

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Genetische Polymorphismen in Toll-like-Rezeptoren,
rheumatoide Arthritis und Höhe von Rheumafaktor im Serum**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von

Axel Hamprecht

aus Köln

Abstract

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung der Welt. Sie verläuft meist chronisch-progressiv und kann schließlich zu Gelenkdestruktion und Invalidität führen. Trotz intensiver Forschungen bleibt die Pathogenese der RA weiterhin unklar. Neuere Untersuchungen weisen auf die wichtige Rolle des angeborenen Immunsystems hin, insbesondere der Toll-like-Rezeptoren (TLRs) TLR2 und TLR9. Genetische Polymorphismen in TLR2 und TLR9 könnten daher zur Erkrankung einer RA prädisponieren, davor schützen oder den Verlauf der RA beeinflussen. Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Assoziation zwischen RA-Erkrankung, dem Rheumafaktor (RF)-Serostatus und der Höhe des RF im Serum und genetischen Polymorphismen im TLR2- und TLR9-Gen zu analysieren.

Zur Untersuchung der TLR9-Polymorphismen T-1237C und T-1486C wurde ein real-time-PCR-basiertes Verfahren am LightCycler (LC) etabliert, das den schnellen Nachweis beider Polymorphismen in einer Reaktion mittels fluoreszenzmarkierter Hybridisierungssonden ermöglicht. Desweiteren wurde ein neues Puffersystem verwendet, das die LC-PCR unter Verwendung einer konventionellen *Taq*-Polymerase zu erheblich günstigeren Kosten ermöglicht.

Die Genotypisierung der DNA von 118 RA-Patienten (89 weiblich, 29 männlich, Durchschnittsalter 56,2 Jahre) und einer geschlechtsgematchten Kontrollgruppe von 118 Personen (Durchschnittsalter 44,1 Jahre) zeigte, dass die TLR9-Polymorphismen T-1486C und T-1237C sowie der TLR2-Polymorphismus G2408A nicht für das Auftreten von RA prädisponieren. Träger des seltenen C-Allels sind signifikant häufiger RF-positiv ($p=0,049$) und ihre RF-Antikörperspiegel sind höher als bei Patienten, die das C-Allel nicht aufweisen ($p=0,023$). Der TLR9-Polymorphismus T-1486C könnte daher die Krankheitsausprägung beeinflussen.

Schlagerworte: Rheumatoide Arthritis, Rheumafaktor, Toll-like-Rezeptor, Genetischer Polymorphismus, LightCycler PCR

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is the most common inflammatory joint disease worldwide. It is a chronic progressive disease which can eventually lead to joint destruction and disability. The pathogenesis of RA remains uncertain in spite of the intensive research in this field. Recent data indicate the important role of the innate immune system, especially of the toll like receptors (TLRs) TLR2 and TLR9 in the pathogenesis of RA. Genetic polymorphisms in the TLR2 and TLR9 gene could therefore predispose to RA, protect against it or influence its course.

The aim of this work was to analyse the association of RA, the serostatus of rheumatoid factor (RF) and its levels with genetic polymorphisms in the TLR2 and TLR9 gene.

A new real time PCR based method was developed on the LightCycler (LC) in order to analyse the TLR9 polymorphisms T-1237C and T-1486C. This method permits the fast detection of both polymorphisms in a single reaction using fluorescence labelled hybridization probes. Furthermore, a new reaction mix was developed which allows the use of a conventional *Taq* polymerase for the LC-PCR at much lower costs.

The genotyping of 118 RA patients (89 female, 29 male; average age 56.2 years) and a control group of 118 healthy individuals (average age 44.1 years) showed that the TLR9 polymorphisms T-1237C and T-1486C and the TLR2 polymorphism G2408A do not predispose to RA disease. The TLR9 polymorphism T-1486C might influence the course of the disease as individuals with the rare C-allele are significantly more frequent RF-positive ($p=0.049$) and their RF-antibody levels are higher than in patients who do not bear the C-allele ($p=0.023$).

Key words: rheumatoid arthritis, rheumatoid factor, toll like receptor, LightCycler PCR, genetic polymorphism

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Ralf Schumann
2. Prof. Dr. med. Andreas Krause
3. Prof. Dr. med. Eicke Latz

Datum der Promotion: 18.07.2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Entzündung und Krankheitsabwehr	1
1.2	Rheumatoide Arthritis	3
1.2.1	Definition und Epidemiologie	3
1.2.2	Pathologische Charakteristika	3
1.2.3	Rheumafaktor	4
1.2.4	Diagnostik.....	4
1.2.5	Therapie	5
1.2.6	Ätiologie und Pathogenese	6
1.2.7	Verlauf und Prognose	7
1.3	Genetische Polymorphismen und Krankheitsdisposition.....	7
1.3.1	Methoden zur SNP-Erkennung	9
1.4	Regulation der Immunantwort.....	9
1.4.1	Angeborenes und adaptives Immunsystem	9
1.4.2	Toll-like-Rezeptoren.....	11
1.5	Rheumatoide Arthritis und das angeborene Immunsystem.....	17
2	Aufgabenstellung	20
3	Materialien und Methoden.....	21
3.1	Patientenproben	21
3.2	Chemikalien und Reagenzien	22
3.3	Enzyme.....	22
3.4	Puffer.....	23
3.5	Synthetische Oligonukleotide.....	23
3.6	Kitsysteme	24
3.7	Einwegmaterialien	24
3.8	Geräte.....	24
3.9	Software	25
3.10	Molekularbiologische Methoden.....	26
3.10.1	Isolierung von DNA durch Phenol-/Chloroform-/Isoamylextraktion und Ethanolpräzipitation	26
3.10.2	Genotypisierung durch Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) und Hybridisierungssonden	26
3.10.3	Real-time-PCR-basierte Genotypisierung von Polymorphismen am LightCycler mittels eines neuen Reaktionsmixes	30

3.10.4	Genotypisierung durch Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen	34
3.10.5	Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Produkten für analytische Zwecke	36
3.10.6	Bestimmung der DNA-Konzentration von genomischer DNA.....	37
3.10.7	Cycle Sequencing von PCR-Produkten	37
3.11	Statistische Auswertung.....	38
4	Resultate	39
4.1	Analyse der Transkriptionsfaktorbindungsstellen an den Positionen der TLR9-Polymorphismen T-1237C und T-1486C	39
4.2	LightCycler-PCR zur Detektion der TLR9-Polymorphismen T-1486C und T-1237C.....	40
4.3	RFLP zur Detektion der TLR9-Polymorphismen T-1237C und T-1486C.....	42
4.4	Der TLR9-Polymorphismus T-1237C bei RA-Patienten und Gesunden.....	45
4.4.1	Verteilung der Genotypen des T-1237-Polymorphismus.....	45
4.4.2	Allelhäufigkeiten des T-1237-Polymorphismus	46
4.5	Der TLR9-Polymorphismus T-1486C bei RA-Patienten und Gesunden.....	47
4.5.1	Verteilung der Genotypen des T-1486C-Polymorphismus	47
4.5.2	Allelhäufigkeiten des T-1486C-Polymorphismus.....	48
4.6	Der TLR2-Polymorphismus G2408A bei RA-Patienten und Gesunden	49
4.6.1	Verteilung der Genotypen des G2408A-Polymorphismus.....	49
4.7	TLR-Polymorphismen bei RF-positiven und RF-negativen RA-Patienten	50
4.8	Rheumafaktorspiegel in Abhängigkeit vom TLR9- und TLR2-Genotyp.....	52
5	Diskussion	54
5.1	Real-time-PCR zur Detektion der TLR9-Polymorphismen T-1237C und T-1486C.....	54
5.1.1	Vor- und Nachteile gegenüber der bisherigen Methode zur TLR9-Genotypisierung.....	55
5.2	Assoziation von genetischen Polymorphismen in TLR9 und TLR2 mit dem Auftreten von rheumatoider Arthritis	56
5.2.1	Der TLR9-Polymorphismus T-1486C.....	57
5.2.2	Der TLR9-Polymorphismus T-1237C.....	58
5.2.3	Der TLR2-Polymorphismus G2408A.....	58
5.3	TLR9- und TLR2-Polymorphismen bei RF-positiven und -negativen Patienten und Höhe von RF bei verschiedenen Genotypen	59
5.3.1	Bedeutung des TLR9-Genotyps für die Rheumafaktor-Produktion	59
5.4	Fehlermöglichkeiten und Grenzen dieser Studie	62
5.5	Ausblick	63
6	Zusammenfassung	65

7	Literaturverzeichnis.....	66
8	Abbildungsverzeichnis.....	79
9	Tabellenverzeichnis.....	80
10	Abkürzungsverzeichnis.....	81
11	Erklärung an Eides statt.....	83
12	Danksagung	84

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht unter

Hamann, L.* , Hamprecht, A.* , Gomma, A. und Schumann, R.R. (2004)

Rapid and inexpensive real-time PCR for genotyping functional polymorphisms within the Toll-like receptor -2, -4, and -9 genes.

J Immunol Methods **285**, 281-91

*contributed equally

1 Einleitung

1.1 Entzündung und Krankheitsabwehr

Der menschliche Körper ist ständig einer Vielzahl von endogenen und exogenen Stimuli ausgesetzt, die die Schädigung von Zellen zur Folge haben können. Diese Stimuli werden durch belebte Stoffe (z.B. Mikroorganismen) oder unbelebte Stoffe (Toxine, Fremdkörper u. a.) ausgelöst. Im vaskularisierten Bindegewebe können diese Stimuli eine komplexe Reaktion auslösen, die Entzündung oder Inflammation genannt wird (Cotran *et al.*, 1999a). Bei einer Entzündungsreaktion sammeln sich Flüssigkeit und Leukozyten im Bindegewebe an und verdünnen das eindringende Agens, grenzen es ein und zerstören es schließlich. Die Entzündung hat somit eine schützende Funktion, die sowohl der Beseitigung ihrer Ursachen (Mikroorganismen, Toxine u. a.) als auch der Folgen (Nekrosen) dient und soweit möglich heilende Prozesse in Gang setzt (Thomas, 1998). Die Entzündungsreaktion kann jedoch auch schädlich oder lebensbedrohlich sein. Dies zeigt sich z.B. bei der Hypersensitivitätsreaktion auf Insektenbisse oder Arzneimittel und bei chronischen Krankheiten wie der Lungenfibrose oder der rheumatoiden Arthritis. Dieser gefährliche Aspekt der Entzündung hat zur Entwicklung einer Vielzahl von antiinflammatorischen Medikamenten geführt, von der Azetylsalicylsäure über weitere Cyclooxygenasehemmer, synthetische Kortikosteroide bis zu spezifischen Hemmstoffen von einzelnen Entzündungsmediatoren (Cotran *et al.*, 1999a).

Bei Entzündungen unterscheidet man die akute und die chronische Form. Die akute Inflammation dauert wenige Minuten bis einige Tage und ist durch das Ödem gekennzeichnet, einer Exsudation von Flüssigkeit und Plasmaproteinen, sowie der Einwanderung von Leukozyten, hauptsächlich neutrophilen Granulozyten (Cotran *et al.*, 1999a). Als Folge der akuten Entzündung kann es zur kompletten Wiederherstellung des Gewebes kommen (Restitutio ad integrum), zur Ausbildung von Abszessen, zur Defektheilung mit Narbenbildung (Reparation) oder zur chronischen Entzündung. Diese Prozesse können nebeneinander vorkommen und ineinander übergehen (Abb. 1).

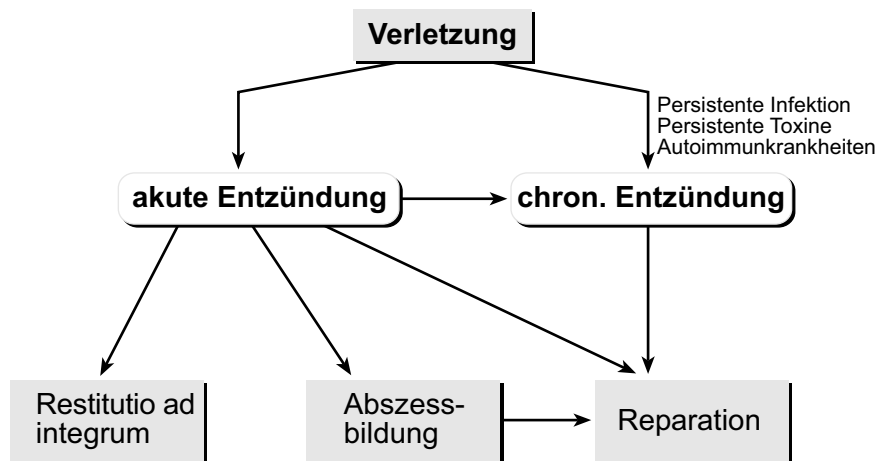


Abb. 1: Akute und chronische Inflammation

Nach einer Verletzung entwickelt sich abhängig von Mediatoren und weiteren Faktoren die akute oder chronische Entzündung, die schließlich zur kompletten Wiederherstellung (*restitutio ad integrum*), zur Abszessbildung oder zur Reparation führen (verändert nach Cotran, 1999a).

Die chronische Entzündung entwickelt sich meist aus der akuten Form und verläuft über Wochen, Monate oder Jahre. Sie ist histologisch gekennzeichnet durch das Auftreten von Lymphozyten und Makrophagen, der Proliferation von Gefäßen und Fibroblasten und dem Vorkommen von Nekrosen. Der Übergang von der akuten in die chronische Form kann auftreten, wenn die Beendigung der inflammatorischen Antwort ausbleibt, entweder durch Persistenz des eingedrungenen Agens oder durch eine Störung im normalen Heilungsprozess. Die chronische Inflammation kann jedoch auch ohne eine vorhergehende akute Inflammation aus einer unterschweligen, meist asymptomatisch verlaufenden Immunantwort hervorgehen (Cotran *et al.*, 1999a). Dies ist bei einigen der weltweit häufigsten Krankheiten der Fall, z.B. bei der Atherosklerose, der rheumatoiden Arthritis und der Tuberkulose. Voraussetzungen für die chronische Verlaufsform sind entweder die Persistenz von Mikroorganismen, z.B. von Mykobakterien oder *Treponema pallidum*, eine lang anhaltende Toxinexposition (exogen oder endogen) oder das Auftreten von Autoimmunität. Hierbei führen körpereigene Bestandteile unter bestimmten Bedingungen zu einer Immunantwort, die sich gegen bestimmte Körperbestandteile richtet und selbstunterhaltend verläuft. Zu den Autoimmunerkrankungen gehören z.B. die rheumatoide Arthritis (RA), der systemische Lupus erythematoses (SLE) und die systemische Sklerose (Janeway *et al.*, 1999b).

1.2 Rheumatoide Arthritis

1.2.1 Definition und Epidemiologie

Die rheumatoide Arthritis ist eine entzündliche Systemerkrankung, die sich meist als symmetrische Polyarthritits der kleineren Hand- und Fußgelenke manifestiert. Charakteristisch ist die Produktion von Autoantikörpern. Im Verlauf der Krankheit entwickeln sich oft erosiv-destruktive Gelenkveränderungen und es kommt zur Ausbildung von Rheumaknoten. Die Prävalenz weltweit beträgt 0,5-1 %, die jährliche Inzidenz beträgt ca. 30/100 000 Einwohner. RA tritt meist zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr auf, Frauen sind im Alter zwischen 20 und 50 dreimal häufiger betroffen als Männer (Villiger und Brühlmann, 1999).

Als häufigste entzündliche Gelenkserkrankung verursacht die rheumatoide Arthritis erhebliche finanzielle Belastungen sowohl für die Betroffenen als auch für das Gesundheitssystem. Die Arztbesuche von RA-Patienten in den Vereinigten Staaten summieren sich auf ca. drei Millionen pro Jahr. Die direkten medizinischen Kosten der RA in den USA werden auf 3,7 Milliarden US-Dollar pro Jahr geschätzt (Lipsky und Kavanaugh, 1999). Die durch Arbeitsunfähigkeit verursachten indirekten Kosten können dabei die direkten medizinischen Kosten sogar übertreffen (Pugner *et al.*, 2000). Der Anteil der Arbeitsunfähigkeitstage durch rheumatische Erkrankungen lag in Deutschland 1989 bei 14-23 %, in der gesetzlichen Rentenversicherung wurden 1990 etwa 30 Arbeitnehmer pro 10 000 Versicherte wegen rheumatischer Erkrankungen vorzeitig berentet (Altus, 2001).

1.2.2 Pathologische Charakteristika

Die Synovia der befallenen Gelenke ist bei der RA entzündlich verändert, verdickt und von T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen infiltriert. Zusätzlich zur Synovialitis bildet sich der so genannte Pannus, ein mesenchymaler Zellverbund, der die Knorpel- und Knochenstrukturen angreift (Firestein, 2001). Besonders betroffen sind meist die Grund- und Mittelgelenke der Finger und Zehen, wohingegen Endgelenke bei der rheumatoiden Arthritis ausgespart bleibt. Der Verlauf ist überwiegend chronisch-progredient und resultiert oft in erosiv-destruktiven Gelenkveränderungen, die zu einem teilweisen oder vollständigen Funktionsverlust der betroffenen Gelenke führen (Harris, 2001a).

1.2.3 Rheumafaktor

Rheumafaktoren (RF) werden definiert als eine heterogene Gruppe von Autoantikörpern, die sich gegen Antigene des Fc-Fragments von Immunglobulin G (IgG) richten (Tighe und Carson, 2001). Sie wurden erstmalig in den 40er Jahren von Waaler und Rose beschrieben als Faktoren, die Schafserythrozyten agglutinieren (Waaler, 1940; Rose *et al.*, 1949).

Etwa 70–90 % der RA-Patienten sind RF-seropositiv (Wolfe *et al.*, 1991; Dorner *et al.*, 2004). Das Vorhandensein von RF ist jedoch nicht pathognomonisch für RA, auch bei einigen Gesunden und bei Patienten mit infektiösen und chronisch-inflammatorischen Krankheiten lassen sich RF nachweisen. Erhöhte RF-Werte finden sich u. a. bei viralen Infektionen wie Hepatitis B und C, bei chronisch-bakteriellen Erkrankungen wie Tuberkulose und Syphilis und bei lymphoproliferativen Erkrankungen wie dem Morbus Waldenström (Newkirk, 2002). Während bei den meisten anderen Erkrankungen mit RF-Produktion die Rheumafaktoren der IgM-Klasse angehören, polyspezifisch und von niedriger Bindungsaffinität sind, zeichnen sich die RFs bei der RA durch hohe Spezifität und Affinität für humanes IgG aus (Newkirk und Rauch, 1994; Tighe und Carson, 2001). RFs bei RA weisen neben dem IgM-RF auch Autoantikörper der Klassen IgG, IgA und IgE auf. Der Nachweis mehrerer RF-Isotypen, insbesondere in den Gelenken, gilt daher als hochspezifisches Kriterium der RA (Jonsson *et al.*, 1998).

1.2.4 Diagnostik

Die Diagnose RA wird nach klinischen, serologischen und radiologischen Befunden gestellt. Es existiert kein einzelnes pathognomonisches Merkmal, dessen Existenz die Diagnose RA erlaubt. Erst wenn das Zusammentreffen typischer Symptome und Befunde festgestellt wird, kann die Diagnose gestellt werden (Villiger und Brühlmann, 1999). Der ausführlichen Anamnese folgt die klinische Untersuchung, bei der insbesondere die Erhebung eines detaillierten Gelenkstatus zur Diagnosefindung wichtig ist. Als bildgebendes Verfahren kommt die dorso-ventrale Röntgenaufnahme der Hände zum Einsatz, sowohl zur Erstuntersuchung wie auch zur Verlaufskontrolle. Weitere Informationen liefert die Zwei-Phasen-Skelettszintigraphie. Sie ist hilfreich, um das Entzündungsausmaß und das Gelenkverteilungsmuster zu beurteilen und erlaubt die

Differenzierung zwischen Arthritis und Arthralgie. Neben den radiologischen Untersuchungen werden mehrere Laboruntersuchungen durchgeführt, die der Diagnosesicherung und differentialdiagnostischen Abgrenzung dienen. Als charakteristische Merkmale der RA gelten der positive Rheumafaktor, eine erhöhte Blutkörperchen-Senkungsgeschwindigkeit (BSG), eine Erhöhung des C-reaktiven Proteins (CRP), eine Leukozytose und Thrombozytose mit normochrom-normozytärer Anämie sowie ein erniedrigtes Serumeisen (Villiger und Brühlmann, 1999).

Zur Diagnosestellung dienen ferner die Kriterien des American College of Rheumatology (ACR). Hierzu gehören nach Arnett *et al.* (1988):

1. Morgensteifigkeit der Gelenke von mindestens einer Stunde Dauer
2. Ärztlich diagnostizierte Weichteilschwellung (Arthritis) von drei oder mehr Gelenkregionen,
3. Arthritis der proximalen Interphalangeal-, Metakarpophalangealgelenke oder der Handwurzelgelenke
4. Symmetrische Arthritis
5. Rheumaknoten
6. Nachweis von Rheumafaktor im Serum
7. Radiologisch festgestellte Gelenkveränderungen der Hand oder des Handgelenks

Sind mindestens vier von sieben ACR-Kriterien erfüllt, gilt die Diagnose RA als gesichert (ACR-Score ≥ 4 bei RA). Die Kriterien 1-4 müssen hierbei für mindestens 6 Wochen bestehen (Arnett *et al.*, 1988).

1.2.5 Therapie

Die primäre Behandlung der RA erfolgt symptomatisch mit nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR), durch intraartikuläre Applikation von Glukokortikoiden sowie durch Physiotherapie. Orale Glukokortikoide werden insbesondere im akuten entzündlichen Schub eingesetzt. Bei chronisch-entzündlichem Verlauf wird die sogenannte Basistherapie eingeleitet. Dazu gehören Goldpräparate, Chloroquin, D-Penicillamin, Sulfasalazin, Leflunomid und Immunsuppressiva wie Methotrexat (Harris, 2001b; Smolen

und Steiner, 2003). Im Gegensatz zu den NSAR können die Basistherapeutika den Krankheitsverlauf beeinflussen. Sie werden daher auch als „disease modifying antirheumatic drugs“ (DMARDs) bezeichnet. Als neuere Therapeutika werden Antikörper gegen spezifische Entzündungsmediatoren eingesetzt („biologicals“). Insbesondere Anti-TNF- α -Antikörper (Infliximab und Adalimumab) sowie ein rekombinantes TNF-Rezeptor-Fusionsprotein (Etanercept) werden meist in Kombination mit Methotrexat erfolgreich zur Behandlung der RA angewandt (Maini *et al.*, 1999; Kremer *et al.*, 2003; Weinblatt *et al.*, 2003). Ein weiteres „biological“, das bei der RA-Therapie eingesetzt wird, ist Anakinra. Hierbei handelt es sich um einen Antikörper gegen das proinflammatorische Zytokin IL-1 (Bresnihan, 2002; Cohen *et al.*, 2002).

1.2.6 Ätiologie und Pathogenese

Über Ätiologie und Pathogenese der RA ist wenig bekannt, es werden sowohl eine genetische Prädisposition als auch hormonelle und Umweltfaktoren verantwortlich gemacht (Firestein, 2003). In Zwillingsstudien konnte gezeigt werden, dass hereditäre Faktoren nicht nur für die Krankheitsempfänglichkeit wichtig sind, sondern auch die klinische Ausprägung bestimmen. Die genetische Komponente der RA wird auf 30–60% geschätzt (Ollier und Worthington, 1997; MacGregor *et al.*, 2000), wovon ein Drittel dieses Risikos durch Gene des Histokompatibilitätskomplexes (major histocompatibility complex, MHC) bestimmt sein soll (Gregersen *et al.*, 1987). Die HLA-DR-Moleküle (human leucocyte antigen), die zur RA prädisponieren (HLA-DR1, -4 und -14), weisen eine identische Sequenz in der dritten hypervariablen Region der HLA-DR β -Kette, das so genannte „shared epitope“ auf (Gregersen *et al.*, 1986; Gregersen *et al.*, 1987; Nepom *et al.*, 1989).

Neben der Assoziation mit dem MHC blieb jedoch bisher der größte Teil der genetischen Komponente der RA unbekannt, wenn auch eine Vielzahl von Genen mit dem Auftreten von rheumatoider Arthritis in Verbindung gebracht worden ist, so z.B. das Gen für den Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNF-R) (Glossop *et al.*, 2003) und für das „monocyte chemoattractant protein 1“, MCP-1 (Gonzalez-Escribano *et al.*, 2003). Die Identifikation weiterer Gene, die zur RA prädisponieren, gilt als eine der großen Herausforderungen bei der Erforschung der RA (Gregersen, 1997).

Der Einfluss von Hormonen auf Suszeptibilität und Ausprägung der Erkrankung zeigt sich in der Geschlechtsverteilung. Frauen vor der Menopause erkranken dreimal häufiger als Männer; nach der Menopause sind die Inzidenzen gleich. Ferner kommt es während Schwangerschaften oft zu Remissionen (Villiger und Brühlmann, 1999).

1.2.7 Verlauf und Prognose

Bei den meisten Patienten verläuft die rheumatoide Arthritis chronisch-progressiv und führt bei etwa einem Fünftel zu Invalidität. Bei 10–25% kommt es zu jahrelangen Vollremissionen (Harris, 2001a; Smolen und Steiner, 2003). Wovon der Verlauf der Erkrankung abhängt, lässt sich im einzelnen nicht vorhersagen, zuverlässige prädiktive Marker fehlen bislang. Als Risikofaktoren für einen aggressiveren Verlauf gelten jedoch weibliches Geschlecht, hochtitrige Rheumafaktorwerte im Serum, frühes Auftreten von Knochenerosionen und extraartikulären Manifestationen sowie initial hohe Werte für zirkulierende Immunkomplexe (Kaarela, 1985; Paimela *et al.*, 1995; Harris, 2001b). Als genetischer Prognoseparameter gilt das HLA-DR4-Allel: sein Nachweis ist mit einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert (Calin *et al.*, 1989).

1.3 Genetische Polymorphismen und Krankheitsdisposition

Für viele Krankheiten existieren prädisponierende genetische Faktoren. Dies konnte durch Familien- und Zwillingsuntersuchungen festgestellt werden. In einer dänischen Studie an Adoptivkindern wurde gezeigt, dass insbesondere Infektionskrankheiten und kardiovaskuläre Erkrankungen eine starke genetische Komponente haben und Umwelteinflüsse weniger als angenommen zur Mortalität beitragen (Sorensen *et al.*, 1988). Auch für Krebs- und Autoimmunerkrankungen scheinen genetische Faktoren eine wichtige Rolle zu spielen (Vyse und Todd, 1996; Risch, 2001; Botstein und Risch, 2003). Natürlich vorkommende Sequenzvariationen (Polymorphismen) im Genom tragen dabei wesentlich zur Krankheitssuszeptibilität für bei. Hierbei liegen 90% aller Polymorphismen als Variationen eines einzelnen Nukleotids („single nucleotide polymorphism“, SNP) vor (Collins *et al.*, 1998).

SNPs werden definiert als Positionen im Genom, an denen sich die DNA bei normalen Individuen in einer einzelnen Base unterscheidet. Hierbei tritt das seltenste Nukleotid mit einer Häufigkeit von 1% oder mehr auf (Nussbaum *et al.*, 2001). Durch die Ergebnisse des Human Genome Project und das Vorliegen einer Referenzsequenz hat die Forschung an genetischen Polymorphismen in den letzten Jahren, insbesondere die Untersuchung von Assoziationen von SNP mit verschiedenen Krankheiten, zunehmend an Interesse gewonnen. Inzwischen sind für viele verbreitete Krankheiten prädisponierende Polymorphismen bekannt (Botstein und Risch, 2003). Es konnte so z.B. gezeigt werden, dass homozygote Träger des Apolipoprotein-E4-Allels ein zehnfach höheres Risiko haben, an der Alzheimer Krankheit zu erkranken als Nichtträger des Allels (Strittmatter und Roses, 1995). Das Auftreten von Morbus Crohn ist assoziiert mit einem Polymorphismus im NOD2/CARD15-Gen und erhöht das relative Risiko auf 6.0 (Ogura *et al.*, 2001).

Genetische Polymorphismen können jedoch nicht nur zu Krankheiten prädisponieren, sondern auch davor schützen. In endemischen Malariagebieten tritt z.B. eine Vielzahl von Polymorphismen in Genen auf, die für Erythrozytenproteine kodieren. Diese Polymorphismen bieten einen Schutz vor schwerem Krankheitsverlauf oder Infektion und wurden deshalb in diesen Regionen im Laufe der Jahre selektiert (Fortin *et al.*, 2002).

Die SNP-Frequenz in genomischer DNA beträgt 1/1000 Basenpaare (bp), ist in kodierenden Exons aber um den Faktor vier geringer (Li und Sadler, 1991). Die Unterschiede einzelner Basen zwischen zwei Individuen summieren sich so auf mehrere Millionen Basenpaare in den Genomen und etwa 100 000 Aminosäurenunterschiede in ihren Proteomen. Es wird angenommen, dass SNPs für die Empfänglichkeit und Schwere einer Erkrankung eine bedeutende Rolle spielen. Eine direkte kausale Beziehung zwischen Polymorphismus und Krankheit ist hierbei selten, allerdings scheinen SNPs das Risiko des Auftretens einer Erkrankung zu beeinflussen. Dabei sind das gleichzeitige Vorhandensein mehrerer SNPs in Schlüsselgenen, verbunden mit Umweltfaktoren, vermutlich die entscheidenden Faktoren (Brookes, 1999).

1.3.1 Methoden zur SNP-Erkennung

Zum Nachweis von Polymorphismen einzelner Nukleotide stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die heute hauptsächlich eingesetzten Techniken sind PCR-basiert (Polymerase-Kettenreaktion, polymerase chain reaction) und ermöglichen eine unterschiedlich hohe Auflösung. Standardverfahren sind die Sequenzierung, die Untersuchung auf Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLPs), und der Einsatz von fluoreszenzmarkierten Sonden (TaqMan[®]-PCR, LightCycler[®]-PCR). Eine weitere Möglichkeit zur Analyse von SNPs stellt die massenspektrometrische Analyse von Primerextensionsprodukten dar (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) (Haff und Smirnov, 1997). Diese Methode erlaubt einen sehr hohen Probendurchsatz und wird in Zukunft insbesondere bei großen Genotypisierungsprojekten vermehrt zum Einsatz kommen.

1.4 Regulation der Immunantwort

1.4.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem

Der menschliche Organismus interagiert mit einer Vielzahl von Mikroorganismen. Um Infektionen und daraus resultierende Komplikationen zu verhindern, existiert ein komplexes Immunsystem, das die Unterscheidung pathogener und nichtpathogener Strukturen ermöglicht (Janeway *et al.*, 1999b). In höheren Wirbeltieren besteht es aus zwei Bereichen, dem angeborenen Immunsystem („innate immunity“) und dem adaptiven Immunsystem („adaptive immunity“). Das phylogenetisch ältere angeborene Immunsystem lässt sich bei allen mehrzelligen Organismen nachweisen (Hoffmann *et al.*, 1999). Das adaptive Immunsystem hat sich erst bei höheren Wirbeltieren ausgebildet. Beim Menschen sind beide Systeme durch ein komplexes System von Signalen miteinander verbunden und arbeiten bei der Krankheitsabwehr koordiniert zusammen, z.B. über die Rekrutierung der gleichen Effektorzellen. Das angeborene Immunsystem wird unmittelbar nach Eindringen von Pathogenen in den Körper aktiv und wirkt deren Wachstum und Ausbreitung im Anfangsstadium einer Infektion direkt entgegen. Komponenten des angeborenen Immunsystems sind u.a. Epithelien, die Barrierefunktionen wahrnehmen, das Komplementsystem, das zur Lyse von Mikroorganismen führt, und ein System zur Phagozytose von Pathogenen. Beteiligt

hieran sind insbesondere Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen (Akira und Hemmi, 2003).

Die Erkennung von Pathogenen wird durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems vermittelt, die als „pathogen recognition receptors“ (PRRs) bezeichnet werden. Zu den PRRs gehören CD14, der Macrophage Scavenger Receptor (MSR), Toll-like-Rezeptoren (TLRs) und Komplement-Rezeptoren (Gordon, 2002). Sie erkennen molekulare Muster oder Moleküle von Mikroorganismen („pathogen associated molecular patterns“, PAMPs). PAMPs sind vielen Bakterienarten gemeinsame Strukturen wie Lipopolysaccharide, Lipoteichonsäure, Peptidoglykane oder bakterielle DNA. Anders als der Begriff PAMP nahe legt, sind diese Strukturen sowohl auf pathogenen Mikroorganismen als auch auf Kommensalen zu finden. Nach Bindung von PAMPs an PRRs werden kostimulatorische Oberflächenmoleküle verstärkt exprimiert und Mediatoren ausgeschüttet, z.B. proinflammatorische Zytokine (Akira, 2003). Dies führt zur Aktivierung weiterer Komponenten des angeborenen Immunsystems und schließlich zur Antigenpräsentation, die eine antikörpervermittelte Immunantwort durch das adaptive Immunsystem einleitet (Medzhitov und Janeway, 1998b; Akira *et al.*, 2001).

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch hochspezifische Rezeptoren aus, die auf B- und T-Zellen exprimiert sind. T-Zellen sind für die zellvermittelte Immunantwort verantwortlich, interagieren mit antigenpräsentierenden Zellen und B-Zellen und nehmen regulatorische Aufgaben wahr. B-Zellen vermitteln die humorale Immunantwort durch Produktion von Antikörpern, die sezerniert werden und durch die Pathogene spezifisch erkannt werden. Das große Repertoire unterschiedlicher Rezeptoren entsteht durch somatische Rekombination der Immunglobulingene und der Gene des T-Zell-Rezeptors während der Entwicklung der unreifen Lymphozyten (Janeway *et al.*, 1999a). Im Gegensatz dazu sind die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems in den Keimzellen festgelegt und unterliegen keiner somatischen Rekombination (Medzhitov und Janeway, 1998b). Durch die Antigenpezifität und die klonale Expansion antigenspezifischer Zellen ermöglicht das adaptive Immunsystem eine sehr effektive Immunantwort, deren Aufbau mehrere Tage dauert, jedoch einen lang anhaltenden Schutz hinterlassen kann, was z.B. bei der Impfung ausgenutzt wird.

1.4.2 Toll-like-Rezeptoren

Toll wurde zuerst bei *Drosophila* als Gen beschrieben, das die dorso-ventrale Achsenbildung des Embryos kontrolliert (Anderson *et al.*, 1985). Es kodiert für einen so genannten Typ-1-transmembranären Rezeptor, dessen extrazelluläre Domäne leucinreiche Elemente enthält („leucine rich repeats“, LRR). Die intrazelluläre Domäne des Toll-Proteins weist Ähnlichkeiten zum Interleukin-1-Rezeptor auf und wurde daher Toll/IL-1R (TIR)-Domäne genannt (Dunne und O'Neill, 2003). Wegen dieser Ähnlichkeit wurde eine immunologische Funktion von Toll vermutet und konnte in einer Untersuchung an *Drosophila*-Mutanten gezeigt werden. Adulte Fliegen mit defektem Toll-Rezeptor können keine wirksame Immunantwort gegen Pilzinfektionen aufbauen, da das antifungale Peptid Drosomycin nicht exprimiert wird (Lemaitre *et al.*, 1996).

Zu Toll homologe Strukturen können bei Pflanzen, Insekten und Wirbeltieren gefunden werden (Takeuchi und Akira, 2002). Medzhitov *et al.* charakterisierten 1997 einen strukturell verwandten Rezeptor, der an der Immunantwort des Menschen beteiligt ist. Dieser Rezeptor erkennt Lipopolysaccharide Gram-negativer Bakterien (Medzhitov *et al.*, 1997). Wegen der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit zum Toll-Protein von *Drosophila* wurde er als Toll-like-Rezeptor bezeichnet und wird heute TLR4 genannt. Bislang konnten 11 Rezeptoren aus der Familie der TLRs kloniert werden (Takeda *et al.*, 2003; Heil *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004).

Die Signaltransduktion von Toll, IL-1R und TLR weist weitere Ähnlichkeiten auf (Abb. 2). Nach Bindung des Rezeptorliganden wird eine Signalkaskade ausgelöst, die bei TLR und IL-1R über Adaptermoleküle zur Phosphorylierung des inhibitorischen I κ B führt. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird freigesetzt, in den Zellkern transloziert und induziert die Expression verschiedener Gene, die an immunologischen, inflammatorischen und apoptotischen Prozessen beteiligt sind. Bei *Drosophila* erfolgt die Signaltransduktion über das I κ B-Homolog „Cactus“ sowie das NF- κ B-Homolog „Dorsal“ (Dunne und O'Neill, 2003).

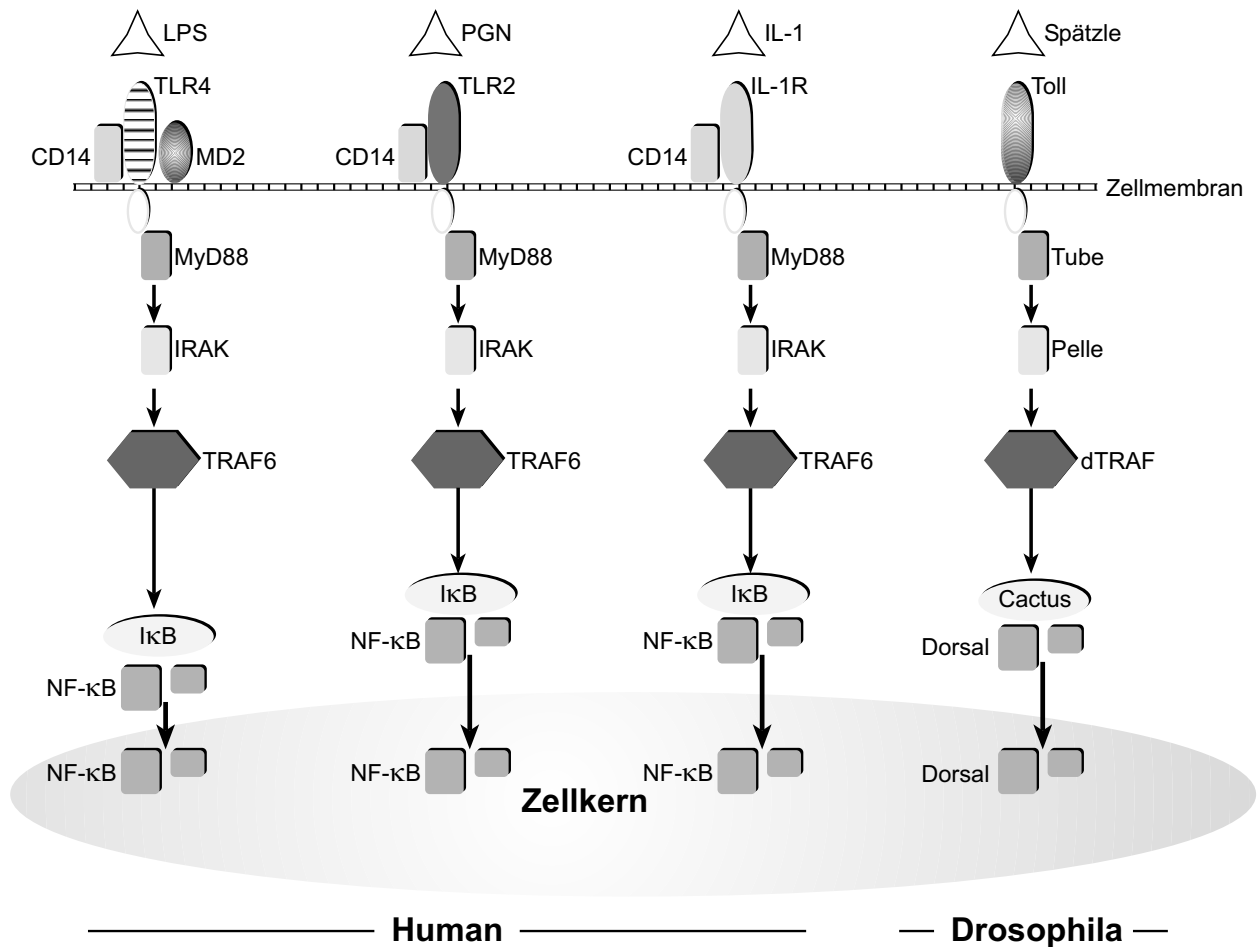


Abb. 2: Signaltransduktion bei IL-1R/TLR/Toll (nach Dunne und O'Neill, 2003)
 Nach Bindung eines Liganden (z.B. LPS) kommt es über mehrere Adaptermoleküle zur Aktivierung eines Transkriptionsfaktors (NF-κB oder Dorsal), der die Expression verschiedener Gene induziert. Interleukin (IL), IL-1 receptor-associated kinase (IRAK), tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6), Inhibitor von κB (IκB), nuclear transcription factor κB (NF-κB), Peptidoglykan (PGN), IL-1-Rezeptor (IL-1R), Adapterproteine MD-2 und MyD88, Lipopolysaccharid (LPS)

TLRs sind in den verschiedenen Geweben unterschiedlich exprimiert. In den meisten Geweben kann mindestens ein TLR nachgewiesen werden, die Expression auf Leukozyten ist besonders hoch (Zarembler und Godowski, 2002). Auch innerhalb einer Zellart kann die Expression variieren: bei den dendritischen Zellen nimmt die Expression von TLR1, TLR2, TLR4 und TLR5 mit der Reifung der Zellen ab; TLR3 wird nur auf ausgereiften dendritischen Zellen exprimiert (Muzio *et al.*, 2000; Visintin *et al.*, 2001). Die von den Toll-like-Rezeptoren erkannten PAMPs sind in der Regel Bestandteile von Mikroorganismen und kommen nicht bei Wirbeltieren vor. Dem TLR-System kommt damit eine wichtige Rolle in der Unterscheidung von körperfremden und körpereigenen Stoffen zu (Janeway und Medzhitov, 2002). Diese Unterscheidung ist jedoch nicht

vollständig, einzelne TLRs erkennen auch endogene Liganden, z.B. Hitzeschockproteine (HSP) oder synthetische Substanzen, wie Imidazoquinoline. Die wichtigsten TLRs und ihre Liganden sind in Tab. 1 aufgeführt, TLR2 und TLR9 werden im Folgenden ausführlicher beschrieben.

Tab. 1: TLRs mit ihren wichtigsten Liganden (modifiziert nach Takeda et al, 2003)

TLR	Liganden	Herkunft
TLR1	Triacyl-Lipopeptide	Bakterien, Mykobakterien
TLR2	Peptidoglykane	Gram-positive Bakterien
	Lipoproteine/Lipopeptide	Bakterien u.a. Pathogene
	Lipoteichonsäure (LTA)	Gram-positive Bakterien
	Porine	Neisserien
	Glykolipide	Spirochäten
	Zymosan	Hefe
	GPI-Anker	Trypanosoma cruzi
	Outer membrane Protein A	Klebsiellen
	HSP70	Wirt
TLR3	Doppelsträngige RNA	Viren
TLR4	Lipopolysaccharid	Gram-negative Bakterien
	F-Protein	RSV
	Taxol	Pflanzen
	HSP60	Wirt
	HSP70	Wirt
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR6	Di-Acyl Lipopeptide	Mykoplasmen
TLR7	Imidazoquinolin	Synthetisch
	Loxribin	Synthetisch
	Bropirimin	Synthetisch
	Einzelstrang-RNA	Viren
TLR8	Einzelstrang-RNA	Viren
TLR9	CpG-DNA	Bakterien
TLR11	Uropathogene <i>E. coli</i>	Uropathogene <i>E. coli</i>

1.4.2.1 Toll-like-Rezeptor 2

Für den Toll-like-Rezeptor 2 ist im Vergleich mit anderen TLRs die größte Anzahl von Liganden bekannt. Darunter befinden sich Lipoproteine von Mykoplasmen, Spirochäten und Gram-negativen Bakterien, Lipoarabinomannan von Mykobakterien, Glykoinositol-

phospholipidanker von *Trypanosoma cruzi*, Zymosan von Hefen, atypisches LPS von *Leptospira interrogans* oder *Porphyromonas gingivalis* und andere (Kirschning und Schumann, 2002). Insbesondere an der Immunantwort auf Gram-positive Bakterien, die kein LPS bilden, ist TLR2 beteiligt. Die Zellwand Gram-positiver Keime enthält Peptidoglykan (PGN) mit LTA und Lipoproteinen. Diese PAMPs lösen nach Bindung an TLR2 eine Immunantwort in Wirtszellen aus. Bei TLR2-defizienten Mäusen bleibt diese Immunreaktion aus, sie können keine wirkungsvolle Immunantwort auf Gram-positive Keime generieren (Takeuchi *et al.*, 1999).

Die Vielzahl der durch TLR2 erkannten Strukturen wird unter anderem durch Bildung von Heterodimeren mit anderen Rezeptoren erreicht, so interagiert TLR2 mit TLR6 zur Erkennung von PGN und Zymosan (Ozinsky *et al.*, 2000). Auch mit TLR1 kann TLR2 Heterodimere zur Erkennung von z.B. löslichen Faktoren aus *N. meningitidis* bilden (Wyllie *et al.*, 2000).

TLR2 wird auf Zellen des Immunsystems exprimiert, in erster Linie auf Monozyten und B-Zellen, in geringerem Maße auch auf Mastzellen, T-Lymphozyten und NK-Zellen (natural killer cells). Das TLR2-Gen wurde auf dem langem Arm des Chromosoms 4 lokalisiert (4q32). Es besteht aus zwei Exons, die gesamte kodierende Sequenz befindet sich jedoch auf Exon 2 und umfasst 2,3 kb (Chaudhary *et al.*, 1998; Rock *et al.*, 1998).

1.4.2.2 Toll-like-Rezeptor 9

TLR9 ist ein Rezeptor, der bakterielle DNA erkennt (Hemmi *et al.*, 2000). DNA wurde lange Zeit für immunologisch inert gehalten, jedoch konnte inzwischen sowohl eine immunostimulatorische Wirkung von DNA nachgewiesen, als auch TLR9 als sein Rezeptor identifiziert werden (Krieg, 1995; Stacey *et al.*, 1996; Sparwasser *et al.*, 1997; Hemmi *et al.*, 2000).

TLR9 erkennt dabei spezifisch unmethylierte CpG-haltige Oligonukleotide (Bauer *et al.*, 2001). Dies sind CG-Dinukleotide innerhalb einer bestimmten Sequenz, des CpG-Motivs. Diese unmethylierten CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN) wirken immunstimulatorisch und kommen häufig in bakterieller DNA vor (Krieg *et al.*, 1995). Im menschlichen Genom hingegen sind CpG-Oligonukleotide selten und überwiegend methyliert.

TLR9 wird im menschlichen Organismus in B-Zellen, plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC) und Makrophagen exprimiert und ist ferner in einigen Kolonepithelzelllinien und in Leberzellen nachweisbar (Bauer *et al.*, 2001; Akhtar *et al.*, 2003; Latz *et al.*, 2004).

CpG-ODN führen zur Reifung und zu einer sehr starken Aktivierung dendritischer Zellen. Damit verbunden ist die Heraufregulierung von kostimulatorischen Rezeptoren und die Expression von Zytokinen wie IL-12 und IL-18, was einer Immunantwort vom T_H1-Typ entspricht (Takeda *et al.*, 2003). CpG-DNA ist ein potentes Adjuvans, schon die alleinige Gabe von bakterieller DNA oder von CpG-ODN bewirkt durch Ausschüttung inflammatorischer Zytokine eine so starke Immunantwort, dass Mäuse gegen eine Infektion mit intrazellulären Pathogenen wie *Listeria monocytogenes* oder *Leishmania major* geschützt sind (Elkins *et al.*, 1999). Ein therapeutischer Einsatz von CpG-DNA zur Vakzinierung sowie bei infektiösen, atopischen und chronisch-entzündlichen Erkrankungen wird zur Zeit untersucht (Lipford *et al.*, 1997; Krieg *et al.*, 1998; Krieg und Wagner, 2000).

Im Gegensatz zu den anderen TLRs scheint für TLR9 die Aufnahme und endosomale Reifung von CpG-DNA notwendig, um seine immunologischen Effekte zu bewirken. Chloroquin und andere Substanzen, die die Ansäuerung von Endosomen inhibieren, unterbrechen die TLR9-Signaltransduktion (Hacker *et al.*, 1998). Kürzlich konnte ferner gezeigt werden, dass CpG-DNA und TLR9 in dendritischen Zellen und Makrophagen kolokalisieren (Latz *et al.*, 2004).

Das für TLR9 kodierende Gen wurde auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 lokalisiert (3p21.3). Es werden verschiedene Splicevarianten angegeben (Chuang und Ulevitch, 2000; Du *et al.*, 2000). Die Regulation von TLR9 ist bislang wenig erforscht, LPS, CSF-1 und IFN- γ scheinen hierbei eine Rolle zu spielen (An *et al.*, 2002; Sweet *et al.*, 2002). Der Promotorbereich von TLR9 wurde bislang nicht charakterisiert.

Eine weitere mögliche Rolle für TLR9 wird auch bei viralen Erkrankungen gesehen, z.B. bei der Erkennung des Herpes-simplex-Virus (Krug *et al.*, 2003; Lund *et al.*, 2003) und bei der Induktion von HIV-1 (Agrawal und Martin, 2003; Equils *et al.*, 2003).

1.4.2.3 Genetische Polymorphismen in TLR-Genen

Durch die Schlüsselstellung der Toll-like-Rezeptoren im angeborenen und adaptiven Immunsystem haben genetische Variationen in TLR-Genen einen Einfluss auf Immunabwehr und Pathogenese inflammatorischer Krankheiten.

Ein Polymorphismus im TLR2-Gen wurde z.B. mit einem höheren Risiko für Staphylokokkeninfektionen assoziiert (Lorenz *et al.*, 2000). Der zugrunde liegende SNP (G2408A) liegt im kodierenden Bereich des TLR2-Gens und führt zum Aminosäureaustausch von Arginin 753 zu Glutamin. Zwei Polymorphismen im TLR4-Gen führen ebenfalls zu einem Aminosäurewechsel, von Aspartat (Asp) 299 zu Glycin (Gly) und von Threonin (Thr) 399 zu Isoleucin (Ile). Der Asp299Gly-Polymorphismus erhöht das Risiko für bakterielle Infektionen und senkt das Risiko für Atherosklerose der Karotiden (Kiechl *et al.*, 2002). Der Thr399Ile-Austausch prädisponiert für Sepsis und Infektionen mit Gram-negativen Bakterien (Lorenz *et al.*, 2002). Für TLR2 und TLR4 sind inzwischen viele weitere Polymorphismen entdeckt und in der SNP-Database des National Center for Biotechnology Information (NCBI) hinterlegt.

Durch die erst kürzer zurückliegende Entdeckung von TLR9 und seiner Klonierung ist bis jetzt wenig über TLR9-SNPs und Krankheitsassoziationen bekannt. Die Untersuchung auf Polymorphismen in diesem Rezeptor ist durch den Umstand erschwert, dass die Genstruktur noch nicht endgültig aufgeklärt ist und verschiedene Angaben über Gengröße und Splicevarianten publiziert sind (Chuang und Ulevitch, 2000; Du *et al.*, 2000). Mehrere SNPs sind in TLR9 beschrieben (Abb. 3), doch konnte bis jetzt erst ein SNP mit einer Krankheit assoziiert werden, der T-1237C-Polymorphismus, der im potentiellen Promotorbereich liegt und mit einem erhöhten Risiko für Asthma bei Europäern einhergeht (Lazarus *et al.*, 2003).

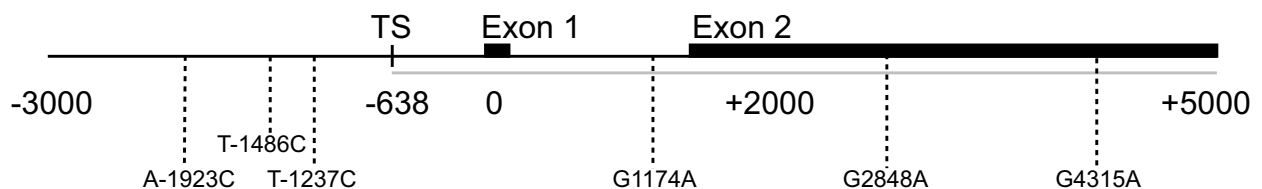


Abb. 3: Das TLR9-Gen mit einer Auswahl von SNPs
 Der Austausch der Basen ist gekennzeichnet, die Lage der SNPs ist jeweils relativ zum Translationsstart (Startcodon=0) angegeben. Der Transkriptionsstart (TS) liegt bei -638 bp (nach Lazarus *et al.*, 2003).

1.5 Rheumatoide Arthritis und das angeborene Immunsystem

Die meisten Autoren gehen von RA als einer Autoimmunerkrankung aus, die durch eine Fehlregulation des adaptiven Immunsystems bedingt ist (Firestein, 2003). Diese These wird durch viele Forschungsergebnisse gestützt. Wie andere Autoimmunerkrankungen tritt RA bei Frauen gehäuft auf, und es scheint ein systemischer Prozess zugrunde zu liegen, da mehrere Gelenke betroffen sind (Harris, 2001a). Es findet eine Immunreaktion gegen körpereigene Strukturen statt und Autoantikörper werden gebildet, z.B. der Rheumafaktor, der sich gegen den Fc-Teil des Immunglobulins richtet (s.1.2.3). Das Synovium wird von aktivierten Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen infiltriert. Die T-Zellen in RA-Patienten sind zum proinflammatorischen Typ T_H1 polarisiert und proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6 überwiegen. Ein spezifisches Autoantigen, das zur Auslösung oder Aufrechterhaltung der Gelenkentzündung führt, konnte bisher jedoch nicht identifiziert werden.

Der Großteil der Untersuchungen der letzten Jahrzehnte konzentrierte sich auf Mechanismen des adaptiven Immunsystems bei der Pathogenese der RA. Nach neueren Ergebnissen könnte jedoch das angeborene Immunsystem eine bedeutende Rolle bei der Auslösung der RA spielen. Viele Forscher halten ein zweistufiges Modell für möglich, nach dem sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem beteiligt sind (Firestein, 2003; Smolen und Steiner, 2003). Die initiale Gelenkentzündung könnte durch ein Fremdartigen hervorgerufen werden, z.B. durch Mikroorganismen oder deren Produkte. Diese Entzündung könnte sich durch Beteiligung des adaptiven Immunsystems unter bestimmten Voraussetzungen wie z.B. das Vorliegen eines bestimmten HLA-DR-Typs in einen selbstunterhaltenden Prozess weiterentwickeln (Ebringer und Wilson, 2000; Firestein, 2003).

Den Toll-like-Rezeptoren als wesentlicher Komponente des angeborenen Immunsystems scheint bei der Induktion der initialen Inflammation eine wichtige Rolle zukommen. Insbesondere TLR2 und TLR9 könnten an der Pathogenese der RA beteiligt sein. So konnte der TLR9-Ligand CpG-DNA als möglicher Auslöser von Arthritis identifiziert werden (Deng *et al.*, 1999). Die intraartikuläre Gabe von CpG-DNA führt zu starker TNF- α -Ausschüttung und schließlich zur CpG-vermittelten Arthritis. Der Einsatz von synthetischen, suppressiv wirkenden Oligonukleotiden hingegen kann die CpG-induzierte Immunaktivierung und TNF- α -Ausschüttung hemmen und vor Auslösung einer Arthritis schützen (Zeuner *et al.*, 2002). In den Gelenken der meisten

RA-Patienten konnte DNA unterschiedlicher Pathogene isoliert werden (Schaeffer *et al.*, 1997; van der Heijden *et al.*, 2000).

Auch nach einer anderen These könnten TLRs bei der Auslösung von Autoimmunität und damit auch der RA beteiligt sein: Mikrobielle Infektion mit folgender Gewebnekrose und Inflammation können die Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen auf ruhenden antigenpräsentierenden Zellen bewirken und damit zum Verlust der T-Zell-Anergie beitragen. Zusätzlich kann die Entzündungsantwort die Präsentation von dem Immunsystem sonst verborgenen Antigenen ermöglichen und damit zum „epitope spreading“ beitragen (Craft und Fatenejad, 1997; Cotran *et al.*, 1999b).

Auch TLR-Liganden außerhalb des Gelenks könnten zur Pathogenese der RA beitragen. In einem Mausmodell für RA konnte gezeigt werden, dass TLR9 an der Induktion der Rheumafaktorproduktion durch autoreaktive B-Zellen beteiligt ist (Leadbetter *et al.*, 2002). Immunkomplexe, die Wirts-DNA enthalten, werden vermutlich von B-Zellen an ihrem Antigenrezeptor gebunden. Nach Bindung des Wirts-DNA-haltigen Teils des Immunkomplexes an TLR9 und endosomaler Aufnahme wird die autoreaktive B-Zelle aktiviert und produziert RF. Die Aktivierung der B-Zelle kann durch den TLR9-Inhibitor Chloroquin blockiert werden. Unterstützt wird diese Theorie dadurch, dass Chloroquin seit langem erfolgreich in der Basistherapie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt wird. Wirts-DNA könnte dieser Untersuchung zufolge ein pathogener Faktor bei der Auslösung von RA sein. Normalerweise ist Wirts-DNA nicht immunstimulatorisch, die CpG-Elemente im menschlichen Genom sind überwiegend methyliert und können TLR9 daher nicht aktivieren. Bei RA und systemischem Lupus erythematoses (SLE) konnte aber gezeigt werden, dass die DNA-Methylierung herabgesetzt ist (Richardson *et al.*, 1990). Dies könnte auch erklären, warum viele Autoantikörper in Autoimmunerkrankungen sich gegen DNA-haltige Strukturen wie Chromatin oder andere Nukleinsäure-Protein-Partikel richten. Des Weiteren können Autoimmunerkrankungen durch Medikamente induziert werden, die die DNA-Methylierung inhibieren (Yung *et al.*, 1995).

Auch für die Beteiligung von TLR2 an der Pathogenese der RA gibt es Hinweise. Neben bakterieller DNA wurde der TLR2-Ligand Peptidoglykan in Gelenken von RA-Patienten nachgewiesen (van der Heijden *et al.*, 2000), jedoch fehlen in dieser Studie Daten über das Vorliegen von Peptidoglykan in Gelenken Gesunder. Die Expression von TLR2 in synovialen Fibroblasten von RA-Patienten konnte gezeigt werden, besonders ausgeprägt an Stellen der Invasion in Knorpel oder Knochen (Seibl *et al.*, 2003). In

gesunden Kontrollpatienten ist die TLR2-Expression dagegen deutlich schwächer ausgeprägt und es konnten keine Stellen lokal hoher Expression gefunden werden. Die TLR2-Expression in synovialen Fibroblasten ist regulierbar; nach Gabe von Peptidoglykanen werden sowohl TLR2-mRNA heraufreguliert, als auch die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 ausgeschüttet und Integrine und Matrix-Metalloproteinase verstärkt exprimiert (Kyburz *et al.*, 2003). Dieses Ergebnis könnte auch die Beobachtung erklären, dass intraartikulär verabreichte Peptidoglykane zu Arthritis führen können (Liu *et al.*, 2001). Auch die Regulation von TLR9 an synovialen Fibroblasten wurde untersucht (Kyburz *et al.*, 2003) und es konnten keine Veränderungen in der TLR9-Expression nach Stimulation mit CpG-ODN gefunden werden. Dieses Ergebnis ist jedoch übereinstimmend mit der Beobachtung, dass CpG-DNA als Ligand die Expression seines eigenen Rezeptors auch in anderen Zellen nicht hochreguliert, sondern senkt (Hornung *et al.*, 2002).

2 Aufgabenstellung

Die genetische Komponente bei der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis ist gesichert, außer den Genen des HLA-DR bleibt jedoch der Großteil der hieran beteiligten Gene bisher weithin unbekannt. Die Identifizierung neuer genetischer Faktoren könnte wertvolle Hinweise für die Einteilung in Risikogruppen, Krankheitsverlauf und Therapie der RA geben. Für die wichtige Rolle des angeborenen Immunsystems und insbesondere der Toll-like-Rezeptoren in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis gibt es viele Hinweise. Insbesondere TLR2 und -9 scheinen hieran beteiligt. Polymorphismen in diesen Rezeptoren disponieren zu chronisch-inflammatorischen und infektiösen Krankheiten und könnten daher auch zur Pathogenese der RA entscheidend beitragen. Bisher ist der Zusammenhang zwischen Polymorphismen in TLR-Genen und dem Auftreten von RA kaum analysiert worden. Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit existierte keine Studie, die den Zusammenhang zwischen TLR-Polymorphismen und der Empfänglichkeit für RA untersucht hat.

Aus diesem Grund sollte die Assoziation von Polymorphismen in TLR2 und TLR9 und dem Auftreten von RA und der Produktion von Rheumafaktor analysiert werden. Dies sollte beim G2408A-Polymorphismus im TLR2-Gen untersucht werden (Lorenz *et al.*, 2000). Basierend auf der Veröffentlichung von Lazarus *et al.* (2003) sollte dies weiterhin bei den TLR9-Polymorphismen T-1486C und T-1237C analysiert werden.

Zur Beantwortung der Fragestellung nach der Assoziation von TLR2- und TLR9-Polymorphismen mit dem Auftreten von RA sollten folgende Aufgaben bearbeitet werden:

- Computerbasierte Analyse der TLR9-SNPs auf Transkriptionsfaktorbindungsstellen
- Entwicklung und Validierung eines Verfahrens zur Detektion der TLR9-Polymorphismen
- Bestimmung der Häufigkeiten der TLR9- und TLR2-Polymorphismen bei RA-Patienten und Gesunden mittels des neu zu entwickelnden Verfahrens (TLR9) sowie eines für TLR2 etablierten Verfahrens (Schroder *et al.*, 2003)
- Analyse der Assoziation der TLR2- und TLR9-Polymorphismen mit dem Auftreten von RA und der Produktion von Rheumafaktor mittels geeigneter statistischer Methoden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Patientenproben

Die Proben der RA-Patienten wurden an der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie der Charité gesammelt, asserviert und die klinischen Parameter bestimmt. Es handelt sich um 118 Berliner Patienten (29 männlich, 89 weiblich, Durchschnittsalter 56,2 Jahre, Standardabweichung 13,3 Jahre) mit rheumatoider Arthritis, deren Diagnose nach den Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) gesichert war und die einen ACR-Score von vier oder mehr aufwiesen (s. 1.2.4). Bei 95 Patienten wurde der Rheumafaktor mittels ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) der Firma HYCOR (Autostat II RF) im Serum gemessen. Das Patientenkollektiv spiegelt sowohl in der Geschlechtsverteilung (weiblich:männlich=3:1) als auch bei der RF-Seropositivität (23% RF-negativ, 77% RF-positiv) die allgemeinen epidemiologischen Charakteristika der RA-Erkrankung wieder.

Patienten mit juveniler rheumatoider Arthritis oder anderen Arthritiden wurden ausgeschlossen. Ein zu unserer Studie ähnliches Grundkollektiv ist bereits von Stuhlmüller *et al.* in einer Studie zur Genaktivierung von Monozyten bei RA-Patienten beschrieben (Stuhlmüller *et al.*, 2000). Die DNA-Isolierung erfolgte aus Vollblut oder Gewebeproben durch Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Präzipitation im Labor der Arbeitsgruppe Dr. Stuhlmüller/Dr. Häupl an der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie der Charité. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité genehmigt und die Patienten haben ihr schriftliches Einverständnis zu Probenentnahme und Analyse der Proben erteilt.

Als Vergleichskollektiv dienten Proben von gesunden Freiwilligen aus Berlin und Konstanz, die Teilnehmer einer Studie des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene zu TLR-Polymorphismen sind. Jedem RA-Patient wurde eine randomisierte Kontrollprobe eines Gesunden des gleichen Geschlechts zugeordnet. Die Randomisierung erfolgte über Zufallszahlen, die nach Mads Haahr/University of Dublin (www.random.org) generiert wurden. Die Kontrollgruppe umfasste 118 Gesunde, davon 67 aus Berlin und 51 aus Konstanz. Das Durchschnittsalter betrug 44,1 Jahre (Standardabweichung 14,4). Die Proben sind bereits teilweise auf TLR2- und TLR4-Polymorphismen genotypisiert worden (Schroder *et al.*, 2003; von Aulock *et al.*, 2003). Die DNA-Isolierung erfolgte aus Vollblut (Proben aus Konstanz) oder aus Abstrichen der Wangenschleimhaut (Berlin) mittels des QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen).

3.2 Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien im höchsten Reinheitsgrad bezogen. Standardchemikalien wie Ethanol werden nicht aufgeführt.

Agarose, Standard	Roth, Karlsruhe
Agarose, low melt	Biozym, Hess. Oldendorf
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs (NEB), Beverly, USA
Deoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	Roche, Mannheim
DNA-Längenmarker	NEB, Beverly, USA
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Fluka, Deisenhofen
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phenol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Glykogen	Beckman Coulter, Fullerton, USA
TE-Stocklösung	Roth, Karlsruhe
TRIS	Roth, Karlsruhe

3.3 Enzyme

Polymerasen

TaqDNA Polymerase	Qiagen, Hilden
Thermoprime Plus PCR Polymerase	Abgene, Epsom, UK
Gentherm Taq	Rapidozym, Berlin
FastStart DNA Master Hybridization Probes	Roche, Mannheim

Restriktionsenzyme

Aci I	NEB, Beverly, USA
Afl II	NEB, Beverly, USA
BstNI	NEB, Beverly, USA

3.4 Puffer

5x TBE	54 g/l	TRIS-Base	Roth, Karlsruhe
	27,5 g/l	Borsäure	Roth, Karlsruhe
	20 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)	Roth, Karlsruhe

3.5 Synthetische Oligonukleotide

Alle Primer und Sonden wurden von der Firma MWG Biotech/Ebersbach oder TIB-MOLBIOL/Berlin synthetisiert, HPSF- oder HPLC- gereinigt und als Lyophilisat geliefert. Das Lyophilisat wurde in Aqua dest. gelöst, eine Stammlösung von 100 pmol/μl hergestellt und bei -20°C gelagert. Aus der Stammlösung wurden Aliquots in der Gebrauchskonzentration von 10 pmol/μl (Primer) oder 4 pmol/μl (Sonden) hergestellt.

Tab. 2: Primer für Standard-PCR

<i>TLR-2 Genotypisierung, GenBank acc. no.: NM003264</i>	
TLR2 combi forward	5'-GCCTACTGGGTGGAGAACCT-3'
TLR2 combi reverse	5'-GGCCACTCCAGGTAGGTCTT-3'
<i>TLR 9 Genotypisierung, Genbank acc. no.: NM_017442</i>	
TLR9-sense (TLR9s)	5'-TCCCAGCAGCAACAATTCATTA-3'
TLR9-forward (TLR9F)	5'-ATGGGAGCAGAGACATAATGGA-3'
TLR9-antisense (TLR9as)	5'-CTGCTTGCAGTTGACTGTGT-3'

Tab. 3: Primer für real-time-PCR

<i>TLR-2, Genotypisierung, GenBank acc. no.: NM003264</i>	
TLR2-sense (TLR2s)	5'-AGTGAGCGGGATGCCTACT-3'
TLR2-antisense (TLR2as)	5'-GACTTTATCGCAGCTCTCAGATTTAC-3'
<i>TLR-9, Genotypisierung, Genbank acc. no.: NM_017442</i>	
TLR9-sense (TLR9s)	5'-TCCCAGCAGCAACAATTCATTA-3'
TLR9-antisense (TLR9as)	5'-CTGCTTGCAGTTGACTGTGT-3'

Tab. 4: Sonden für real-time-PCR

Fluoreszenz (FL), LightCycler Red-640 (LC Red640), LightCycler Red-705 (LC Red705)

<i>TLR-2, SNP ID: rs5743708 (G2408A)</i>	
TLR2-sensor	5'-CAAGCTGCAGAAGATAATGAACACCAAG-3'-FL
TLR2-anchor	LC Red640-5'-CCTACCTGGAGTGGCCCATGGACG-3'
<i>TLR-9, SNP ID: 1. rs5743836 (T-1237C) und 2. rs187084 (T-1486C)</i>	
TLR9-sensor-1	5'-GGAGTTTCCAGGCAGAGG-3'-FL
TLR9-anchor-1	LC Red705-5'-ACAGCACATCCCAAGGCCCT-3'
TLR9-sensor-2	5'-ATCACTGCCCTCAAGAAGCT-3'-FL
TLR9-anchor-2	LC Red640-5'-ACATTCCAGCAGGGGAATAAGACGATA-3'

3.6 Kitsysteme

CEQ Sequencing Kit	Beckman Coulter, Fullerton, USA
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

3.7 Einwegmaterialien

Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg Biozym, Hess. Oldendorf Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Roth, Karlsruhe Eppendorf, Hamburg
LightCycler® Kapillaren	Roche, Mannheim

3.8 Geräte

Kühlzentrifuge Centrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage BA200	Sartorius, Göttingen
Gelelektrophoreseanlage	Biorad, Hercules, USA
Kamera CF 1/8 FMC CCD, Eagleeye	Stratagene, La Jolla, USA

Kapillarsequencer CEQ8000	Beckman Coulter, Fullerton, USA
LightCycler®	Roche, Mannheim
Speed Vac Uni Vapo 100H	Uniequip, Martinsried
Spektrophotometer Bio	Eppendorf, Hamburg
Steril-Arbeitsbank Antair BSK	Anthos, Siegburg
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Centrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge L8-70M	Beckman Coulter, Fullerton, USA

3.9 Software

Zum Design von Oligonukleotiden wurde das Programm Primer3 des Whitehead Institute, Cambridge/USA eingesetzt (Rozen und Skaletsky, 2000). Die Analyse auf Transkriptionsfaktorbindungsstellen erfolgte mittels der Software Alibaba2 (Grabe, 2002). Für nichtparametrische Tests und Häufigkeitsberechnungen wurde das Programm SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) eingesetzt. Die Berechnung der Odds Ratio, der p-Werte (Fisher's Exact Test und chi-Quadrat-Test) erfolgte mit der Epiinfo-Software (CDC, The Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA) sowie mit StatXact 6 (Cytel Software Corporation, Cambridge, USA).

3.10 Molekularbiologische Methoden

3.10.1 Isolierung von DNA durch Phenol-/Chloroform-/Isoamylextraktion und Ethanolpräzipitation

Die Aufreinigung der DNA aus dem Nukleinsäure/Protein-Gemisch erfolgte durch Extraktion mittels Phenol-/Chloroform-/Isoamylalkohol. Die in RLT-Puffer (Qiagen, Hilden) gelösten und eingefrorenen Leukozyten oder Gewebeproben wurden hierzu mit einem äquimolaren Teil Phenol-/Chloroform-/Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) überschichtet und 30 min mittels eines Rotators gemischt. Das entstandene Gemisch wurde für 5 min bei 14 000 U/min in der Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert, die obere Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die letzten DNA-Reste vollständig zu isolieren, wurde die untere Phase des Zentrifugats mit TE-Puffer überschichtet, erneut wie beschrieben gemischt und zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert.

Die erhaltenen Überstände wurden nun mit 0,1 Volumenteilen 3 M Natriumacetat und 2 Volumenteilen 99,8% Ethanol gemischt und für mindestens 30 min bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 min und 14 000 U/min bei 4°C wurde der Überstand dekantiert, die DNA-Pellets mit $900\ \mu\text{l}$ 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 3 min bei 14 000 U/min zentrifugiert. Der überschüssige Alkohol wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen, das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in $200\ \mu\text{l}$ TE-Puffer aufgenommen.

3.10.2 Genotypisierung durch Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) und Hybridisierungssonden

Die RFLP-Analyse beruht auf dem Prinzip, dass durch einen Nukleotidaustausch Schnittstellen für Restriktionsenzyme wegfallen oder geschaffen werden. Nach einer Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) mit sequenzspezifischen Primern wird das PCR-Produkt mit einem Restriktionsenzym verdaut und anschließend auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anhand des Bandenmuster bzw. der Fragmentlängen können die Proben genotypisiert werden.

Neuere Methoden wie der 5'Nuklease-Assay (TaqMan[®]-PCR) oder Hybridisierungssonden (LightCycler[®]-PCR) ermöglichen die Mutationsanalyse in einer einzigen Reaktion ohne weitere Nachbearbeitung der Proben. Bei beiden Verfahren wird eine PCR durchgeführt, jedoch werden zusätzlich zu den Primern sequenzspezifische fluoreszenzmarkierte Sonden eingesetzt, die mit den gebildeten PCR-Produkten hybridisieren. Das LightCycler-Verfahren ist eine der schnellsten Methoden zur SNP-Analyse. Der LightCycler ist ein Thermocycler mit integriertem Fluorimeter (Wittwer *et al.*, 1997). Wie in der Standard-PCR erfolgt eine Amplifikation von DNA oder RNA (template), es werden dazu sequenzspezifische Primer und eine Polymerase eingesetzt. Im Gegensatz zur konventionellen PCR erfolgt die Reaktion in Glaskapillaren, die lichtdurchlässig sind und durch die große Oberfläche schnelle Heiz- und Abkühlgeschwindigkeiten ermöglichen und somit die Reaktionsdauer verkürzen.

Zur Genotypisierung von Proben werden Hybridisierungssonden eingesetzt („hybridization probes“), die aus zwei Oligonukleotiden bestehen und mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (Anker- und Sensorsonde). Die Sensorsonde ist mit Fluoreszein am 3'-Ende markiert, die Ankersonde mit LightCyclerRed640 oder LightCyclerRed705 am 5'-Ende. Die Sonden binden nach Denaturierung an den komplementären Strang des sich bildenden PCR-Produkts zwischen den Primern (Abb. 4a). Binden Anker- und Sensorsonde nebeneinander (≤ 5 Basenpaare) und werden sie durch einen Lichtimpuls angeregt, emittiert die Sensorsonde ein Lichtsignal von 530 nm, das den Farbstoff der Ankersonde anregt und zur Emission eines zweiten Signals führt (640 oder 705 nm), das vom LC-Gerät gemessen wird (Abb. 4b). Die Sensorsonde wird daher als Donor-Fluorophor, die Ankersonde als Akzeptor-Fluorophor bezeichnet. Die Anregung des Akzeptor-Fluorophors durch den Donor-Fluorophor wird als „Fluorescence Resonance Energy Transfer“ (FRET) bezeichnet und kann nur bei Bindung der Sonden unmittelbar nebeneinander erfolgen. Dies verhindert die Anregung freier Sonden und damit eine Fehlbestimmung. Mit zunehmender Zyklenzahl wird mehr Amplifikat gebildet, mehr Sonden können binden und die Fluoreszenzintensität steigt proportional zur Menge des entstandenen PCR-Produktes. Dies ermöglicht die Quantifizierung des PCR-Produktes in Echtzeit („quantitative real time PCR“).

Im Anschluss an die PCR wird eine Schmelzkurve erstellt. Dazu wird von einem Ausgangswert von 45-60 °C die Temperatur kontinuierlich erhöht, was bei Überschreiten der Schmelztemperatur zum Ablösen der Sonden und Abbruch des Fluoreszenzsignals führt. Dieser Schmelzpunkt ist ein für jede Sonde und Reaktion charakteristischer Wert.

Liegt eine Fehlpaarung von zwei Basen vor, z.B. bei einem Nukleotidaustausch durch einen Polymorphismus, löst sich die Sonde bereits bei niedrigeren Temperaturen und der Schmelzpunkt ist verschoben (Abb. 4c). Bei heterozygoten Proben liegen zwei verschiedene Allele vor und entsprechend werden zwei Schmelzpunkte gemessen (Abb. 5). Zur einfacheren Ablesung der Schmelzpunkte wird die erste negative Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur aufgetragen (Abb. 4d, Abb. 5). Anhand der Schmelzwerte und des Kurvenverlaufs kann dann die Genotypisierung erfolgen (Roche, 1998).

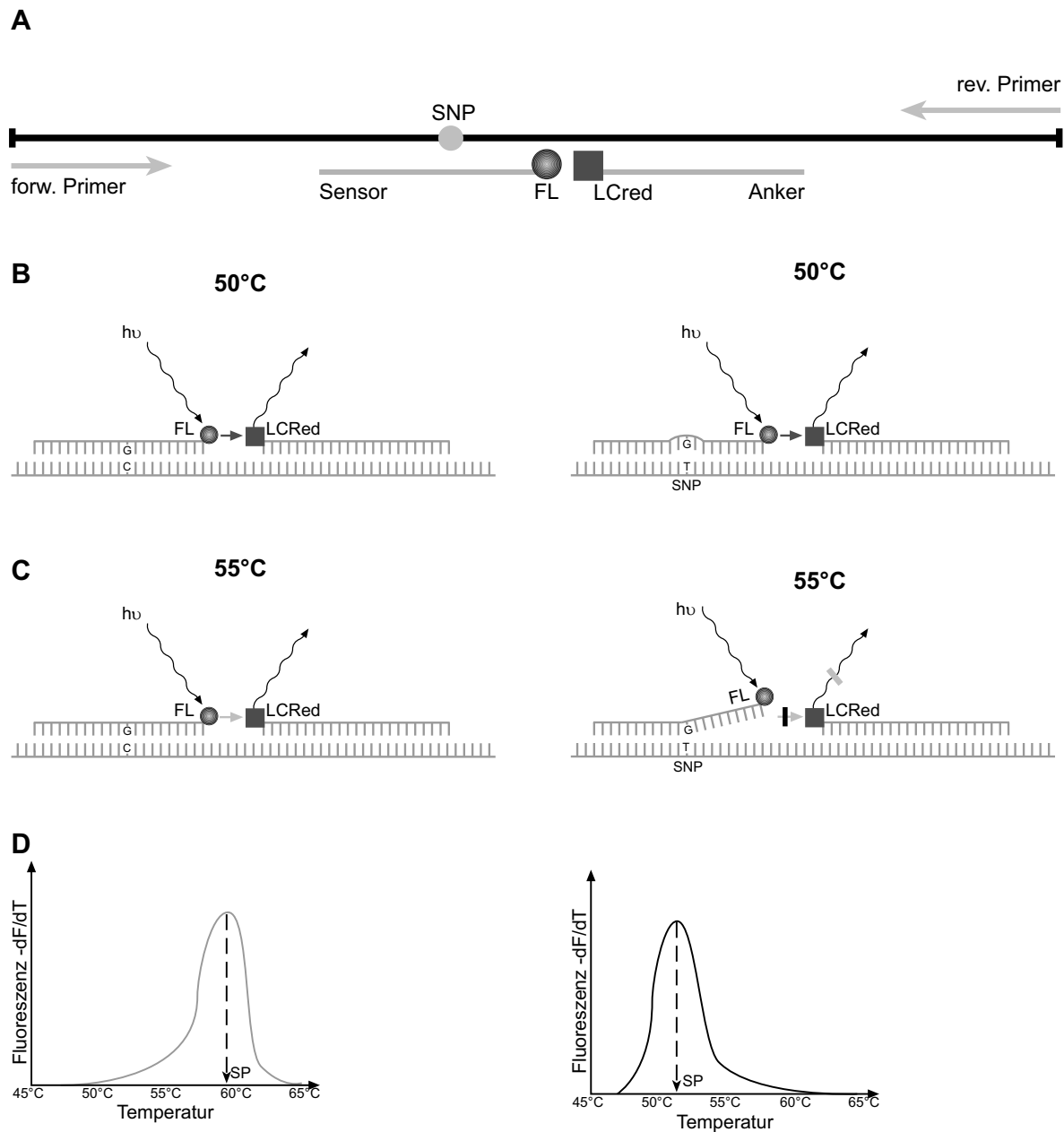


Abb. 4: Genotypisierung am LightCycler

A: Prinzip der LightCycler-PCR. Die Sensorsonde hybridisiert mit dem DNA-Bereich, in dem der SNP vorliegt. Das 3'-Ende der Sensorsonde ist mit Fluorescein markiert (Donor-Fluorophor). Die Ankersonde bindet wenige Basenpaare entfernt vom 3'-Ende der Sensorsonde. Das 5'-Ende der Ankersonde ist mit LightCycler Red markiert (Akzeptor-Fluorophor).

B: Prinzip des FRET. Wird der Donor-Fluorophor durch einen Lichtimpuls ($h\nu$) angeregt, kommt es zur Energieübertragung auf den Akzeptor-Fluorophor. Bei niedrigen Temperaturen kommt es sowohl beim Wildtyp-Allel (linke Abb.) wie auch beim mutierten Allel (rechte Abb.) zum FRET.

C: Bei höheren Temperaturen löst sich die Sonde bei Vorliegen des mutierten Allels (SNP), während sie beim Wildtyp-Allel noch bindet. Es kann daher bei Existenz des mutierten Allels keine Energieübertragung mehr stattfinden.

D: Resultierende Schmelzkurven. Das Wildtyp-Allel weist einen höheren Schmelzpunkt (SP) als das mutierte Allel auf (verändert nach Roche AG, 1998).

Fluorescein (FL), Schmelzpunkt (SP), Lichtimpuls ($h\nu$)

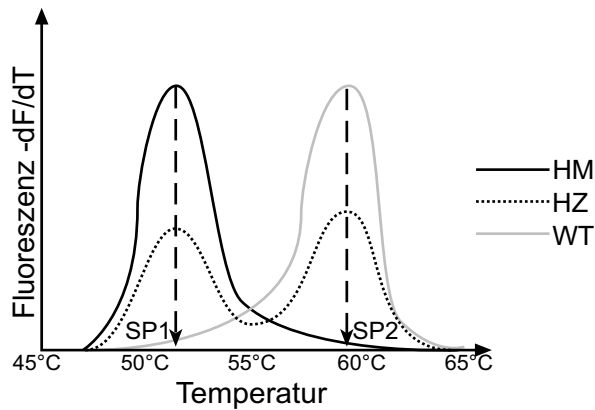


Abb. 5: Erste negative Ableitung der Schmelzkurven, Darstellung der Schmelzpunkte (SP)
 Die homozygote Mutante (HM) weist einen niedrigen Schmelzpunkt auf, bei Vorliegen des Polymorphismus in heterozygoter Form (HZ) treten zwei Schmelzpunkte auf. Der Wildtyp (WT) hat einen höheren Schmelzpunkt als die homozygote Mutante.

3.10.3 Real-time-PCR-basierte Genotypisierung von Polymorphismen am LightCycler mittels eines neuen Reaktionsmixes

Die LightCycler-PCR wird normalerweise mit einem speziellen Reaktionsmix der Firma Roche durchgeführt, der die besonderen Bedingungen der PCR in Glaskapillaren berücksichtigt, dessen Zusammensetzung jedoch nicht veröffentlicht ist. Konventionelle Taq-Polymerasen (z.B. Qiagen Taq Polymerase) können nicht eingesetzt werden. Der Einsatz des „Roche FastStart Hybridization Probes Mix“ ist jedoch mit erheblichen Kosten verbunden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Puffersystem entwickelt, das die Genotypisierung von TLR-Polymorphismen am LightCycler mit einer konventionell erhältlichen Taq-Polymerase zu deutlich reduzierten Kosten erlaubt.

Natrium- und Kaliumsalze interferieren mit dem Verfahren der real-time-PCR (Wittwer, 1991). Sie sind aber in den Reaktionspuffern der meisten handelsüblichen Polymerasen enthalten. Es wurde daher ein natrium- und kaliumfreier Puffer auf der Basis von Ammoniumsulfat verwendet (ABgene oder Rapidozym), der mit 3 mg bovinem Serumalbumin (BSA) versetzt war. Normalerweise kommt es im Laufe der Amplifikation zu einem Niederschlag von Reaktionsprodukten an der Wand der Glaskapillaren. Dies sollte durch die Verwendung von BSA verhindert werden. Alle Reaktionen wurden in einem Volumen von 20 µl durchgeführt, eine Negativkontrolle wurde stets mitgeführt und eine Kalibrierung des LightCyclers für Zweifluoreszenzbestimmung durchgeführt.

3.10.3.1 Genotypisierung der TLR9-Polymorphismen T-1486C und T-1237C

Die beiden TLR9-Polymorphismen T-1237C und T-1486C wurden neben dem TLR2-Polymorphismus G2408A zur Analyse bei RA-Patienten und Gesunden ausgewählt. Durch beide Polymorphismen entsteht eine neue Transkriptionsfaktorbindungsstelle (s. 4.1). Der T-1237C-Polymorphismus ist ferner der bisher einzige bekannte TLR9-Polymorphismus, der mit einer Erkrankung (Asthma) assoziiert ist. Beide TLR9-Polymorphismen liegen nur 249 Basenpaare voneinander entfernt. Zur simultanen Detektion der Polymorphismen wurden Primer verwendet, die beide Polymorphismen umspannen (TLR9s und TLR9as, s. Abb. 6). Es wurden sequenzspezifische, fluoreszenzmarkierte Sonden eingesetzt, die mit den Polymorphismusbereichen des Amplikons hybridisierten. Durch Bestimmung der Schmelzpunkte der Sonden konnte eine Genotypisierung der Proben erfolgen. Es wurde jeweils ein Protokoll für den Roche-Mix sowie die konventionelle Taq-Polymerase (ABgene) entwickelt.



Abb. 6: Prinzip der TLR9-LightCycler-PCR

Fluoreszen (FL), LightCycler Red (LCred), Primer TLR9s/TLR9as, Polymorphismen T-1486C und T-1237C. Die Länge des PCR-Produktes beträgt 499 Basenpaare.

Roche FastStart Hybridization Probes

Der Reaktionsansatz enthielt 5 µl DNA (2-10 ng/µl) und 2 µl FastStart Hybridization Probes, die Konzentration von Magnesiumchlorid betrug 2 mM, die der fluoreszenzmarkierten Sonden 0,14 µM und der Primer 0,5 µM (TLR9s) bzw. 1 µM (TLR9as). Die Bedingungen für die PCR und Schmelzkurve sind in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5: Parameter für die LC-PCR zur TLR9-Genotypisierung (Roche-Puffer)

Reaktionsschritt	Zyklenanzahl	Temperatur (°C)	Zeit (s)
Initiale Denaturierung	1	95	600
Amplifikation	55		
Denaturierung		95	0
Primerhybridisierung		58	10
Extension		72	18
Schmelzkurve	1		
Initiale Denaturierung		95	0
1. Teil		53	30
2. Teil		53-80, 0,1 °C/s	270

ABgene Thermoprime Taq

Zur Verwendung einer konventionellen Taq-Polymerase wurde das Protokoll wie folgt angepasst: In einem Volumen von 20 µl wurden 5 µl DNA (2-10 ng/µl), 3 mg BSA, 1,5 units Taq Polymerase und 2 µl 10x Puffer eingesetzt. Die Konzentration der Primer betrug 0,5 µM (TLR9s) bzw. 1 µM (TLR9R), 1,4 µM für die Hybridisierungs sonden, 0,125 mM für Desoxynukleotide (dNTP) und 1,625 mM für MgCl₂. Die Bedingungen für die PCR und Schmelzkurve sind in Tab. 6 aufgeführt.

Tab. 6: Parameter für die LC-PCR zur TLR9-Genotypisierung (ABgene-Puffer)

Reaktionsschritt	Zyklenanzahl	Temperatur (°C)	Zeit (s)
Initiale Denaturierung	1	95	240
Amplifikation	55		
Denaturierung		95	0
Primerhybridisierung		57	10
Extension		72	20
Schmelzkurve	1		
Initiale Denaturierung		95	0
1. Teil		45	60
2. Teil		45-80, 0,1 °C/s	350

3.10.3.2 Genotypisierung des TLR-2-Polymorphismus G2408A

Roche FastStart Hybridization Probes

Der Reaktionsansatz enthielt 5 µl DNA (2-10 ng/µl) und 2 µl FastStart Hybridization Probes, die Konzentration von Magnesiumchlorid betrug 4 mM, die der fluoreszenzmarkierten Sonden 0,14 µM und der Primer 0,25 µM (TLR2s) bzw. 0,5 µM (TLR2as). Die Parameter der PCR und der Schmelzkurve sind in Tab. 7 aufgeführt.

Tab. 7: Parameter für die LC-PCR zur G2408A-Genotypisierung (Roche-Puffer)

Reaktionsschritt	Zyklenanzahl	Temperatur (°C)	Zeit (s)
Initiale Denaturierung	1	95	600
Amplifikation	40		
Denaturierung		95	0
Primerhybridisierung		55	10
Extension		72	18
Schmelzkurve	1		
Initiale Denaturierung		95	0
1. Teil		53	30
2. Teil		53-80, 0,1 °C/s	270

ABgene Thermoprime Taq

Der Reaktionsmix enthielt 5 µl DNA, 2 units Taq Polymerase, 2 µl 10x Puffer, 2,1 mM MgCl₂, 0,25 µM TLR2s-Primer, 0,5 µM TLR2as-Primer, 0,125 mM dNTP und 0,14 mM der Sensor- und Ankerprobe. Die Bedingungen für die PCR und Schmelzkurve sind in Tab. 8 aufgeführt.

Tab. 8: Parameter für die LC-PCR zur G2408A-Genotypisierung (ABgene-Puffer)

Reaktionsschritt	Zyklenanzahl	Temperatur (°C)	Zeit (s)
Initiale Denaturierung	1	95	240
Amplifikation	40		
Denaturierung		95	0
Primerhybridisierung		58	10
Extension		72	18
Schmelzkurve	1		
Initiale Denaturierung		95	0
1. Teil		50	30
2. Teil		50-80, 0,1 °C/s	300

3.10.4 Genotypisierung durch Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen

3.10.4.1 RFLP des TLR9-Polymorphismus T-1486C

Zur Überprüfung des LC-Verfahrens wurden die Proben auf Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen untersucht. Die PCR erfolgte in einem Gesamtvolumen von 30 µl. Es wurden 3 µl DNA (2-10 ng/µl) eingesetzt, 0,75 Einheiten Qiagen Taq Polymerase, 3 µl 10x Reaktionspuffer, 6 µl Q-Solution, 1,5 mM MgCl₂, 0,166 mM dNTP, 0,3 µM Primer TLR9s und 0,6 µM Primer TLR9as. Eine Negativkontrolle wurde stets mitgeführt. Die PCR wurde unter den folgenden Temperaturbedingungen auf einem Biometra T3 Thermocycler durchgeführt:

Tab. 9: PCR-Parameter zur Genotypisierung des T-1486C-Polymorphismus mittels RFLP

Reaktionsschritt	Zyklenanzahl	Temperatur (°C)	Zeit (s)
Initiale Denaturierung	1	95	240
Amplifikation	35		
Denaturierung		95	30
Primerhybridisierung		60	20
Extension		72	30
Terminale Extension	1	72	300

Es folgte ein Verdau von 6 µl des PCR-Produkts mit dem Enzym Afl II bei 37 °C über Nacht in einem Gesamtvolumen von 15 µl (1,5 µl NEB Puffer 2, 20 U Afl II). Anschließend wurde das Produkt auf einem 2%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.10.4.2 RFLP des TLR9-Polymorphismus T-1237C

In 30 µl Gesamtvolumen waren enthalten: 3 µl DNA (2-10 ng/µl), 0,8 µM der Primer TLR9F und TLR9R, 2,2 mM MgCl₂, 0,166 mM dNTP, 2 U Taq Polymerase, 3 µl 10x Puffer und 6 µl Q-Solution. Eine Negativkontrolle wurde stets mitgeführt.

Die PCR-Parameter sind in Tab. 10 aufgeführt.

Tab. 10: PCR-Parameter zur Genotypisierung des T-1237C-PM mittels RFLP

Reaktionsschritt	Zyklusanzahl	Temperatur (°C)	Zeit (s)
Initiale Denaturierung	1	95	240
Amplifikation	40		
Denaturierung		95	30
Primerhybridisierung		61	20
Extension		72	18
Terminale Extension	1	72	300

Anschließend wurde das PCR-Produkt mit BstNI enzymatisch verdaut. Es wurden 12 µl PCR-Produkt mit 2 µl NEB Puffer 2 und 7,5 U BstNI in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 60 °C für 3 Stunden inkubiert, auf ein 4%iges low-melt-Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt.

3.10.4.3 RFLP des TLR2-Polymorphismus G2408A

Die Untersuchung auf Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen erfolgte nach dem von Schröder *et al.* publizierten Verfahren (Schröder *et al.*, 2003). Die PCR wurde unter Verwendung von 5 µl DNA (2-10 ng), 2,5 µl 10x Puffer, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,75

units Taq Polymerase und 1 μm der Primer T2combi forward und T2combi reverse in einem Ansatz von 25 μl durchgeführt. Eine Negativkontrolle wurde stets mitgeführt. Die Parameter der PCR sind in Tab. 11 aufgeführt.

Tab. 11: PCR-Parameter zur Genotypisierung des G2408A-PM mittels RFLP

Reaktionsschritt	Zyklenanzahl	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Zeit (s)
Initiale Denaturierung	1	95	600
Amplifikation	30		
Denaturierung		95	30
Primerhybridisierung		58	30
Extension		72	25
Terminale Extension	1	72	300

4 μl des PCR-Produktes wurden anschließend über Nacht bei 37 $^{\circ}\text{C}$ mit 0,75 U Aci I und 1 μl NEB-Puffer 3 in Volumen von 10 μl enzymatisch verdaut. Die entstandenen Fragmente wurden auf einem Gel aus 1,5% Agarose und 0,75% low-melt-Agarose nach Elektrophorese für 90 min bei 70 V analysiert.

3.10.5 Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Produkten für analytische Zwecke

Zur Auftrennung von PCR-Fragmenten wurden diese mit Ladepuffer versetzt und in einem mit Ethidiumbromid versetzten 0,8-4%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Je nach zu erwartender Fragmentlänge erfolgte die Elektrophorese bei 70-100 V für 30-90 min. Ein DNA-Längenstandard wurde stets mitgeführt. Die Banden wurden durch Illumination mit UV-Licht sichtbar gemacht, mit einer CCD-Kamera aufgenommen und ausgedruckt.

3.10.6 Bestimmung der DNA-Konzentration von genomischer DNA

Zur Messung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde die Optische Dichte (OD) der Probe mittels eines Photometers bestimmt. Nach Verdünnung in einer Einmalküvette mit 10 mm Schichtdicke wurde die OD bei 260 nm und 280 nm gemessen.

Aus der $OD_{260\text{nm}}$ lässt sich die Konzentration von doppelsträngiger DNA berechnen:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = OD_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Proteingehalt der Probe wurde durch Messung bei der Wellenlänge von 280 nm ermittelt.

3.10.7 Cycle Sequencing von PCR-Produkten

Die Reaktionskomponenten wurden in einem Gesamtvolumen von 20 μl angesetzt, darin enthalten waren 2-4 μl gereinigtes PCR-Produkt, 2 μl Primer (1,6 pmol/ μl), 4 μl Quick Start Master Mix und 10-12 μl Wasser, PCR-Grade. Nach Vortexen erfolgte das Cycle Sequencing im Thermocycler (Tab. 12).

Tab. 12: Parameter zum Cycle-Sequencing von PCR-Produkten

Reaktionsschritt	Zyklenanzahl	Temperatur (°C)	Zeit (s)
Initiale Denaturierung	1	96	240
Amplifikation	40		
Denaturierung		96	20
Primerhybridisierung		50	20
Extension		60	240

Die Fällung der Cycle-Sequencing-Produkte erfolgte durch eine Lösung aus 2 μl 3 M Natriumacetat, 2 μl 100 mM EDTA und 1 μl Glykogen. 5 μl der Lösung wurden zusammen mit 20 μl des Cycle-Sequencing-Produkts sowie 60 μl 95%igem Ethanol in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und durch Vortexen gründlich gemischt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 14 000 U/min bei 4 °C in der Eppendorf Centrifuge 5403 wurde der Überstand sorgfältig abpipettiert und das Pellet mit 200 μl 70% Ethanol

gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Alkohol mit der Pipette entfernt und das Pellet für 10 min in der Speed Vac getrocknet.

Nach Überschichten des Pellets mit 25 µl SLS wurden die Reaktionsgefäße für 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Das in SLS gelöste Produkt wurde nun in eine 96-well-Platte überführt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Parallel wurde die Pufferplatte vorbereitet und die entsprechenden wells einer 96-well-Flachbodenplatte wurden zu $\frac{3}{4}$ mit Separationspuffer gefüllt. Nach Erstellen des Belegungsblattes am Computer wurde das Sequenziergerät mit den Proben beladen und der Sequenzierlauf gestartet.

3.11 Statistische Auswertung

Zum Vergleich der Genotyp- und Allelverteilung wurde Pearsons chi-Quadrat-Test eingesetzt, Fisher's Exact Test bei kleinen Untergruppen. Bei den klinischen, nicht normalverteilten Parametern (RF) wurden Quartile, Median, Minima und Maxima berechnet und auf Verteilungsunterschiede mittels des Mann-Whitney-U-Test getestet. Werte von $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet.

4 Resultate

4.1 Analyse der Transkriptionsfaktorbindungsstellen an den Positionen der TLR9-Polymorphismen T-1237C und T-1486C

Zur Identifikation von Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren erfolgte eine computerbasierte Sequenzanalyse mittels des Programmes Alibaba2. Durch beide SNPs, die im potentiellen Promotorbereich von TLR9 liegen (Abb. 3), ergeben sich Veränderungen an den Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Während das Wildtyp-Allel keine Transkriptionsfaktorbindungsstellen an -1486 und -1237 aufweist, wird durch den T/C-Austausch eine c-Rel/NF-κB-Bindungsstelle an -1237 geschaffen (Abb. 7). Durch den T-1486C-Polymorphismus entsteht zusätzlich eine neue Bindungsstelle für Sp-1 (Abb. 8).

T-1237C

Wildtyp-Allel

acttgggggagttt**T**caggcaga

mutantes Allel

acttgggggagttt**C**caggcaga

┌──────────┐
c-Rel/NF-κB

Abb. 7: Neue c-Rel/NF-κB-Bindungsstelle durch den T-1237C-Polymorphismus

T-1486C

Wildtyp-Allel

aaaagatcactgccct**T**aagaag

mutantes Allel

aaaagatcactgccct**C**aagaag

┌──────────┐
SP-1

Abb. 8: Zusätzliche Sp-1-Bindungsstelle durch T/C-Austausch beim T-1486C-Polymorphismus

4.2 LightCycler-PCR zur Detektion der TLR9-Polymorphismen T-1486C und T-1237C

Um die Proben auf das Vorliegen der TLR9-Polymorphismen zu untersuchen, wurde ein Real-time-PCR-basiertes Verfahren entwickelt, das die simultane Genotypisierung für beide Polymorphismen erlaubt (Abb. 6). Zusätzlich zum Roche-Standardverfahren wurde ein kostengünstige Puffersystem entwickelt, mit dem die Genotypisierung mittels einer Standard-Taq-Polymerase in einem modifizierten ABgene-Reaktionsmix erfolgen kann (s. 3.10.3).

Bei der Reaktion hybridisieren die Sonden mit dem C-Allel des Polymorphismus (mutantes Allel). Bei Vorliegen des T-Allels (Wildtyp-Allel) kommt es zu einer Basenfehlpaarung, die Sonde löst sich früher und der Schmelzpunkt ist niedriger. Die für die einzelnen Allele gemessenen Schmelzpunkte sind in Tab. 13 aufgeführt.

Tab. 13: Schmelzpunkte der Sonden

Polymorphismus	Roche	ABgene
T-1237C		
T- Allel	52,3°C	51,7°C
C- Allel	61,6°C	61,7°C
T-1486C		
T- Allel	51,4°C	51,9°C
C- Allel	60,6°C	61,5°C

Anhand der Schmelzkurven können somit die verschiedenen Genotypen bestimmt werden. Heterozygote Proben (CT) zeigen zwei Schmelzpunkte und eine zweigipfelige Kurve, bei homozygotem Vorliegen des T- oder C-Allels ist nur ein Schmelzpunkt vorhanden (Abb. 9 und Abb. 10). Die Genotypisierung durch LC-PCR mit ABgene-Puffer/BSA führte zu den gleichen Ergebnissen wie mit dem Roche FastStart Mastermix, wenn auch die Gesamtfluoreszenz im Fluoreszenzkanal 3 (F3) geringfügig niedriger war (Abb. 9).

Bei der Bestimmung des T-1486C-Polymorphismus in Kanal 2 war die Gesamtfluoreszenz bei Gebrauch des ABgene/BSA-Mixes sogar höher. Die erzielten Ergebnisse waren reproduzierbar und konnten durch Anwendung anderer Genotypisierungsme-

thoden (Sequenzierung, RFLP s.u.) bestätigt werden. Ein Niederschlag von Reaktionskomponenten an den Wänden der Glaskapillaren konnte durch den Zusatz von BSA zuverlässig verhindert werden.

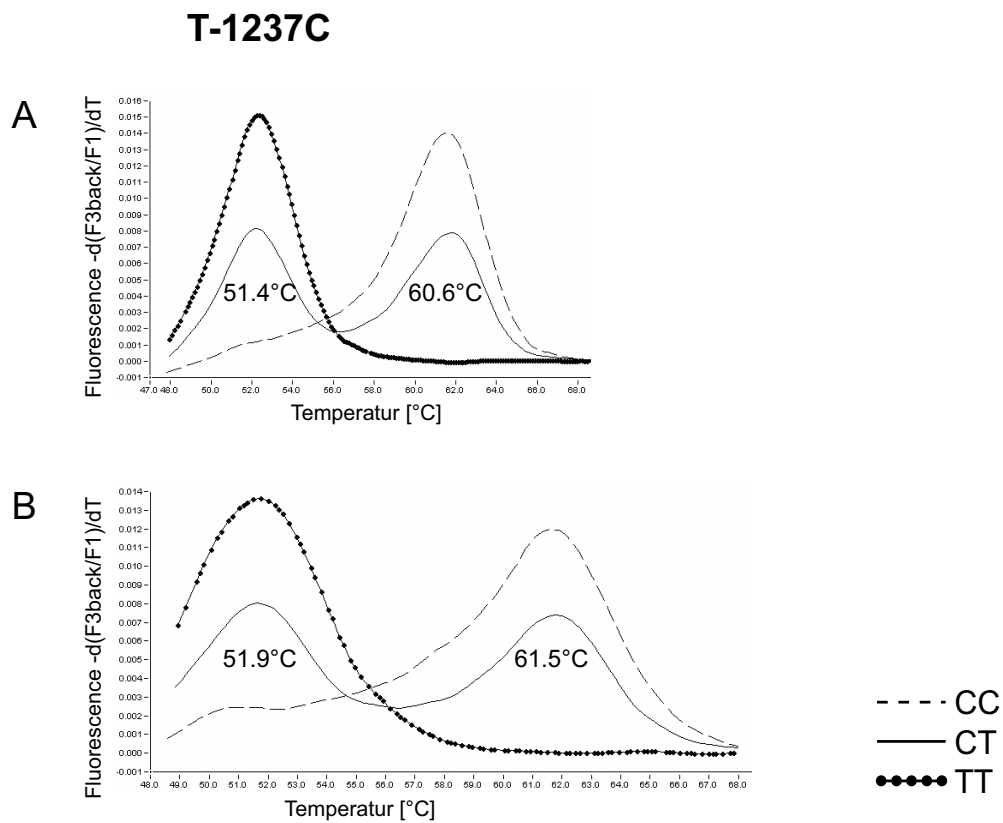


Abb. 9: Repräsentative Schmelzkurven des T-1237C-Polymorphismus
A: Roche FastStart, dargestellt sind Schmelzkurven der Genotypen TT, CT und CC
B: ABGene, Schmelzkurven der Genotypen TT, CT und CC

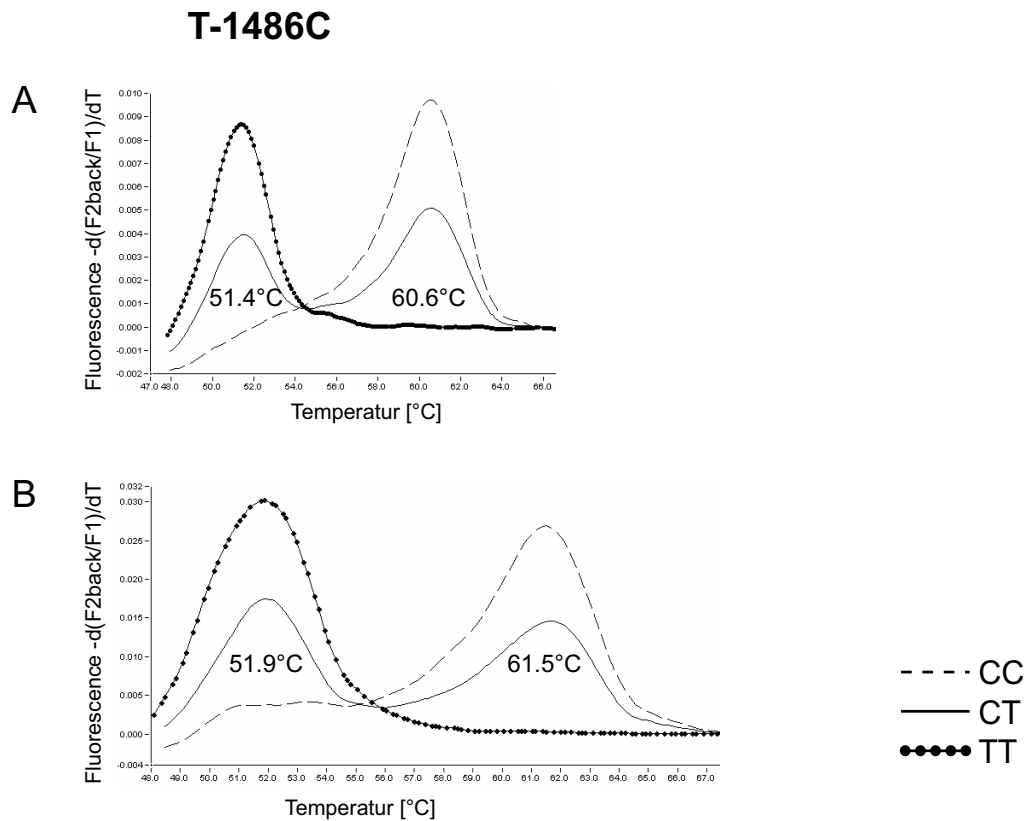


Abb. 10: Repräsentative Schmelzkurven des T-1486C-Polymorphismus
 A: Roche FastStart, Schmelzkurven der Genotypen TT, CT und CC
 B: Abgene, Schmelzkurven der Genotypen TT, CT und CC

4.3 RFLP zur Detektion der TLR9-Polymorphismen T-1237C und T-1486C

Um das real-time-PCR-Verfahren zur Detektion der TLR9-Polymorphismen zu validieren, erfolgte eine zusätzliche Analyse auf Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen. Anhand der Fragmentlänge konnte eine Zuordnung zu den einzelnen Genotypen erfolgen. Bei der Genotypisierung von 20 Proben ließen sich keine Unterschiede bei Anwendung des RFLP- oder real-time-PCR-basierten Verfahrens feststellen.

T-1237C-Polymorphismus: Die Amplifikation mit den Primern TLR9F und TLR9R führt zu einem PCR-Produkt von 135 Basenpaaren (bp). Proben des TT-Genotyps haben nur eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym BstNI, es entstehen Fragmente von 27 bp und 108 bp Länge (Abb. 11 a, Abb. 12). Der Austausch von Thymin durch Cytosin führt zur Schaffung einer zusätzlichen BstNI-Schnittstelle und Fragmenten von 27, 48 und 60

Basenpaaren bei homozygoten Mutanten (CC). Heterozygote Proben (CT) zeigen vier Fragmente der Längen 27, 48, 60 und 108 Basenpaaren (Abb. 12).

T-1486C-Polymorphismus: Die PCR mit den gleichen Primern, die zur Real-time-PCR eingesetzt werden, führt zu einem Produkt von 499 Basenpaaren. Das Wildtyp-Allel besitzt eine *AflII*-Restriktionsschnittstelle an der Position des Polymorphismus (Abb. 11 b). Der Austausch von Thymin durch Cytosin führt zum Verlust der Schnittstelle und resultiert in einer einzigen Bande von 499 Basenpaaren bei homozygoten Mutanten (CC). Heterozygote Proben (CT) zeigen Fragmente der Längen 172, 327 und 499 Basenpaare (Abb. 13).

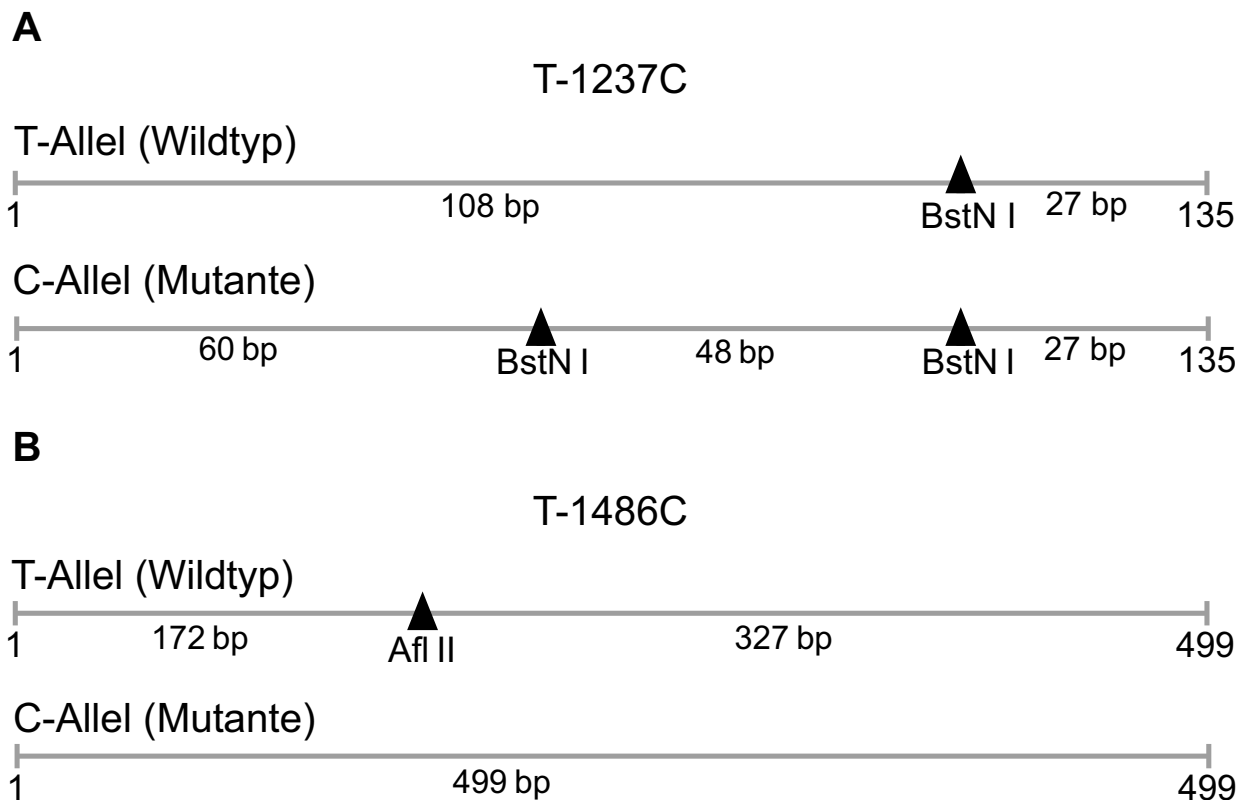


Abb. 11: Prinzip des RFLP

A: *T-1237C-Polymorphismus*. Durch den Austausch von Thymin durch Cytosin entsteht eine zusätzliche *BstNI*-Restriktionsschnittstelle.

B: *T-1486C-Polymorphismus*. Durch den T/C-Austausch fällt die beim Wildtyp-Allel vorhandene *AflII*-Schnittstelle bei der Mutante weg.

▲ kennzeichnet die Schnittstelle eines Restriktionsenzymes, bp=Basenpaare

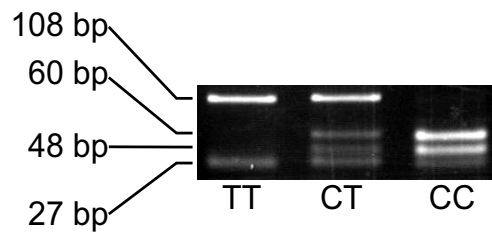


Abb. 12: T-1237C-Polymorphismus, Gelelektrophorese mit charakteristischem Bandenmuster nach BstNI-Verdau
 Proben des TT-Genotyp zeigen Fragmente der Längen 108 bp und 27 bp, Proben des CC-Genotyps Fragmente von 60, 48 und 27 bp. Bei heterozygoten Proben (CT) führt der BstNI-Verdau zu Fragmenten aller vier möglichen Längen (27, 48, 60 und 108 bp). bp=Basenpaare

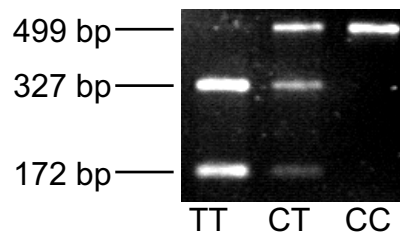


Abb. 13: T-1486-Polymorphismus, Gelelektrophorese mit charakteristischem Bandenmuster nach AflII-Verdau
 Proben des TT-Genotyps zeigen nach Verdau Banden der Länge 327 und 172 bp. Proben des CC-Genotyps besitzen keine AflII-Schnittstelle, die Fragmentlänge beträgt daher 499 bp.

4.4 Der TLR9-Polymorphismus T-1237C bei RA-Patienten und Gesunden

4.4.1 Verteilung der Genotypen des T-1237-Polymorphismus

Die Genotypisierung erfolgte durch Bestimmung der Schmelzpunkte am LightCycler (3.10.3). Die Ergebnisse wurden mit dem chi-Quadrat-Test auf Signifikanz untersucht. Die Häufigkeit der verschiedenen Genotypen sowie Werte des chi-Quadrat-Tests sind in Tab. 14 aufgeführt.

Tab. 14: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen im TLR9-Polymorphismus T-1237C
Fallzahl (N), Freiheitsgrade (Fg)

		CC		CT		TT		Σ			
		N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	Fg	χ ²	p
Männer	RA	0	(0)	8	(27,6)	21	(72,4)	29	2	2,09	0,35
	Kontr.	2	(6,9)	7	(24,1)	20	(69,0)	29			
Frauen	RA	0	(0)	21	(23,5)	68	(76,5)	89	2	1,54	0,46
	Kontr.	1	(1,1)	25	(28,1)	63	(70,8)	89			
Σ	RA	0	(0)	29	(24,6)	89	(75,4)	118	2	3,36	0,19
	Kontr.	3	(2,5)	32	(27,1)	83	(70,3)	118			

Bei beiden Geschlechtern ist der TT-Genotyp bei RA-Patienten und Kontrollen der häufigste. Homozygote Mutanten (CC) kommen sowohl bei Männern, als auch bei Frauen ausschließlich in der Kontrollgruppe, nicht jedoch bei den RA-Patienten vor. Bei den Männern tritt er häufiger als bei den Kontrollpatientinnen auf (6,9% vs. 1,1%, OR=6,5), jedoch liegt der Unterschied im nichtsignifikanten Bereich. Heterozygote Polymorphismusträger finden sich in unterschiedlicher Häufigkeit bei RA-Patienten und Gesunden, überwiegen jedoch leicht bei den RA-Patienten (27,9% vs. 24,6%, n.s.). Gesunde Probanden sind seltener Träger des TT-Genotyps (70,3% vs. 75,4% bei den RA-Patienten, n.s.).

4.4.2 Allelhäufigkeiten des T-1237-Polymorphismus

Aus der Verteilung der Genotypen wurde die Allelhäufigkeit mittels der folgenden Formel errechnet:

$$\text{Cytosin(\%)} = \frac{2x (\Sigma \text{ Proben CC-Genotyp}) + \Sigma (\text{Proben CT-Genotyp})}{2x \text{ Anzahl gemessener Proben}}$$

Tab. 15: Häufigkeit der verschiedenen Allele im TLR9-Polymorphismus T-1237C
Freiheitsgrade (Fg), Odds ratio (OR), Konfidenzintervall (KI)

		C-Allel		T-Allel		Σ					
		N	(%)	N	(%)	N	Fg	OR	95%KI	χ ²	p
Männer	RA	8	(13,8)	50	(86,2)	58	1	0,68	0,25- 1,84	0,57	0,45
	Kontr.	11	(19,0)	47	(81,0)	58					
Frauen	RA	21	(11,8)	157	(88,2)	178	1	0,75	0,41- 1,38	0,87	0,35
	Kontr.	27	(15,2)	151	(84,8)	178					
Σ	RA	29	(12,3)	207	(87,7)	236	1	0,73	0,43- 1,23	1,41	0,23
	Kontr.	38	(16,1)	198	(83,9)	236					

Die Häufigkeiten der verschiedenen T-1237C-Allele sind in Tab. 15 aufgeführt. Sowohl bei RA-Patienten als auch bei Gesunden kommen das T-Allel häufiger als das C-Allel vor (Wildtyp-Allel). Bei den gesunden Kontrollpatienten ließ sich eine höhere Frequenz des C-Allels bestimmen (16,1 % vs. 12,3 % bei den RA-Patienten, n.s.). Das C-Allel, die Mutation, ist bei Männern sowohl bei den RA-Erkrankten als auch den Kontrollpatienten häufiger als bei den Frauen (n.s.). Der TLR9-Polymorphismus T-1237C scheint somit keinen prädisponierenden Faktor für die Erkrankung an RA darzustellen.

4.5 Der TLR9-Polymorphismus T-1486C bei RA-Patienten und Gesunden

4.5.1 Verteilung der Genotypen des T-1486C-Polymorphismus

Die Genotypisierung erfolgte durch Bestimmung der Schmelzpunkte am LightCycler® wie in 3.10.3 beschrieben. Die Häufigkeit der verschiedenen Genotypen bei RA-Patienten und Kontrollen unterscheidet sich nicht signifikant (Tab. 16).

Tab. 16: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen des TLR9-Polymorphismus T-1486C

		CC		CT		TT		Σ		Fg	χ ²	p
		N	(%)	N	(%)	N	(%)	N				
Männer	RA	5	(17,2)	15	(51,7)	9	(31,0)	29	2	1,82	0,40	
	Kontr.	6	(20,7)	10	(34,5)	13	(44,8)	29				
Frauen	RA	15	(16,9)	42	(47,2)	32	(36,0)	89	2	0,15	0,93	
	Kontr.	17	(19,1)	41	(46,1)	31	(34,8)	89				
Σ	RA	20	(16,9)	57	(48,3)	41	(34,7)	118	2	0,65	0,72	
	Kontr.	23	(19,5)	51	(43,2)	44	(37,3)	118				

Beim T-1486C-Polymorphismus kommt der CT-Genotyp am häufigsten insgesamt und in allen Untergruppen vor, gefolgt vom TT-Genotyp. Der CC-Genotyp (homozygote Mutation) kommt mit einer Frequenz von 16,9% bis 20,7% vor, mit einem leichten Überwiegen bei den Gesunden gegenüber den RA-Patienten. Heterozygote Träger des Polymorphismus sind bei den RA-Patienten häufiger (n.s.). Es lassen sich keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede feststellen.

4.5.2 Allelhäufigkeiten des T-1486C-Polymorphismus

Die Allelhäufigkeiten wurden aus der Verteilung der Genotypen wie beschrieben errechnet. Die Allelverteilung weist nur geringe, nicht signifikante Unterschiede zwischen Männern und Frauen und zwischen Patienten und Kontrollen auf. Dieser Polymorphismus scheint somit ebenfalls keinen prädisponierenden Faktor für die Erkrankung an RA darzustellen (Tab. 17).

Tab. 17: Häufigkeit der verschiedenen Allele im TLR9-Polymorphismus T-1486C

		C-Allel		T-Allel		Σ					
		N	(%)	N	(%)	N	Fg	OR	95%KI	χ ²	p
Männer	RA	25	(43,1)	33	(56,9)	58	1	0,72	0,59- 2,60	0,32	0,57
	Kontr.	22	(37,9)	36	(62,1)	58					
Frauen	RA	72	(40,4)	106	(59,6)	178	1	0,93	0,61- 1,42	0,10	0,75
	Kontr.	75	(42,1)	103	(57,9)	178					
Σ	RA	97	(41,1)	139	(58,9)	236	1	1,00	0,69- 1,44	0,00	1,00
	Kontr.	97	(41,1)	139	(58,9)	236					

4.6 Der TLR2-Polymorphismus G2408A bei RA-Patienten und Gesunden

4.6.1 Verteilung der Genotypen des G2408A-Polymorphismus

Die Bestimmung der Genotypen erfolgte durch das von Schröder et al. publizierte Verfahren (Schröder *et al.*, 2003). Einige Proben, die mit diesem Verfahren schwer zu genotypisieren waren, wurden zusätzlich durch Analyse der Schmelzpunkte am LightCycler untersucht (s. 3.10.3.2). Die ermittelten Häufigkeiten sind in Tab. 18 dargestellt. Die Daten zur Häufigkeit des G2408A-Polymorphismus in der Kontrollgruppe wurden in Zusammenarbeit mit Dr. med. N. Schröder, Sabine Bobbe und Diana Wörner (Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité) erhoben.

Tab. 18: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen des TLR2-Polymorphismus G2408A

		GG		GA		Σ					
		N	(%)	N	(%)	N	Fg	OR	95% KI	χ^2	p
Männer	RA	26	(89,7)	3	(10,3)	29	1	1,00	0,18- 5,42	0,00	1,00
	Kontr.	26	(89,7)	3	(10,3)	29					
Frauen	RA	84	(94,4)	5	(5,6)	89	1	1,43	0,44- 4,70	0,36	0,55
	Kontr.	82	(92,1)	7	(7,9)	89					
Σ	RA	110	(93,2)	8	(6,8)	118	1	1,27	0,48- 3,35	0,24	0,62
	Kontr.	108	(91,5)	10	(8,5)	118					

Die Polymorphismen kommen bei RA-Patienten und Gesunden annähernd ähnlich häufig vor (Tab. 18). Männer wiesen den Polymorphismus öfter als Frauen auf (n.s.). Homozygote Mutanten (AA) ließen sich nicht nachweisen, die Allelfrequenzen sind daher nicht separat aufgeführt. Die Häufigkeit des A-Allels beträgt in diesem Fall die Hälfte der Häufigkeit des GA-Genotyps.

4.7 TLR-Polymorphismen bei RF-positiven und RF-negativen RA-Patienten

Bei 95 von 118 RA-Patienten wurde der Serostatus für den Rheumafaktor ermittelt. Bei 73 Patienten betrug der RF-ELISA-Wert 24 U/ml oder mehr (RF positiv), bei 22 Patienten unter 24 U/ml (RF-negativ). Um den Einfluß der TLR-Polymorphismen auf den RF-Serostatus zu überprüfen, wurden die Polymorphismenhäufigkeiten bei RF-positiven und -negativen RA-Patienten untersucht (Tab. 19, Tab. 20 und Tab. 21).

Tab. 19: Allelhäufigkeit des TLR9-Polymorphismus T-1237C bei RF-positiven und RF-negativen Patienten; Freiheitsgrade (Fg), Odds ratio (OR), Konfidenzintervall (KI)

	C		T		Σ		Fg	OR	95% KI	χ ²	p
	N	(%)	N	(%)	N						
RF+	19	(13)	127	(87)	146		1	0,95	0,35 – 2,54	0,01	0,915
RF-	6	(14)	38	(86)	44						
Σ	25		165		190						

Tab. 20: Allelhäufigkeit des TLR9-Polymorphismus T-1486C bei RF-positiven und RF-negativen Patienten

	C		T		Σ		Fg	OR	95% KI	χ ²	p
	N	(%)	N	(%)	N						
RF+	64	(44)	82	(56)	146		1	2,08	1,00 – 4,36	3,86	0,049
RF-	12	(27)	32	(73)	44						
Σ	76		114		190						

Tab. 21: Allelhäufigkeit des TLR2-Polymorphismus G2408A bei RF-positiven und RF-negativen Patienten

	A		G		Σ		OR	95% KI	p
	N	(%)	N	(%)	N				
RF+	4	(3)	142	(97)	146		1,21	0,13 – 11,13	0,756
RF-	1	(2)	43	(98)	44				
Σ	5		185		190				

*χ²-Test nicht anwendbar, da zwei Zellwerte <5

Bei den RF-positiven Patienten kam das C-Allel des TLR9-Polymorphismus T-1486C signifikant häufiger vor als bei den RF-negativen Patienten (44 % vs. 27%, OR 2,08, $p=0,049$).

Die Häufigkeit des TLR9-Polymorphismus T-1237C und des TLR2-Polymorphismus G2408A unterscheidet sich dagegen nicht signifikant zwischen den RF-positiven und -negativen Patienten (Tab. 19 und Tab. 21). Bei der Untersuchung dieser beiden Polymorphismen wurden nur Wildtypen (TT bzw. GG) und heterozygote Polymorphismusträger gefunden, jedoch keine homozygoten Mutanten. Die Häufigkeit der T-1237C- und G2408A-Genotypen bei RF-positiven und -negativen Patienten ist daher hier nicht gesondert aufgeführt, da ihre Häufigkeit in diesem Falle einfach aus der Allelhäufigkeit errechnet werden kann.

Im Gegensatz dazu ließen sich sowohl bei RF-positiven als auch RF-negativen RA-Patienten alle drei Genotypen des T-1486C-Polymorphismus nachweisen (Tab. 22).

Tab. 22: T-1486C-Genotypen bei RF-positiven und -negativen RA-Patienten*

Genotyp	RF+		RF-		Σ N
	N	(%)	N	(%)	
TT	22	(30)	11	(50)	33
CT	38	(52)	10	(45)	48
CC	13	(18)	1	(5)	14
Σ	73		22		95

* χ^2 -Test nicht anwendbar, da ein Zellwert < 5

Der T-1486C-Polymorphismus kommt deutlich häufiger in der homozygoten Form bei den RF-positiven Patienten vor (18% vs. 5%, OR=4,6; Fisher's exact test $p=0,10$). Die heterozygote Form ist bei den RF-positiven geringfügig häufiger vertreten (52% vs. 45%).

4.8 Rheumafaktorspiegel in Abhängigkeit vom TLR9- und TLR2-Genotyp

Es wurde im Folgenden untersucht, ob TLR-Polymorphismen einen Einfluss auf die Höhe der Rheumafaktor-Spiegel haben. Die Verteilung der Rheumafaktor-ELISA-Werte wurde daher in Abhängigkeit vom Genotyp analysiert, Mediane, Quartile, Minima und Maxima bestimmt (Tab. 23).

Tab. 23: RF-Werte (ELISA, units/ml) bei den verschiedenen TLR2- und TLR9-Genotypen

		Perzentile					N	p
		25	50	75	Min	Max		
T-1237C	TT	27	91	266	0	3452	70	0,622
	CT	13	117	304	0	1630	25	
T-1486C	Non-C	0	65	209	0	1540	33	0,023
	C*	46	170	327	0	3452	62	
	TT	0	65	209	0	1540	33	0,049
	CT	30	114	319	0	3452	48	
	TT	0	65	209	0	1540	33	0,044
	CC	61	222	378	0	1557	14	
G2408A	GG	25	98	293	0	3452	90	0,893
	GA	23	117	402	0	625	5	

*C: Alle Träger eines C-Allels (Genotypen CT und CC)

Die Verteilung der RF-Werte unterscheidet sich nur geringfügig in Abhängigkeit vom T-1237C-Genotyp (Tab. 23). Die Mediane liegen bei 91 U/ml (TT) bzw. 117 U/ml (CT), die Quartilen bei 27; 266 U/ml (TT) und 13; 304 U/ml (CT). Die Überprüfung mittels Mann-Whitney-U-Tests zeigte, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen ($p=0,622$). Auch die Verteilung der RF-Werte beim TLR2-Polymorphismus G2408A unterscheidet sich nicht signifikant zwischen Wildtyp (GG) und Polymorphismus (GA). Die Mediane liegen bei 98 U/ml (GG) und 117 U/ml (GA), $p=0,893$.

Im Gegensatz dazu scheint das Auftreten des T-1486C-Polymorphismus nicht nur mit dem RF-Serostatus, sondern auch mit der Höhe des Rheumafaktorspiegels zu korrelieren. Proben der Patienten, die kein C-Allel tragen (Non-C, Tab. 23) weisen

niedrigere RF-Werte auf, als Proben von Patienten die ein oder zwei C-Allele tragen (C, Tab. 23), $p=0,023$. Vergleicht man die Werte der 25. und 50. Perzentile, so fällt der stetige Zuwachs der RF-Werte mit dem Auftreten eines C-Allels auf. Die 25. Perzentile liegt beim TT-Genotyp bei 0 U/ml, bei der heterozygoten Form bei 30 U/ml, bei der homozygoten Mutante bei 61 U/ml. Die Mediane betragen 65 U/ml (TT), 114 U/ml (CT), und 222 U/ml (CC). Auch der Wert der 75. Perzentile der TT-Proben ist niedriger (209 U/ml) als bei den CT- (319 U/ml) und CC-Proben (378 U/ml). Homozygote Mutanten (CC) zeigen somit die höchsten RF-Werte, gefolgt von den heterozygoten Proben (CT) und den Proben des TT-Genotyps. Die beobachteten Unterschiede zwischen TT- und CT- oder CC-Genotyp sind signifikant ($p=0,049$ bzw. $0,044$).

5 Diskussion

5.1 Real-time-PCR zur Detektion der TLR9-Polymorphismen T-1237C und T-1486C

Toll-like-Rezeptoren nehmen eine zentrale Rolle in der Abwehr von Infektionen ein, sie erkennen konservierte molekulare Pathogenstrukturen, sogenannte PAMPs, und lösen nach Bindung derselben die Aktivierung des angeborenen und schließlich des adaptiven Immunsystems aus (Medzhitov und Janeway, 1998a; Akira *et al.*, 2001). Genetische Polymorphismen in TLRs sind entsprechend erster Ergebnisse mit infektiösen Krankheiten wie Sepsis und Meningokokkeninfektion sowie inflammatorischen Krankheiten wie Atherosklerose und Asthma assoziiert (Lorenz *et al.*, 2000; Kiechl *et al.*, 2002; Lazarus *et al.*, 2003; Smirnova *et al.*, 2003). Die Erkennung von genetischen Polymorphismen kann u.U. wertvolle Informationen zur Einteilung in Risikogruppen und zur Therapie geben. TLR9-Polymorphismen sind bisher wenig erforscht, es liegt bislang nur eine Publikation vor, in der die Assoziation des T-1237C-Polymorphismus mit dem Auftreten von Asthma beschrieben ist (Lazarus *et al.*, 2003). Angaben aus weiteren Quellen zur Häufigkeit dieses Polymorphismus in der Bevölkerung oder Ergebnisse zu seiner Beteiligung in anderen Krankheiten fehlen bislang vollständig. Dies könnte auch durch das Fehlen von Methoden zur schnellen und kostengünstigen Bestimmung des Polymorphismus bedingt sein. Bislang erfolgte die Detektion der TLR9-Polymorphismen durch Sequenzieren, was ein sowohl zeit- als auch kostenintensives Verfahren ist.

Es wurde daher im Rahmen dieser Arbeit ein Real-time-PCR-basiertes Verfahren etabliert, das die Genotypisierung von Patientenproben auf den T-1237C- und T-1486C-Polymorphismus hin ermöglicht. Beide Polymorphismen können simultan in einer einzigen PCR-Reaktion bestimmt werden. Dies gelingt durch den Einsatz sequenzspezifischer Sonden, die mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Eine Genotypisierung von bis zu 30 Proben kann in einem einzigen LC-Lauf innerhalb von 90 Minuten erfolgen. Um die Kosten weiter zu senken, wurde ein Puffersystem eingeführt, das die Real-time-PCR am LightCycler mit einer handelsüblichen Taq-Polymerase erlaubt. Die Ergebnisse mit diesem Puffer sind vergleichbar mit den unter Verwendung des Roche FastStart Mixes erzielten (Abb. 9 und Abb. 10). Die Bestimmung der Genotypen konnte in allen Fällen anhand der Schmelzpunktanalyse erfolgen.

Im Vergleich zum Original-Mix der Firma Roche enthält der von uns verwendete BSA-supplementierte Puffer keine Hotstart-Polymerase und kann daher prinzipiell zu einem höheren Anteil von Nebenprodukten wie Primer-Dimeren führen. Durch das Primer-Design konnte dies jedoch verhindert werden. Es wurde weiterhin eine zweite Methode entwickelt, die eine Genotypisierung der TLR9-Polymorphismen anhand von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen erlaubt. Zur Validierung der Real-time-PCR wurden die Ergebnisse durch die Analyse auf RFLPs hin überprüft. Es konnten hierbei keine Abweichungen zwischen den Verfahren festgestellt werden und es traten keine falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnisse auf. Proben aller T-1237C- und T-1486C-Genotypen wurden zusätzlich sequenziert als Abgleich mit dem bisher praktizierten Verfahren zur Genotypisierung von TLR9-Polymorphismen. Auch hier traten keine Unterschiede zu den durch Real-time-PCR erzielten Resultaten auf. Im Vergleich zum RFLP-basierten Verfahren erlaubt die Real-time-PCR-basierte Methode eine bedeutend schnellere und einfachere Genotypisierung der Proben, da beide Polymorphismen in einer Reaktion bestimmt werden können sowie weitere zeit- und arbeitsaufwendige Bearbeitungsschritte nach der PCR entfallen (Restriktionsverdau, Gelelektrophorese). Die Interpretation der Ergebnisse der Schmelzkurven ist einfacher, da zusätzliche Fehlermöglichkeiten mit der Post-PCR-Bearbeitung wegfallen (unvollständiger Verdau, Elektrophoresefehler etc.).

Mit dem vorgestellten Puffergemisch konnten die Reaktionskosten gegenüber dem Roche FastStart-Mix um ca. 50% gesenkt werden; es kann auch zur Genotypisierung anderer Polymorphismen mit anderen Hybridization Probes verwendet werden und wurde bereits erfolgreich zur Bestimmung von TLR2- und TLR4-Polymorphismen eingesetzt (Hamann *et al.*, 2004).

5.1.1 Vor- und Nachteile gegenüber der bisherigen Methode zur TLR9-Genotypisierung

Im Vergleich zum bislang einzigen Verfahren zur Genotypisierung von TLR9, dem Sequenzieren, wie von Lazarus *et al.* 2003 beschrieben, weist die neu entwickelte Real-time-PCR vielfältige Vorteile auf. Das Sequenzieren umfasst mehrere Arbeitsschritte: die PCR, die Überprüfung der PCR-Produkte am Gel, die Reinigung der PCR-Produkte, das Cycle Sequencing, die Fällung der Cycle-Sequencing-Produkte sowie den

eigentlichen Sequenzierlauf. Diese Methode ist daher sowohl personal- als auch zeitaufwendig. Vom ersten Arbeitsschritt bis zum Ergebnis vergehen bei der Sequenzierung ca. 12 Stunden, wohingegen bei der real-time-PCR die Resultate bereits nach 90 Minuten vorliegen. Die Real-time-PCR erfordert nur einen Arbeitsschritt und weist weniger Fehlermöglichkeiten und damit „Ausschuss“ von wertvollem Patientenmaterial auf. Die Materialkosten der Genotypisierung mittels Real-time-PCR mit dem von uns entwickelten Mix liegen bei ca. 1,50 Euro, die Sequenzierung kostet etwa das Fünffache. Der höhere Arbeitsaufwand beim Sequenzieren und die damit verbundenen Personalkosten dürften die Ersparnis bei Anwendung des Real-time-PCR-Verfahrens noch deutlich steigern.

Der Vorteil des Sequenzierens liegt in seiner höheren Auflösung. Die Abfolge der einzelnen Basen kann bestimmt werden und dies ermöglicht auch den Nachweis weiterer Polymorphismen, die mit der Real-time-PCR und Hybridisierungssonden nicht erfasst werden. Dies ist wichtig bei der Suche nach neuen Polymorphismen; zur Beantwortung der Fragestellung, ob der T-1237C- und der T-1486C-Polymorphismus in unterschiedlichen Populationen oder Krankheitsgruppen vermehrt auftreten, ist dies jedoch nicht von Bedeutung. Ferner ist die Auswertung der Sequenzierergebnisse erheblich zeitaufwendiger und mit mehr Fehlermöglichkeiten behaftet.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Methode entwickelt, die eine einfache und schnelle Genotypisierung von zwei TLR9-Polymorphismen erlaubt und damit die Erforschung der Rolle dieser Polymorphismen bei verschiedenen Krankheiten erleichtert. Zusätzlich wurde ein neues Puffersystem etabliert, das die Genotypisierung dieses Polymorphismus zu deutlich geringeren Kosten ermöglicht und auch bei weiteren Polymorphismen anwendbar ist.

5.2 Assoziation von genetischen Polymorphismen in TLR9 und TLR2 mit dem Auftreten von rheumatoider Arthritis

Die Pathogenese der RA kann bislang nur unzureichend erklärt werden. Neuere Hypothesen nehmen eine zweistufige Entwicklung an, bei der zuerst das angeborene und anschließend das adaptive Immunsystem aktiviert werden (Firestein, 2003). Durch ihre zentrale Rolle im angeborenen Immunsystem scheinen Toll-like-Rezeptoren hierbei

eine entscheidende Rolle zu spielen, insbesondere TLR2 und TLR9 (s. 1.5). Eine genetische Komponente in der Pathogenese der RA ist gesichert, jedoch bleibt der Großteil der hieran beteiligten Faktoren bisher ungeklärt. Trotz der vielen Daten, die auf die wichtige Rolle der TLRs in der Pathogenese der RA hinweisen, sind genetische Variationen in Toll-like-Rezeptoren bei RA-Patienten bislang kaum untersucht. Es wurden daher in der vorliegenden Arbeit der TLR2-Polymorphismus G2408A und die TLR9-Polymorphismen T-1486C und T-1237C auf eine Assoziation mit dem Auftreten von RA untersucht. Bei bisherigen Polymorphismus-Studien wird bei der Auswahl der Kontrollgruppe selten auf die gleiche Zusammensetzung von Geschlecht und Alter wie in der Patientengruppe geachtet, oft fehlen Angaben zur Geschlechts- und Altersverteilung völlig. Dies trifft auch zu auf bisherige Untersuchungen zu genetischen Polymorphismen bei RA-Patienten, z.B. bei den Untersuchungen von Gonzalez-Escribano *et al.* (2003) oder Kilding *et al.* (2003). Gerade bei der rheumatoiden Arthritis ist jedoch die Geschlechtsverteilung wichtig und wurde daher von uns berücksichtigt. Es wurde in dieser Arbeit auf eine möglichst gleiche Zusammensetzung der Patienten- und Kontrollgruppe hinsichtlich Alter und Geschlecht geachtet. Anhand von Zufallszahlen wurde jedem RA-Patienten ein Kontrollpatient desselben Geschlechts und einer ähnlichen Altersgruppe zugeordnet. Der Altersunterschied zwischen Erkrankten und Gesunden in dieser Untersuchung ist im Vergleich zu anderen Studien gering, ließ sich jedoch aufgrund einer begrenzten Zahl von Kontrollpatienten nicht vollständig auf Null reduzieren.

5.2.1 Der TLR9-Polymorphismus T-1486C

Die Untersuchung zur Prävalenz des T-1486C-Polymorphismus zeigte ein häufiges Auftreten in der Bevölkerung. Es konnten drei verschiedene Genotypen unterschieden werden: TT, CT und CC. In der Kontrollgruppe fanden sich hierbei 43,2% heterozygote Träger (CT), 19,5% für Cytosin homozygote Träger (CC) und 37,3% Träger von zwei Thymin-Allelen (TT). Mit 58,9% ist das T-Allel zwar das häufigere Allel, bei den Genotypen überwiegt jedoch die heterozygote CT-Form gegenüber der TT-Form. Die mit 41,1% bestimmte Allelfrequenz für Cytosin liegt leicht über der von Lazarus *et al.* mit 39% bei Europäern gemessenen Häufigkeit (Lazarus *et al.*, 2003).

Der Vergleich der Häufigkeiten zwischen Patienten- und Kontrollgruppe zeigte keine signifikanten Differenzen. Zwar unterschieden sich beide in der Häufigkeit der drei vorkommenden Genotypen, die Allelfrequenz ist jedoch bei der Gesamtgruppe identisch (58,9%T, 41,1%C), die Unterschiede in der männlichen und weiblichen Untergruppe gering. Diese Daten deuten darauf hin, dass der T-1486C-Polymorphismus nicht zur Suszeptibilität für RA beiträgt.

5.2.2 Der TLR9-Polymorphismus T-1237C

Der T-1237C-Polymorphismus kommt deutlich seltener vor als der T-1486C-Polymorphismus, seine Allelfrequenz beträgt 16,1% bei Gesunden. In der Kontrollgruppe konnten drei Genotypen unterschieden werden: Wildtyp (TT), heterozygote (CT) und homozygote Träger (CC). Der TT-Genotyp war mit 70,3% der häufigste, gefolgt vom heterozygoten (27,1%) und CC-homozygoten (2,5%) Genotyp. Im Vergleich zu den von Lazarus *et al.* publizierten Ergebnissen kam das C-Allel damit in unserer Population geringfügig häufiger vor, die Heterozygotenhäufigkeit war um 3,1% höher, wogegen die Homozygotenfrequenz gleich war (2,6% vs. 2,5%). Die Anzahl von Homozygoten liegt damit in unserer Population im Hardy-Weinberg-Equilibrium (erwartete Anzahl von Homozygoten: 2,6%).

Im Vergleich war die Häufigkeit des C-Allels bei den RA-Patienten mit 12,6% geringer als bei den Gesunden (16,1%). Zudem kamen in dieser Gruppe keine homozygoten Proben (CC-Genotyp) vor. Das geringere Vorkommen des C-Allels in der RA-Gruppe sowie das Fehlen von Homozygoten in dieser Gruppe könnte auf eine mögliche schützende Wirkung des C-Allels hindeuten, die beobachteten Unterschiede sind jedoch nicht signifikant ($p=0,23$). Der T-1237C-Polymorphismus scheint nach diesen Daten nicht für die Erkrankung an RA zu prädisponieren bzw. davor zu schützen.

5.2.3 Der TLR2-Polymorphismus G2408A

Der TLR2-Polymorphismus G2408A kam in unserer Kontrollgruppe mit einer Häufigkeit von 8,5% vor, homozygote Formen (AA) ließen sich nicht nachweisen. Über die Häufigkeit des G2408A-Polymorphismus in der Allgemeinbevölkerung gibt es ver-

schiedenen Angaben, die je nach untersuchter Population und Methode von 1% bis 14,6% reichen (Lorenz *et al.*, 2000; Schroder *et al.*, 2003; Sanchez *et al.*, 2004). Die RA-Patienten und das Vergleichskollektiv in unserer Studie liegen mit 6,8% bzw. 8,5% zwischen diesen Extremen. Die beiden Untersuchungsgruppen unterscheiden sich nicht signifikant, auch die Unterschiede in der Männer- und Frauengruppe sind gering. Die gemessenen Unterschiede deuten nicht auf eine Assoziation von Polymorphismus und dem Auftreten von RA hin. Diese Ergebnisse stimmen mit kürzlich erschienenen Resultaten von Sanchez *et al.* (2004) überein, der bei spanischen Patienten keine Assoziation des G2408A-Polymorphismus mit dem Auftreten von RA fand. Im Vergleich zu dieser Publikation tritt in unserer Population der Polymorphismus sowohl in Patienten- als auch Kontrollgruppe jedoch wesentlich häufiger auf (8,5% bei den Kontrollpatienten im Vergleich zu 1% bei Sanchez *et al.* (2004)). Dies könnte an ethnischen Variationen liegen oder durch das unterschiedliche Genotypisierungsverfahren bedingt sein. In einer größeren Studie könnte daher versucht werden, die Ursache der stark differierenden Polymorphismus-Häufigkeit zu bestimmen. Es sollte daher das Auftreten des G2408A-Polymorphismus an verschiedenen Populationen mit der gleichen Genotypisierungsmethode in einer großen Stichprobe bestimmt werden.

5.3 TLR9- und TLR2-Polymorphismen bei RF-positiven und -negativen Patienten und Höhe von RF bei verschiedenen Genotypen

5.3.1 Bedeutung des TLR9-Genotyps für die Rheumafaktor-Produktion

Der Rheumafaktor ist ein Autoantikörper gegen das Fc-Fragment des Immunglobulin-G-Moleküls. Sein Nachweis im Serum ist eines der ACR-Diagnosekriterien für RA (Arnett *et al.*, 1988), jedoch nicht pathognomonisch, da etwa 20% aller RA-Erkrankten RF-negativ sind und RF auch bei anderen Erkrankungen und z.T. bei Gesunden nachgewiesen werden kann. Ob der RF pathogenetisch wichtig ist und Ursache oder Folge der Erkrankung darstellt, ist bislang ungeklärt. Der RF hat jedoch eine prognostische Bedeutung, sein Nachweis ist mit einem destruktiveren Verlauf der Erkrankung assoziiert (Kaarela, 1985; Paimela *et al.*, 1995; Harris, 2001a). Leadbetter *et al.* wiesen nach, dass TLR9 an der Aktivierung RF-produzierender B-Zellen beteiligt

ist (Leadbetter *et al.*, 2002). Polymorphismen in diesem Rezeptor könnten daher sowohl die Seropositivität/-negativität als auch die Höhe des RF-Wertes im Serum beeinflussen.

Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung der RF-positiven und negativen RA-Patienten wurden signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen TLR9-Genotypen im T-1486C-Polymorphismus nachgewiesen. Die RF-positiven Patienten waren häufiger Träger des selteneren C-Allels als die RF-negativen Patienten. Insbesondere homozygote Träger des C-Allels finden sich erheblich öfter unter den RF-positiven Patienten (OR=4,6). Die Häufigkeit des C-Allels bei den RF-positiven Patienten lag jedoch nur unwesentlich über der in der Kontrollpopulation gemessenen (44% vs. 41,1%). Das Vorhandensein des C-Allels scheint daher nicht für die Erkrankung an RA zu prädisponieren, könnte aber bei den Erkrankten einen wichtigen Kofaktor bei der RF-Induktion darstellen.

Die Untersuchung der Höhe der RF-Spiegel bei den unterschiedlichen Genotypen weist in die gleiche Richtung. Der Vergleich von Trägern und Nichtträgern des C-Allels zeigt, dass die Träger des C-Allels einen signifikant höheren RF-Spiegel aufweisen ($p=0,023$). Das Auftreten des Polymorphismus in homozygoter Form (CC) führt dabei zu höheren RF-Werten als in heterozygoter Form.

Ein möglicher Grund für die höheren Rheumafaktor-Serumspiegel bei Trägern des C-Allels im T-1486C-Polymorphismus könnte die Existenz einer durch den Nukleotidwechsel entstandenen Sp-1-Bindungsstelle sein, die bei Trägern des T-Allels nicht vorliegt (Abb. 8). Sp-1 ist ein Zinkfinger-Protein, das die Transkription einer Vielzahl von Genen reguliert. Es ist beteiligt an der Steuerung von Zellfunktionen wie Proliferation, Apoptose, Differenzierung und neoplastischer Transformation (Kaczynski *et al.*, 2003). Sp-1 kann sowohl regulatorisch, als auch als basaler Transkriptionsfaktor wirken. Das Vorhandensein einer zusätzlichen Sp-1-Bindungsstelle könnte die Regulation von TLR9 beeinflussen und eine stärkere Expression bewirken. Betrachtet man die Ergebnisse von Leadbetter *et al.* (2002) zur Rheumafaktor-Produktion nach TLR9-Aktivierung, könnte eine verstärkte Expression von TLR9 auf B-Zellen die Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens und der Bindung von Wirts-DNA-Molekülen mit dem Rezeptor erhöhen und zu einer gesteigerten Aktivierbarkeit der B-Zelle mit nachfolgender gesteigerter RF-Produktion führen.

Die Aktivität der neu entstandenen Transkriptionsfaktorbindungsstellen muss in Folgeprojekten z.B. durch Gelshift-Experimente bestätigt werden. Bisher ist die

Regulation von TLR-Genen wenig erforscht. Für TLR9 ist nur für LPS, CSF-1 und IFN- γ nachgewiesen, dass sie die Transkription von TLR9 induzieren (An *et al.*, 2002; Sweet *et al.*, 2002). Die eigentliche Promotorstruktur, seine Länge, erforderliche Transkriptionsfaktoren und Enhancerelemente sind dagegen bisher weitgehend unbekannt. Die Analyse der Struktur müsste in weiteren Experimenten geschehen, um die funktionelle Bedeutung der Polymorphismen besser bewerten zu können. Eine Möglichkeit, dies zu erforschen, wäre ein Reporter-Gen-Assay, z.B. ein Luciferase-Assay. Die Länge des TLR9-Promotors könnte durch verschieden lange Konstrukte analysiert werden, Transkriptionsfaktoren und wichtige Enhancerelemente identifiziert werden. Wenn die Länge und Struktur des TLR9-Promotors analysiert ist, könnten Konstrukte mit den verschiedenen Polymorphismen eingesetzt und ihre Luciferase-Aktivität verglichen werden. Damit könnten die beobachteten Unterschiede bei der Rheumafaktor-Produktion möglicherweise experimentell *in vitro* bestätigt werden. Diese Experimente werden gerade im Rahmen einer Anschlussstudie im Labor der AG Schumann durchgeführt.

Ausser durch die Veränderung der Transkriptionsfaktorbindungsstelle könnten die TLR9-Polymorphismen T-1486C und T-1237C auf einem Allel gekoppelt mit Polymorphismen weiter stromaufwärts oder -abwärts liegen. Diese könnten im TLR9-Gen oder anderen Genen lokalisiert sein und eine weitere mögliche Erklärung der beobachteten RF-Unterschiede darstellen.

Neben Polymorphismen in TLR9 sind jedoch noch andere Möglichkeiten denkbar, die das Auftreten von Autoantikörpern wie RF bei der RA erklären könnten. Bei vielen Autoimmunerkrankungen fällt auf, dass Antikörper gegen DNA-haltige Strukturen wie Chromatin oder andere Nukleinsäure-Protein-Partikel gebildet werden. Normalerweise ist Wirts-DNA nicht immunogen, da die CpG-Elemente im menschlichen Genom weitgehend methyliert sind und daher keine TLR9-Aktivierung auslösen können. Bei RA und systemischen Lupus erythematodes (SLE) wurde hingegen gezeigt, dass die DNA-Methylierung erniedrigt ist (Richardson *et al.*, 1990). Ferner können Medikamente, die die DNA-Methylierung hemmen, Autoimmunerkrankungen auslösen (Yung *et al.*, 1995). Es wäre daher möglich, dass eine durch SNPs hervorgerufene strukturelle veränderte TLR9-Bindungsstelle Wirts-DNA-haltige Immunkomplexe besser binden kann und so zur Aktivierung von RF-produzierenden B-Zellen führt. Es sollte daher insbesondere der

Bereich des TLR9-Gens auf neue SNPs untersucht werden, der für die CpG-Bindungsstelle am Rezeptor kodiert. Weiterhin könnten genetische Variationen in weiteren Molekülen der TLR-Signaltransduktion zu einem überschießenden Signal bei eigentlich normaler Aktivierung des Rezeptors führen. Eine Analyse auf SNPs in den Genen z.B. für MyD88, IRAK oder TRAF6 wäre daher notwendig. Auch Polymorphismen in den Genen der Enzyme, die DNA methylieren (Methylasen), könnten eine Ursache für die Bildung von Autoantikörpern gegen DNA-haltige Strukturen und die Aktivierung RF-produzierender B-Zellen sein und sollten daher in weiteren Projekten untersucht werden.

5.4 Fehlermöglichkeiten und Grenzen dieser Studie

Die Patienten, die in dieser Studie untersucht wurden, haben nicht alle die gleiche Therapie erhalten. Unterschiedliche Medikamente könnten einen Einfluss auf den Serumspiegel des Rheumafaktors haben. Der Forschungsstand hierzu ist nicht eindeutig. Bei einigen Patienten wird die Senkung der RF-Titer unter verschiedenen DMARDs beobachtet (Alarcon *et al.*, 1990; Rynes, 2001). Oft ist diese Senkung transient, nur bei bestimmten Untergruppen feststellbar oder es können überhaupt keine signifikanten RF-Veränderungen unter der DMARD-Therapie nachgewiesen werden (Pope *et al.*, 1986). Eine signifikante, persistente Reduktion der RF-Spiegel kann bei den meisten Patienten bislang nur mit der – bislang experimentellen – B-Zell-depletierenden Therapie durch monoklonale Anti-CD20-Antikörpern (Rituximab) erreicht werden (Edwards und Cambridge, 2001; Edwards *et al.*, 2004). Eine systematische, langandauernde Beeinflussung der RF-Serumspiegel durch die klassischen DMARDs hingegen erscheint aufgrund der vorliegenden Daten nicht wahrscheinlich, lässt sich jedoch nicht vollkommen ausschliessen.

Eine Konversion von RF-negativen zu RF-positiven Serostatus kann jedoch im Verlauf der Krankheit stattfinden, einzelne Patienten bilden RF erst nach einer längeren Krankheitsdauer (Steiner und Smolen, 2002). Bei einigen Patienten, die in dieser Studie als RF-negativ eingestuft wurden, könnte inzwischen eine Serokonversion aufgetreten sein. Dieser Störfaktor lässt sich jedoch nicht im Vorhinein ausschließen. Bei bis zu 50% der RA-Patienten lässt sich hingegen schon vor dem Auftreten der ersten

Krankheitssymptome Rheumafaktor im Serum nachweisen (Aho *et al.*, 1991; MacGregor und Silman, 1991).

Eine Einschränkung dieser Studie könnte die kleine Anzahl an RF-negativen Patienten darstellen. Ihr Anteil liegt bei 23%, was den in der Literatur angegebenen Werten von 10-30% entspricht (Wolfe *et al.*, 1991; Dorner *et al.*, 2004). Auch wenn sich große Unterschiede in der Verteilung der einzelnen T-1486C-Genotypen bei RF-positiven und negativen Patienten zeigen (z.B. OR=4,6 beim CC-Genotyp, Tab. 22), erweisen sich diese Unterschiede bei der Fallzahl von 22 RF-negativen Patienten als nicht signifikant. Legt man die in dieser Studie beobachtete Genotyp-Verteilung bei RF-positiven und -negativen Patienten zugrunde, müsste zu einer besseren statistischen Beurteilbarkeit die N-Zahl der RF-negativen Patienten verdoppelt werden.

5.5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass TLR2- und TLR9-Polymorphismen nicht zur Ausbildung von RA prädisponieren oder davor schützen. Die Untersuchung zur Höhe des Rheumafaktors bei den unterschiedlichen Genotypen deutet jedoch darauf hin, dass ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem TLR9-Genotyp (T-1486C-Polymorphismus) und der Produktion von Rheumafaktor bestehen könnte. Der TLR9-Genotyp könnte somit Auswirkungen auf den klinischen Verlauf haben. In weiterführenden Studien mit größeren Fallzahlen sollten die in dieser Studie beobachteten Assoziationen überprüft werden. Insbesondere die Testung einer größeren Gruppe von RF-negativen RA-Patienten auf den TLR9-Polymorphismus T-1486C hin wäre wünschenswert. Die RF-Werte sollten bereits bei Diagnosestellung (vor Therapiebeginn) bestimmt werden, um einen möglichen Effekt der Medikamente auf die Antikörper-Spiegel auszuschließen. Auch das Auftreten der Polymorphismen in Untergruppen der RA sollte erforscht werden, insbesondere bei der juvenilen Form der RA (JRA), die meistens seronegativ verläuft.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob die verschiedenen TLR9-Genotypen mit einem unterschiedlichen Krankheitsverlauf assoziiert sind und der Genotyp als prognostischer Parameter dienen könnte. Da das Auftreten des C-Allels im T-1486C-Polymorphismus mit höheren RF-Spiegeln assoziiert ist, könnten Polymorphismusträger einen destruktiveren Krankheitsverlauf aufweisen. Eine früher einsetzende Basis-

medikamentation könnte daher sinnvoll sein, um den Beginn des schweren Krankheitsbildes und eine Behinderung hinauszuzögern. Auch der Erfolg einer medikamentösen Therapie sollte in Abhängigkeit vom Genotyp untersucht werden. Es wäre z.B. denkbar, dass Träger des C-Allels im T-1486C-Polymorphismus anders auf den TLR9-Antagonist Chloroquin ansprechen als Träger des Wildtyp-Allels. Es ist bekannt, dass Chloroquin und Hydroxychloroquin nur bei etwa 40% der RA-Patienten zu einer messbaren Verbesserung des Beschwerdebildes führen (Harris, 2001b). Die Frage, weshalb die restlichen 60% weniger gut auf Chloroquin ansprechen, konnte bisher nicht beantwortet werden. Bislang fehlen prädiktive Marker, die eine rationale Therapieentscheidung bei der Behandlung der RA erleichtern, d.h. die jetzige RA-Therapie basiert auf dem trial-and-error-Prinzip (Scott, 2003). Der Erfolg einer Behandlung ist für die meisten Therapeutika zudem erst nach Wochen oder Monaten beurteilbar.

Die Kenntnis des TLR9-Genotyp könnte daher eine wertvolle Hilfestellung bei der Therapieentscheidung bieten. Die Erforschung und der Einsatz weiterer TLR-Antagonisten könnte ferner eine weitere neue Behandlungsmöglichkeit der rheumatoiden Arthritis darstellen.

6 Zusammenfassung

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung der Welt. Sie verläuft meist chronisch-progressiv und führt zu schweren Behinderungen und Invalidität der Betroffenen. Trotz intensiver Forschungen bleibt die Pathogenese der RA in vielen Punkten weiterhin unklar. Sowohl Umwelt- als auch genetische Faktoren scheinen daran beteiligt. Während in der Vergangenheit Mechanismen des adaptiven Immunsystems bei der Krankheitsentstehung im Fokus des wissenschaftlichen Interesses standen, weisen zahlreiche neuere Untersuchungen auf die wichtige Rolle des angeborenen Immunsystems hin. Danach sind insbesondere die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) an der Auslösung der initialen Inflammation beteiligt. Ferner wurde gezeigt, dass TLR9 für die Anschaltung der autoreaktiven B-Zellen verantwortlich ist, die den Rheumafaktor (RF) produzieren. Genetische Polymorphismen in TLRs könnten daher zur Entwicklung einer RA prädisponieren, davor schützen oder den Verlauf der RA beeinflussen.

Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Assoziation zwischen RA-Erkrankung, dem RF-Serostatus und der Höhe des RF im Serum und genetischen Polymorphismen im TLR2- und TLR9-Gen zu analysieren.

Zur Untersuchung der TLR9-Polymorphismen T-1237C und T-1486C wurde ein real-time-PCR-basiertes Verfahren am LightCycler[®] (LC) etabliert, das den schnellen Nachweis beider Polymorphismen in einer Reaktion ermöglicht. Des Weiteren wurde ein neues Puffersystem verwendet, das die LC-PCR unter Verwendung einer konventionellen Taq-Polymerase ermöglicht. Dieses Verfahren kann unter Verwendung anderer Hybridisierungssonden auch zur Genotypisierung weiterer Polymorphismen eingesetzt werden.

Die Untersuchung der DNA von 118 RA-Patienten und einer Kontrollgruppe von 118 Personen zeigte, dass die TLR9-Polymorphismen T-1486C und T-1237C sowie der TLR2-Polymorphismus G2408A nicht für das Auftreten von RA prädisponieren. Der TLR9-Polymorphismus T-1486C könnte jedoch die Krankheitsausprägung beeinflussen. Träger des seltenen C-Allels sind signifikant häufiger RF-positiv und ihre RF-Antikörperspiegel sind höher als bei Patienten, die das C-Allel nicht aufweisen. Homozygote Polymorphismusträger weisen hierbei höhere RF-Werte auf als heterozygote Träger.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig die Assoziation von TLR9-Polymorphismen und rheumatoider Arthritis untersucht. Hierbei konnte der TLR9-Polymorphismus T-1486C als genetischer Faktor identifiziert werden, der zur Bildung von höheren RF-Spiegeln disponiert.

7 Literaturverzeichnis

- Agrawal, S. und Martin, R.R. (2003) *Was induction of HIV-1 through TLR9?* J Immunol **171**, 1621; author reply 1621-2.
- Aho, K., Heliövaara, M., Maatela, J., Tuomi, T. und Palosuo, T. (1991) *Rheumatoid factors antedating clinical rheumatoid arthritis.* J Rheumatol **18**, 1282-4.
- Akhtar, M., Watson, J.L., Nazli, A. und McKay, D.M. (2003) *Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway.* Faseb J **17**, 1319-21.
- Akira, S. (2003) *Mammalian Toll-like receptors.* Curr Opin Immunol **15**, 5-11.
- Akira, S. und Hemmi, H. (2003) *Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family.* Immunol Lett **85**, 85-95.
- Akira, S., Takeda, K. und Kaisho, T. (2001) *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.* Nat Immunol **2**, 675-80.
- Alarcon, G.S., Schrohenloher, R.E., Bartolucci, A.A., Ward, J.R., Williams, H.J. und Koopman, W.J. (1990) *Suppression of rheumatoid factor production by methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. Evidence for differential influences of therapy and clinical status on IgM and IgA rheumatoid factor expression.* Arthritis Rheum **33**, 1156-61.
- Altus, R.E. (2001) *Soziale und volkswirtschaftliche Aspekte.* In: Gräfenstein (Ed) Klinische Rheumatologie. ecomed, Landsberg/Lech, p. 29-32.
- An, H., Xu, H., Yu, Y., Zhang, M., Qi, R., Yan, X., Liu, S., Wang, W., Guo, Z., Qin, Z. und Cao, X. (2002) *Up-regulation of TLR9 gene expression by LPS in mouse macrophages via activation of NF-kappaB, ERK and p38 MAPK signal pathways.* Immunol Lett **81**, 165-9.
- Anderson, K.V., Jurgens, G. und Nusslein-Volhard, C. (1985) *Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product.* Cell **42**, 779-791.

- Arnett, F.C., Edworthy, S.M., Bloch, D.A., McShane, D.J., Fries, J.F., Cooper, N.S., Healey, L.A., Kaplan, S.R., Liang, M.H., Luthra, H.S. und et al. (1988) *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum* **31**, 315-24.
- Bauer, S., Kirschning, C.J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H. und Lipford, G.B. (2001) *Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9237-42.
- Botstein, D. und Risch, N. (2003) *Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease*. *Nat Genet* **33 Suppl**, 228-37.
- Bresnihan, B. (2002) *Anakinra as a new therapeutic option in rheumatoid arthritis: clinical results and perspectives*. *Clin Exp Rheumatol* **20**, S32-4.
- Brookes, A.J. (1999) *The essence of SNPs*. *Gene* **234**, 177-86.
- Calin, A., Elswood, J. und Klouda, P.T. (1989) *Destructive arthritis, rheumatoid factor, and HLA-DR4. Susceptibility versus severity, a case-control study*. *Arthritis Rheum* **32**, 1221-5.
- Chaudhary, P.M., Ferguson, C., Nguyen, V., Nguyen, O., Massa, H.F., Eby, M., Jasmin, A., Trask, B.J., Hood, L. und Nelson, P.S. (1998) *Cloning and characterization of two Toll/Interleukin-1 receptor-like genes TIL3 and TIL4: evidence for a multi-gene receptor family in humans*. *Blood* **91**, 4020-7.
- Chuang, T.H. und Ulevitch, R.J. (2000) *Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9*. *Eur Cytokine Netw* **11**, 372-8.
- Cohen, S., Hurd, E., Cush, J., Schiff, M., Weinblatt, M.E., Moreland, L.W., Kremer, J., Bear, M.B., Rich, W.J. und McCabe, D. (2002) *Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate: results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. *Arthritis Rheum* **46**, 614-24.
- Collins, F.S., Brooks, L.D. und Chakravarti, A. (1998) *A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation*. *Genome Res* **8**, 1229-31.

- Cotran, R., Kumar, V. und Collins, T. (1999a) *Acute and chronic Inflammation*. In: R. Cotran, V. Kumar und T. Collins (Eds), Robbins Pathologic Basis of Disease, Vol. **1**. W.B. Saunders Company, Philadelphia, p. 50-88.
- Cotran, R., Kumar, V. und Collins, T. (1999b) *Diseases of Immunity*. In: R. Cotran, V. Kumar und T. Collins (Eds), Robbins Pathologic Basis of Disease, Vol. **1**. W.B. Saunders Company, Philadelphia, p. 188-259.
- Craft, J. und Fatenejad, S. (1997) *Self antigens and epitope spreading in systemic autoimmunity*. Arthritis Rheum **40**, 1374-82.
- Deng, G.M., Nilsson, I.M., Verdrengh, M., Collins, L.V. und Tarkowski, A. (1999) *Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis*. Nat Med **5**, 702-5.
- Dorner, T., Egerer, K., Feist, E. und Burmester, G.R. (2004) *Rheumatoid factor revisited*. Curr Opin Rheumatol **16**, 246-53.
- Du, X., Poltorak, A., Wei, Y. und Beutler, B. (2000) *Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution*. Eur Cytokine Netw **11**, 362-71.
- Dunne, A. und O'Neill, L.A. (2003) *The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense*. Sci STKE **2003**, re3.
- Ebringer, A. und Wilson, C. (2000) *HLA molecules, bacteria and autoimmunity*. J Med Microbiol **49**, 305-11.
- Edwards, J.C. und Cambridge, G. (2001) *Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes*. Rheumatology (Oxford) **40**, 205-11.
- Edwards, J.C., Szczepanski, L., Szechinski, J., Filipowicz-Sosnowska, A., Emery, P., Close, D.R., Stevens, R.M. und Shaw, T. (2004) *Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis*. N Engl J Med **350**, 2572-81.
- Elkins, K.L., Rhinehart-Jones, T.R., Stibitz, S., Conover, J.S. und Klinman, D.M. (1999) *Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria*. J Immunol **162**, 2291-8.

- Equils, O., Schito, M.L., Karahashi, H., Madak, Z., Yarali, A., Michelsen, K.S., Sher, A. und Arditi, M. (2003) *Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR9 signaling results in HIV-long terminal repeat trans-activation and HIV replication in HIV-1 transgenic mouse spleen cells: implications of simultaneous activation of TLRs on HIV replication.* J Immunol **170**, 5159-64.
- Firestein, G.S. (2001) *Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis.* In: S. Ruddy, E.D. Harris und C.B. Sledge (Eds), Kelley's textbook of rheumatology, Vol. **2**. W.B. Saunders, Philadelphia, p. 921-966.
- Firestein, G.S. (2003) *Evolving concepts of rheumatoid arthritis.* Nature **423**, 356-61.
- Fortin, A., Stevenson, M.M. und Gros, P. (2002) *Susceptibility to malaria as a complex trait: big pressure from a tiny creature.* Hum Mol Genet **11**, 2469-78.
- Glossop, J.R., Nixon, N.B., Dawes, P.T., Hassell, A.B. und Matthey, D.L. (2003) *No association of polymorphisms in the tumor necrosis factor receptor I and receptor II genes with disease severity in rheumatoid arthritis.* J Rheumatol **30**, 1406-9.
- Gonzalez-Escribano, M.F., Torres, B., Aguilar, F., Rodriguez, R., Garcia, A., Valenzuela, A. und Nunez-Roldan, A. (2003) *MCP-1 promoter polymorphism in Spanish patients with rheumatoid arthritis.* Hum Immunol **64**, 741-4.
- Gordon, S. (2002) *Pattern Recognition Receptors: Doubling Up for the Innate Immune Response.* Cell **111**, 927-30.
- Grabe, N. (2002) *AliBaba2: context specific identification of transcription factor binding sites.* In Silico Biol **2**, S1-15.
- Gregersen, P.K. (1997) *Genetic Analysis of Rheumatic Diseases.* In: W.N. Kelley, E.D. Harris, S. Ruddy und C.B. Sledge (Eds), Textbook of Rheumatology. W.B. Saunders, Philadelphia, p. 209-227.
- Gregersen, P.K., Shen, M., Song, Q.L., Merryman, P., Degar, S., Seki, T., Maccari, J., Goldberg, D., Murphy, H., Schwenger, J. und et al. (1986) *Molecular diversity of HLA-DR4 haplotypes.* Proc Natl Acad Sci U S A **83**, 2642-6.
- Gregersen, P.K., Silver, J. und Winchester, R.J. (1987) *The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum **30**, 1205-13.

- Hacker, H., Mischak, H., Miethke, T., Liptay, S., Schmid, R., Sparwasser, T., Heeg, K., Lipford, G.B. und Wagner, H. (1998) *CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation*. *Embo J* **17**, 6230-40.
- Haff, L.A. und Smirnov, I.P. (1997) *Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry*. *Genome Res* **7**, 378-88.
- Hamann, L., Hamprecht, A., Gomma, A. und Schumann, R.R. (2004) *Rapid and inexpensive real-time PCR for genotyping functional polymorphisms within the Toll-like receptor -2, -4, and -9 genes*. *J Immunol Methods* **285**, 281-91.
- Harris, E.D. (2001a) *Clinical Features of Rheumatoid Arthritis*. In: S. Ruddy, E.D. Harris und C.B. Sledge (Eds), *Kelley's Textbook of Rheumatology*, Vol. **2**. W.B. Saunders Company, Philadelphia, p. 967-1000.
- Harris, E.D. (2001b) *Treatment of Rheumatoid Arthritis*. In: S. Ruddy, E.D. Harris und C.B. Sledge (Eds), *Kelley's Textbook of Rheumatology*, Vol. **2**. W.B. Saunders Company, Philadelphia, p. 1001-1022.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. und Bauer, S. (2004) *Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8*. *Science* **303**, 1526-9.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. und Akira, S. (2000) *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. *Nature* **408**, 740-5.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., Jr. und RAB, E. (1999) *Phylogenetic perspectives in innate immunity*. *Science* **284**, 1313-18.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S. und Hartmann, G. (2002) *Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides*. *J Immunol* **168**, 4531-7.
- Janeway, C.A., Jr. und Medzhitov, R. (2002) *Innate immune recognition*. *Annu Rev Immunol* **20**, 197-216.
- Janeway, C.A., Jr., Travers, P., Walport, M. und Capra, D. (1999a) *The Development of Lymphocyte Repertoires*. In: *Immunobiology*. Garland Publishing, p. 195-260.

- Janeway, C.A., Jr., Travers, P., Walport, M. und Capra, D. (1999b) *Immune responses in the absence of infection*. In: Immunobiology. Garland Publishing, p. 489-536.
- Jonsson, T., Steinsson, K., Jonsson, H., Geirsson, A.J., Thorsteinsson, J. und Valdimarsson, H. (1998) *Combined elevation of IgM and IgA rheumatoid factor has high diagnostic specificity for rheumatoid arthritis*. Rheumatol Int **18**, 119-22.
- Kaarela, K. (1985) *Prognostic factors and diagnostic criteria in early rheumatoid arthritis*. Scand J Rheumatol Suppl **57**, 1-54.
- Kaczynski, J., Cook, T. und Urrutia, R. (2003) *Sp1- and Kruppel-like transcription factors*. Genome Biol **4**, 206.
- Kiechl, S., Lorenz, E., Reindl, M., Wiedermann, C.J., Oberhollenzer, F., Bonora, E., Willeit, J. und Schwartz, D.A. (2002) *Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis*. N Engl J Med **347**, 185-92.
- Kirschning, C.J. und Schumann, R.R. (2002) *TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns*. Curr Top Microbiol Immunol **270**, 121-44.
- Kremer, J.M., Weinblatt, M.E., Bankhurst, A.D., Bulpitt, K.J., Fleischmann, R.M., Jackson, C.G., Atkins, K.M., Feng, A. und Burge, D.J. (2003) *Etanercept added to background methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis: continued observations*. Arthritis Rheum **48**, 1493-9.
- Krieg, A.M. (1995) *CpG DNA: a pathogenic factor in systemic lupus erythematosus?* J Clin Immunol **15**, 284-92.
- Krieg, A.M., Love-Homan, L., Yi, A.K. und Harty, J.T. (1998) *CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to Listeria monocytogenes challenge*. J Immunol **161**, 2428-34.
- Krieg, A.M. und Wagner, H. (2000) *Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA*. Immunol Today **21**, 521-6.
- Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A. und Klinman, D.M. (1995) *CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation*. Nature **374**, 546-9.
- Krug, A., Luker, G.D., Barchet, W., Leib, D.A., Akira, S. und Colonna, M. (2003) *Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) activates murine Natural Interferon-Producing cells (IPC) through Toll-Like Receptor 9*. Blood.

- Kyburz, D., Rethage, J., Seibl, R., Lauener, R., Gay, R.E., Carson, D.A. und Gay, S. (2003) *Bacterial peptidoglycans but not CpG oligodeoxynucleotides activate synovial fibroblasts by toll-like receptor signaling*. *Arthritis Rheum* **48**, 642-50.
- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Knetter, C.F., Lien, E., Nilsen, N.J., Espevik, T. und Golenbock, D.T. (2004) *TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome*. *Nat Immunol* **5**, 190-8.
- Lazarus, R., Klimecki, W.T., Raby, B.A., Vercelli, D., Palmer, L.J., Kwiatkowski, D.J., Silverman, E.K., Martinez, F. und Weiss, S.T. (2003) *Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies*. *Genomics* **81**, 85-91.
- Leadbetter, E.A., Rifkin, I.R., Hohlbaum, A.M., Beaudette, B.C., Shlomchik, M.J. und Marshak-Rothstein, A. (2002) *Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors*. *Nature* **416**, 603-7.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M. und Hoffmann, J.A. (1996) *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. *Cell* **86**, 973-83.
- Li, W.H. und Sadler, L.A. (1991) *Low nucleotide diversity in man*. *Genetics* **129**, 513-23.
- Lipford, G.B., Bauer, M., Blank, C., Reiter, R., Wagner, H. und Heeg, K. (1997) *CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants*. *Eur J Immunol* **27**, 2340-4.
- Lipsky, P.E. und Kavanaugh, A. (1999) *The impact of pharmaco-economic considerations on the utilization of novel anti-rheumatic therapies*. *Rheumatology (Oxford)* **38 Suppl 2**, 41-4.
- Liu, Z.Q., Deng, G.M., Foster, S. und Tarkowski, A. (2001) *Staphylococcal peptidoglycans induce arthritis*. *Arthritis Res* **3**, 375-80.
- Lorenz, E., Mira, J.P., Cornish, K.L., Arbour, N.C. und Schwartz, D.A. (2000) *A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection*. *Infect Immun* **68**, 6398-401.
- Lorenz, E., Mira, J.P., Frees, K.L. und Schwartz, D.A. (2002) *Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock*. *Arch Intern Med* **162**, 1028-32.

- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R. und Iwasaki, A. (2003) *Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells.* J Exp Med **198**, 513-20.
- MacGregor, A.J. und Silman, A.J. (1991) *Rheumatoid factors as predictors of rheumatoid arthritis.* J Rheumatol **18**, 1280-1.
- MacGregor, A.J., Snieder, H., Rigby, A.S., Koskenvuo, M., Kaprio, J., Aho, K. und Silman, A.J. (2000) *Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins.* Arthritis Rheum **43**, 30-7.
- Maini, R., St Clair, E.W., Breedveld, F., Furst, D., Kalden, J., Weisman, M., Smolen, J., Emery, P., Harriman, G., Feldmann, M. und Lipsky, P. (1999) *Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group.* Lancet **354**, 1932-9.
- Medzhitov, R. und Janeway, C.A., Jr. (1998a) *An ancient system of host defense.* Curr.Opin.Immunol. **10**, 12-15.
- Medzhitov, R. und Janeway, C.A., Jr. (1998b) *Innate immune recognition and control of adaptive immune responses.* Semin Immunol **10**, 351-3.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. und Janeway, C.A., Jr. (1997) *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.* Nature **388**, 394-7.
- Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L.P., Allavena, P. und Mantovani, A. (2000) *Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells.* J Immunol **164**, 5998-6004.
- Nepom, G.T., Byers, P., Seyfried, C., Healey, L.A., Wilske, K.R., Stage, D. und Nepom, B.S. (1989) *HLA genes associated with rheumatoid arthritis. Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes.* Arthritis Rheum **32**, 15-21.
- Newkirk, M.M. (2002) *Rheumatoid factors: host resistance or autoimmunity?* Clin Immunol **104**, 1-13.

- Newkirk, M.M. und Rauch, J. (1994) *Monospecific but not polyreactive human hybridoma rheumatoid factors exhibit preferential binding specificities for IgG3 and IgG4*. *Rheumatol Int* **13**, 203-9.
- Nussbaum, R.L., McInnes, R. und Huntington, F.W. (2001) *Genetic Variation in Individuals: Mutation and Polymorphism*. In: R.L. Nussbaum (Ed) *Thompson & Thompson genetics in medicine*. W.B. Saunders, Philadelphia, p. 79-94.
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., Achkar, J.P., Brant, S.R., Bayless, T.M., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nunez, G. und Cho, J.H. (2001) *A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease*. *Nature* **411**, 603-6.
- Ollier, W. und Worthington, J. (1997) *Small fish in a big pond*. *Br J Rheumatol* **36**, 931-2.
- Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L. und Aderem, A. (2000) *The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13766-71.
- Paimela, L., Palosuo, T., Leirisalo-Repo, M., Helve, T. und Aho, K. (1995) *Prognostic value of quantitative measurement of rheumatoid factor in early rheumatoid arthritis*. *Br J Rheumatol* **34**, 1146-50.
- Pope, R.M., Lessard, J. und Nunnery, E. (1986) *Differential effects of therapeutic regimens on specific classes of rheumatoid factor*. *Ann Rheum Dis* **45**, 183-9.
- Pugner, K.M., Scott, D.I., Holmes, J.W. und Hieke, K. (2000) *The costs of rheumatoid arthritis: an international long-term view*. *Semin Arthritis Rheum* **29**, 305-20.
- Richardson, B., Scheinbart, L., Strahler, J., Gross, L., Hanash, S. und Johnson, M. (1990) *Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum* **33**, 1665-73.
- Risch, N. (2001) *The genetic epidemiology of cancer: interpreting family and twin studies and their implications for molecular genetic approaches*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**, 733-41.
- Roche. (1998) *The LightCycler - the smartest innovation for more efficient PCR*. *Biochemica* **2**, 4-7.

- Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A. und Bazan, J.F. (1998) *A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll*. Proc Natl Acad Sci U S A **95**, 588-93.
- Rose, H., Ragan, C., Pearce, E. und Lipman, M. (1949) *Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis*. Proc Soc Exp Biol Med, 68:1.
- Rozen, S. und Skaletsky, H. (2000) *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Methods Mol Biol **132**, 365-86.
- Rynes, R.I. (2001) *Antimalarial Drugs*. In: S. Ruddy, E.D. Harris und C.B. Sledge (Eds), Kelley's Textbook of Rheumatology, Vol. **1**. W.B. Saunders, Philadelphia, p. 859-867.
- Sanchez, E., Orozco, G., Lopez-Nevot, M.A., Jimenez-Alonso, J. und Martin, J. (2004) *Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus*. Tissue Antigens **63**, 54-7.
- Schaefferbeke, T., Renaudin, H., Clerc, M., Lequen, L., Vernhes, J.P., De Barbeyrac, B., Bannwarth, B., Bebear, C. und Dehais, J. (1997) *Systematic detection of mycoplasmas by culture and polymerase chain reaction (PCR) procedures in 209 synovial fluid samples*. Br J Rheumatol **36**, 310-4.
- Schroder, N.W., Hermann, C., Hamann, L., Gobel, U.B., Hartung, T. und Schumann, R.R. (2003) *High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR*. J Mol Med **81**, 368-72.
- Scott, D.L. (2003) *Genotypes and phenotypes: should genetic markers and clinical predictors drive initial treatment decisions in rheumatic diseases?* Curr Opin Rheumatol **15**, 213-8.
- Seibl, R., Birchler, T., Loeliger, S., Hossle, J.P., Gay, R.E., Saurenmann, T., Michel, B.A., Seger, R.A., Gay, S. und Lauener, R.P. (2003) *Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium*. Am J Pathol **162**, 1221-7.
- Smirnova, I., Mann, N., Dols, A., Derkx, H.H., Hibberd, M.L., Levin, M. und Beutler, B. (2003) *Assay of locus-specific genetic load implicates rare Toll-like receptor 4 mutations in meningococcal susceptibility*. Proc Natl Acad Sci U S A **100**, 6075-80.

- Smolen, J.S. und Steiner, G. (2003) *Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis*. Nat Rev Drug Discov **2**, 473-88.
- Sorensen, T.I., Nielsen, G.G., Andersen, P. und Teasdale, T. (1988) *Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees*. N Engl J Med **318**, 727-732.
- Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Borschert, K., Hacker, H., Heeg, K. und Wagner, H. (1997) *Bacterial DNA causes septic shock*. Nature **386**, 336-7.
- Stacey, K.J., Sweet, M.J. und Hume, D.A. (1996) *Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA*. J Immunol **157**, 2116-22.
- Steiner, G. und Smolen, J. (2002) *Autoantibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance*. Arthritis Res **4 Suppl 2**, S1-5.
- Stuhlmüller, B., Ungethüm, U., Scholze, S., Martínez, L., Backhaus, M., Kraetsch, H.G., Kinne, R.W. und Burmester, G.R. (2000) *Identification of known and novel genes in activated monocytes from patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum **43**, 775-90.
- Sweet, M.J., Campbell, C.C., Sester, D.P., Xu, D., McDonald, R.C., Stacey, K.J., Hume, D.A. und Liew, F.Y. (2002) *Colony-stimulating factor-1 suppresses responses to CpG DNA and expression of toll-like receptor 9 but enhances responses to lipopolysaccharide in murine macrophages*. J Immunol **168**, 392-9.
- Takeda, K., Kaisho, T. und Akira, S. (2003) *Toll-like receptors*. Annu Rev Immunol **21**, 335-76.
- Takeuchi, O. und Akira, S. (2002) *Genetic approaches to the study of Toll-like receptor function*. Microbes and Infection **4**, 887-895.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. und Akira, S. (1999) *Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components*. Immunity **11**, 443-51.
- Thomas, C. (1998) *Entzündungen*. In: C. Thomas (Ed) Histopathologie. Schattauer, Stuttgart, New York, p. 19.
- Tighe, H. und Carson, D.A. (2001) *Rheumatoid Factor*. In: S. Ruddy, E.D. Harris und C.B. Sledge (Eds), Kelley's textbook of rheumatology, Vol. **1**. W. B. Saunders, Philadelphia, p. 151-158.

- van der Heijden, I.M., Wilbrink, B., Tchetverikov, I., Schrijver, I.A., Schouls, L.M., Hazenberg, M.P., Breedveld, F.C. und Tak, P.P. (2000) *Presence of bacterial DNA and bacterial peptidoglycans in joints of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides*. *Arthritis Rheum* **43**, 593-8.
- Villiger, P.M. und Brühlmann, P. (1999) *Rheumatoide Arthritis*. In: TIM - Thiemes innere Medizin. Thieme, Stuttgart, New York, p. 1622-1631.
- Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J.H., Wyllie, D.H., Dower, S.K. und Segal, D.M. (2001) *Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells*. *J Immunol* **166**, 249-55.
- von Aulock, S., Schroder, N.W., Gueinzius, K., Traub, S., Hoffmann, S., Graf, K., Dimmeler, S., Hartung, T., Schumann, R.R. und Hermann, C. (2003) *Heterozygous toll-like receptor 4 polymorphism does not influence lipopolysaccharide-induced cytokine release in human whole blood*. *J Infect Dis* **188**, 938-43.
- Vyse, T.J. und Todd, J.A. (1996) *Genetic analysis of autoimmune disease*. *Cell* **85**, 311-8.
- Waalder, E. (1940) *On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles*. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 17:172-188.
- Weinblatt, M.E., Keystone, E.C., Furst, D.E., Moreland, L.W., Weisman, M.H., Birbara, C.A., Teoh, L.A., Fischkoff, S.A. und Chartash, E.K. (2003) *Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial*. *Arthritis Rheum* **48**, 35-45.
- Wittwer, C.T. (1991) *Buffers and reaction compounds for rapid cycling, The RapidCyclist*. Idaho Technology **1**.
- Wittwer, C.T., Ririe, K.M., Andrew, R.V., David, D.A., Gundry, R.A. und Balis, U.J. (1997) *The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control*. *Biotechniques* **22**, 176-81.
- Wolfe, F., Cathey, M.A. und Roberts, F.K. (1991) *The latex test revisited. Rheumatoid factor testing in 8,287 rheumatic disease patients*. *Arthritis Rheum* **34**, 951-60.

- Wyllie, D.H., Kiss-Toth, E., Visintin, A., Smith, S.C., Boussouf, S., Segal, D.M., Duff, G.W. und Dower, S.K. (2000) *Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses*. J Immunol **165**, 7125-32.
- Yung, R.L., Quddus, J., Chrisp, C.E., Johnson, K.J. und Richardson, B.C. (1995) *Mechanism of drug-induced lupus. I. Cloned Th2 cells modified with DNA methylation inhibitors in vitro cause autoimmunity in vivo*. J Immunol **154**, 3025-35.
- Zarembek, K.A. und Godowski, P.J. (2002) *Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines*. J Immunol **168**, 554-61.
- Zeuner, R.A., Ishii, K.J., Lizak, M.J., Gursel, I., Yamada, H., Klinman, D.M. und Verthelyi, D. (2002) *Reduction of CpG-induced arthritis by suppressive oligodeoxynucleotides*. Arthritis Rheum **46**, 2219-24.
- Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M.S., Greenblatt, M.B., Bussey, C., Flavell, R.A. und Ghosh, S. (2004) *A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria*. Science **303**, 1522-6.

8 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Akute und chronische Inflammation.....	2
Abb. 2: Signaltransduktion bei IL-1R/TLR/Toll	12
Abb. 3: Das TLR9-Gen mit einer Auswahl von SNPs	16
Abb. 4: Genotypisierung am LightCycler.....	29
Abb. 5: Erste negative Ableitung der Schmelzkurven	30
Abb. 6: Prinzip der TLR9-LightCycler-PCR.....	31
Abb. 7: Neue c-Rel/NF- κ B-Bindungsstelle durch den T-1237C-Polymorphismus.....	39
Abb. 8: Zusätzliche Sp-1-Bindungsstelle durch T/C-Austausch beim T-1486C-Polymorphismus	39
Abb. 9: Repräsentative Schmelzkurven des T-1237C-Polymorphismus.....	41
Abb. 10: Repräsentative Schmelzkurven des T-1486C-Polymorphismus.....	42
Abb. 11: Prinzip des RFLP.....	43
Abb. 12: T-1237C-Polymorphismus, Gelelektrophorese mit charakteristischem Bandenmuster nach BstNI-Verdau.....	44
Abb. 13: T-1486-Polymorphismus, Gelelektrophorese mit charakteristischem Bandenmuster nach AflII-Verdau.	44

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: TLRs mit ihren wichtigsten Liganden	13
Tab. 2: Primer für Standard-PCR.....	23
Tab. 3: Primer für real-time-PCR	23
Tab. 4: Sonden für real-time-PCR	24
Tab. 5: Parameter für die LC-PCR zur TLR9-Genotypisierung (Roche-Puffer)	32
Tab. 6: Parameter für die LC-PCR zur TLR9-Genotypisierung (ABgene-Puffer)	32
Tab. 7: Parameter für die LC-PCR zur G2408A-Genotypisierung (Roche-Puffer)	33
Tab. 8: Parameter für die LC-PCR zur G2408A-Genotypisierung (ABgene-Puffer)....	34
Tab. 9: PCR-Parameter zur Genotypisierung des T-1486C-Polymorphismus mittels RFLP	34
Tab. 10: PCR-Parameter zur Genotypisierung des T-1237C-PM mittels RFLP.....	35
Tab. 11: PCR-Parameter zur Genotypisierung des G2408A-PM mittels RFLP	36
Tab. 12: Parameter zum Cycle-Sequencing von PCR-Produkten	37
Tab. 13: Schmelzpunkte der Sonden.....	40
Tab. 14: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen im TLR9-PM T-1237C.....	45
Tab. 15: Häufigkeit der verschiedenen Allele im TLR9-PM T-1237C	46
Tab. 16: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen des TLR9-PM T-1486C.....	47
Tab. 17: Häufigkeit der verschiedenen Allele im TLR9-PM T-1486C.....	48
Tab. 18: Häufigkeit der verschiedenen Genotypen des TLR2-PM G2408A.....	49
Tab. 19: Allelhäufigkeit des TLR9-Polymorphismus T-1237C bei RF-positiven und RF- negativen Patienten.....	50
Tab. 20: Allelhäufigkeit des TLR9-Polymorphismus T-1486C bei RF-positiven und RF- negativen Patienten.....	50
Tab. 21: Allelhäufigkeit des TLR2-Polymorphismus G2408A bei RF-positiven und RF- negativen Patienten.....	50
Tab. 22: T-1486C-Genotypen bei RF-positiven und –negativen RA-Patienten	51
Tab. 23: RF-Werte (ELISA, units/ml) bei den verschiedenen TLR2- und TLR9- Genotypen	52

10 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACR	American College of Rheumatology
AK	Antikörper
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
DMARD	krankheitsbeeinflussende antirheumatische Medikamente (disease modifying antirheumatic drugs)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylene diamine tetraacetic acid)
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
HLA	Humane Leukozytenantigene (human leukocyte antigen)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1R	IL-1-Rezeptor
IRAK	IL-1 receptor-associated kinase
I κ B	Inhibitor von κ B
KI	Konfidenzintervall
LC	LightCycler [®]
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure (lipoteichonic acid)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
n.s.	nicht signifikant
NF- κ B	Nukleärer Transkriptionsfaktor κ B (nuclear transcription factor κ B)
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
ODN	Oligonukleotide
OR	Odds Ratio
PAMP	Pathogenassoziierte molekulare Muster (pathogen associated molecular patterns)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)

PGN	Peptidoglykan
PM	Polymorphismus
PRR	Mustererkennender Rezeptor (pattern recognition receptor)
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism)
Tab.	Tabelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF6	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziiertes Faktor 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6)

11 Erklärung an Eides statt

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt.

12 Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben, möchten ich an dieser Stelle ganz herzlich für ihre Hilfe und Unterstützung danken:

Prof. Dr. Ralf Schumann, für die Übernahme dieses interessanten Themas als Doktorvater sowie die Freiräume und Unterstützung, die er mir bei der Ausgestaltung dieser Arbeit gegeben hat

Dr. Lutz Hamann und Dr. Na-Ri Oh für die gute Betreuung im Labor

Dem Team der AG Schumann, Sabine Bobbe, Fränzi Creutzburg, Diana Wöllner und Judith Büttner, für ihre Hilfe und die nette Atmosphäre im Labor

Dr. Stuhlmüller und Dr. Häupl von der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie der Charité sowie ihrer Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und Betreuung von klinischer Seite

Silvia Pade von der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie der Charité für Hilfe mit der klinischen Datenbank

Dr. Nicolas Schröder für konstruktive Hilfe und anregende Diskussionen bei der Planung der Arbeit

Thomas Tapmeier, Jana Eckert und Dr. Na-Ri Oh für die kritische Durchsicht der Arbeit

Meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung, die mir das Studium und die Doktorarbeit ermöglicht hat