatoid arthritis-confirmation in two large cohorts. *Rheumatol* 2008; 47: 1168-1171

Vassali P. The pathophysiology of Tumor Necrosis Factor. *Ann Rev Immunol* 1992; 10: 411-452

Venables PJW, Maini RN, 2006: Diagnosis and differential diagnosis of rheumatoid arthritis. UpToDate, Version 14.2 April 2006. [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com) (16.08.2006)

Verweij CL. Tumor necrosis factor gene polymorphisms as severity markers in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999; 58: (Suppl) I20-I26

Vinasco J, Beraún Y, Nieto A, Fraile A, Mataran L, Pareja E, Martín J. Polymorphisms at the TNF loci in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1997; 49: 74-78

Wallis R, Cheng JY. Molecular defects in variant forms of mannose-binding protein associated with immunodeficiency. *J Immunol* 1999; 163: 4953-4959

Walport MJ. The Roche Rheumatology Prize Lecture. Complement deficiency and disease. *Br J Rheumatol* 1993; 32: 269-273

Walsh MC, Bourcier T, Takahashi K, Shi L, Busche MN, Rother RP, Solomon SD, Ezekowitz RA, Stahl GL. Mannose-binding lectin is a regulator of inflammation that accompanies myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Immunol*. 2005; 175: 541-546

Wilson AG, de Vries N, van de Putte LB, Duff GW. A tumour necrosis factor alpha polymorphism is not associated with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1995; 54: 601-603.

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3195- 3199

Young A, Koduri G, Batley M, Kulinskaya E, Gough A, Norton S, Dixey J; Early Rheumatoid Arthritis Study (ERAS) group. Mortality in rheumatoid arthritis. Increased in the early course of the disease, in ischaemic heart disease and in pulmonary fibrosis. *Rheumatol* 2007; 46: 350-357

Ytting H, Christensen IJ, Thiel S, Jensenius JC, Svendsen MN, Nielsen L, Lottenburger T, Nielsen HJ. Biological variation in circulating levels of mannan-binding lectin (MBL) and MBL associated serine protease-2 and the influence of age, gender and physical exercise. *Scand J Immunol* 2007; 66: 458-464

## **Danksagung**

---

Ich danke meiner Mutter und meiner Schwester und meiner ganzen Familie für die stetige und unermüdliche Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit und auch während meines gesamten Studiums.

Herrn Prof. Dr. H. Vetter danke ich für die Überlassung des Promotionsthemas und die Möglichkeit im wissenschaftlichen Labor der Medizinischen Poliklinik zu arbeiten.

Herrn Prof. Dr. M. Ludwig danke ich insbesondere für die Sequenzierungen und die wertvollen Diskussionen vor Fertigstellung der Arbeit.

Frau B. Schiermeyer danke ich für die vielfältige Unterstützung im Laboralltag und die Einarbeitung in verschiedene Labortechniken.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. G. Ulrich-Merzenich, die mich in die Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens eingeführt hat, mir immer hilfreich zur Seite gestanden ist und mit ihrem forschersischem Wissensdrang und Enthusiasmus auch in Zukunft ein Vorbild sein wird.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht im Rahmen des 32. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, September 2003, Frankfurt a. M.:

Influence of variant mannose-binding lectin genotypes and the TNF-alpha promoter polymorphism (-308 G/A) on rheumatoid arthritis. Ulrich-Merzenich G, Hausen A, Desai A, Schiermeyer B, Ludwig M, Vetter H.