

# **Genetische Risikofaktoren des systemischen Lupus Erythematoses**

Von dem Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.  
genehmigte Dissertation  
von

Dipl.-Biochem. Tanja Momot  
geboren am 06.12.1970  
in Kosch-Tegirmen, Kirgisistan

2004

Diese Arbeit wurde im Zeitraum vom 01.05.2000 bis zum 31.05.2004 in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Torsten Witte, Abteilung Klinische Immunologie, Medizinische Hochschule Hannover (Direktor Prof. Dr. Reinhold E. Schmidt) mit Unterstützung von Fritz-Bender-Stiftung, HiLF Medizinische Hochschule Hannover und Kompetenznetz Rheuma: Projekt C 2.12, BMBF/DLR angefertigt.

Referent:

Prof. Dr. W. Müller

Korreferent:

Prof. Dr. B. Otto

Tag der Promotion:

10.11.2004

## ***Meinen Eltern***

## Zusammenfassung

Der systemische Lupus erythematodes (SLE) und Sklerodermie sind komplexe, chronisch verlaufende Autoimmunerkrankungen mit systemischer Organbeteiligung. Im Rahmen des SLE kommt es zur Produktion pathogener Autoantikörper gegen eigene Zellbestandteile, vor allem gegen nukleäre Antigene. Dabei entstehen Immunkomplexe, die im Blut zirkulieren und sich in den Blutgefäßen ablagern und chronisch-entzündliche Gewebeschädigungen verursachen. Neben ethnischen sowie Umweltfaktoren und Geschlecht ist die genetische Prädisposition der wichtigste Risikofaktor des SLE. Durch zahlreiche Familienstudien wurden mehrere humane Chromosomenregionen mit potentiellen Risikogenen auf den Chromosomen 1, 2, 6, 12, 19 charakterisiert. Die Beteiligung genetischer Faktoren ergibt sich auch aus Beobachtungen an Tiermodellen. Die murinen Risikoregionen wurden auf den Chromosomen 1, 4, 7 und 17 identifiziert. Die Risikogene des SLE sind im Einzelnen noch unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war, potentielle Risikogene des SLE zu identifizieren. Diese sollten durch Genchipexpressionsanalysen von SLE-Patienten im akuten Krankheitsstadium (SLE-Schub) und im Ruhestadium (SLE-Remission) bestimmt werden. Des Weiteren sollten Kandidatengene untersucht werden, die an der Abwehr von viralen bzw. bakteriellen Infektionserregern als potentielle Auslöser von Autoimmunerkrankungen beteiligt sind. Geeignete Kandidatengene sollten genauer analysiert und anschließend die Assoziationen von Polymorphismen oder Allelen solcher Gene mit SLE bzw. Sklerodermie untersucht werden.

Mittels Genchipexpressionsanalyse wurden 75 im SLE-Schub hochregulierte und 170 herunterregulierte Gene bestimmt. Zu diesen gehörten *Killer cell immunoglobulin (Ig)-like Receptors* (KIR), die im Risikolocus des SLE 19q13.4 lokalisiert und an der Virusabwehr beteiligt sind. Jedes Individuum hat ein eigenes genetisch determiniertes Repertoire (KIR-Phänotyp) an aktivierenden (KIR DS) und inhibitorischen KIR (KIR DL). Bislang wurden ca. 50 unterschiedliche KIR-Phänotypen beschrieben. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass SLE-Patienten weitere in der Fachliteratur nicht beschriebene KIR-Phänotypen aufweisen. Dabei zeigten SLE-Patienten signifikant häufiger aktivierende KIR im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Wir haben mit Hilfe von

quantitativen Analysen von RNA-Proben bei Lupus-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen oder zu Lupus-Patienten in Krankheitsremission demonstrieren können, dass die aktivierenden KIR im SLE-Schub hochreguliert werden. Daneben konnten wir eine hochsignifikante Assoziation der KIR-Kombination 2DS2+ 2DL2- mit Sklerodermie demonstrieren.

Ferner haben wir die Rolle des mannanbindenden Lektins (MBL) untersucht. Laut Fachliteratur ist die pathogenetische Relevanz des MBL als genetische Risikofaktor des SLE umstritten. Im Rahmen unserer Untersuchungen an über 280 SLE-Patienten konnten wir keine Assoziation zwischen MBL und dem SLE feststellen.

Somit sind KIR neue potentielle Risikofaktoren des SLE und anderer Autoimmunerkrankungen und könnten in Zukunft zu einer Zielstruktur für Therapiemöglichkeiten werden könnten.

Schlagworte: SLE, KIR, Risikogene

## **Summary**

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and scleroderma are chronic, complex, inflammatory autoimmune diseases characterized by autoantibody production and immune complex formation. The tissue deposition of antibodies and immune complexes can cause inflammation and injury of multiple organs. SLE susceptibility is inherited as a multifactorial genetic disease in both humans and mouse models. Using lupus-prone mice, several murine SLE susceptibility loci such as chromosomes 1, 4, 7 and 17 have been characterized. In humans several susceptibility regions including chromosome 1, 2, 6, 12 and 19 have been identified.

The aim of the study was to identify the susceptibility genes of SLE.

We have performed gene expression chip analysis from RNA of SLE flare and SLE remission patients to look for the candidate genes in SLE.

The results indicated the presence of 75 up- and 170 down-regulated genes in SLE flare subjects, several being Killer cell Immunoglobulin (Ig)-like Receptors (KIR). KIR are located on the chromosome 19q13.4. They can be classified into two activating (KIR DS) and inhibitory KIR (KIR DL). KIR play an important role in the regulation of immune response via T cells and are inherited in a highly variable way. Therefore, the individual KIR repertoire is diverse. So far approximately 50 combinations of KIR, called as “phenotypes”, have been defined. We detected further phenotypes of KIR in SLE patients. The new phenotypes from SLE patients were characterized by an overexpression of activating KIR. KIR genotyping from scleroderma patients revealed that the combination KIR2DS2+ KIR2DL2- is significantly associated with scleroderma. There is a strong indication of association of KIR with SLE and scleroderma.

We also analyzed the role of mannanbinding Lectin (MBL) as a genetic risk factor for SLE. Controversial results have been obtained with regard to correlation of MBL variant alleles with autoimmune diseases. We examined in a large multicenter study more than 280 SLE patients for MBL deficiency as a risk factor for SLE and further complications of the disease. We did not find an association of MBL variant alleles with SLE.

Our results indicate that KIR are the novel potential risk factors of SLE and other autoimmune disorders and may provide a target for future therapeutic interventions.

Keywords: SLE, KIR, susceptibility genes

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Autoimmunität und Autoimmunerkrankungen .....	1
1.1.1	Systemischer Lupus erythematoses (SLE).....	1
1.1.1.1	Vorkommen, Häufigkeit und Ätiologie des SLE.....	1
1.1.1.2	Krankheitsbild des SLE .....	2
1.1.2	Sklerodermie.....	4
1.1.2.1	Vorkommen, Häufigkeit und Ätiologie der Sklerodermie .....	4
1.1.2.2	Krankheitsbild der Sklerodermie .....	5
1.2	Ursachen von Autoimmunerkrankungen .....	6
1.2.1	Umweltfaktoren.....	6
1.2.2	Genetische Risikofaktoren .....	7
1.2.2.1	Gene des MHC .....	8
1.2.2.2	Komplement-Gene .....	9
1.2.2.3	Fc-Rezeptor-Gen .....	9
1.2.2.4	PDCD1-Gen .....	10
1.2.2.5	Mannanbindendes Lektin (MBL) .....	10
1.2.2.6	SLE-Risikolocus auf dem Chromosom 19.....	12
1.3	Zielsetzung.....	14
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Material .....	15
2.1.1	Geräte.....	15
2.1.2	Oligonukleotide.....	15
2.1.2.1	KIR-Primer .....	16
2.1.2.2	MBL-PCR Primer .....	16
2.1.3	Primer und Sonden für quantitative RT-PCR (TaqMan) .....	17
2.1.4	Blutproben .....	19
2.1.5	Puffer und Lösungen .....	19
2.1.6	Molekulargewichtsstandards.....	20
2.1.7	Chemikalien .....	21
2.1.8	Antikörper .....	21
2.1.9	Enzyme.....	21
2.1.10	Kits.....	22

---

2.1.11	Sonstige Materialien .....	22
2.2	Methoden .....	23
2.2.1	DNA-Isolierung aus Vollblut .....	23
2.2.2	RNA-Isolierung aus Vollblut .....	23
2.2.3	Agarosegelelektrophorese für DNA .....	23
2.2.4	RNA-Gelelektrophorese .....	24
2.2.5	Polymerase- Kettenreaktion .....	24
2.2.6	Quantitative RT-PCR .....	26
2.2.6.1	Theorie der real-time quantitativen RT-PCR (TaqMan-PCR) .....	26
2.2.6.2	Definition der verwendeten Werte .....	28
2.2.6.3	Auswahl der Primer und der Sonden .....	28
2.2.6.4	Verdünnung der Sonde .....	30
2.2.6.5	Optimierung der einzelnen TaqMan Sets .....	31
2.2.6.6	Pipettierschema einer TaqMan PCR .....	32
2.2.6.7	Analyse der TaqMan PCR .....	33
2.2.7	Restriktionsendonuklease-Verdau .....	34
2.2.8	Aufreinigung von PCR-Produkten .....	34
2.2.9	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	34
2.2.10	Affymetrix GeneChip Analyse .....	35
2.2.11	Statistische Auswertung .....	36
2.2.12	Separation von PBL aus Vollblut .....	36
2.2.13	Durchflusszytometrie (FACS) .....	37
2.2.14	Durchflusszytometrische Analysen .....	38
3	Ergebnisse .....	39
3.1	Affymetrix GeneChip Analyse .....	39
3.1.1	Vorbereitung von RNA-Proben für die Affymetrix GeneChip Analyse .....	39
3.1.2	Affymetrix GeneChip Analyse .....	39
3.1.3	Affymetrix GeneChip Ergebnisse .....	40
3.2	KIR-Phänotypisierung .....	47
3.2.1	Bekannte KIR-Phänotypen .....	47
3.2.2	Neue KIR-Phänotypen bei SLE und Sklerodermie .....	50
3.2.3	Quantitative RT-PCR (TaqMan) Analyse beim SLE .....	54
3.2.4	Durchflusszytometrische Analyse von KIR .....	58
3.3	Assoziation von SLE und Sklerodermie mit MBL-Allelen .....	60



3.3.1	RFLP-Analyse der MBL-Allele mittels PCR .....	60
3.3.2	Statistische Auswertung von MBL-Defekten.....	63
4	Diskussion .....	65
5	Ausblick .....	73
6	Abkürzungsverzeichnis.....	74
7	Literatur .....	76
8	Lebenslauf .....	88
9	Danksagung .....	92

# **1 Einleitung**

## **1.1 Autoimmunität und Autoimmunerkrankungen**

Die adaptive Immunantwort spielt eine wesentliche Rolle bei der Abwehr von Infektionen und ist damit unerlässlich zur Aufrechterhaltung der Gesundheit. Manchmal kommt es aber dazu, dass die spezifische adaptive Immunantwort fehlschlägt, und abnorme Immunreaktionen gegen körpereigene Antigene, so genannte Autoantigene, hervorgerufen werden. Das führt zu schweren Erkrankungen mit Immunabwehrreaktionen gegen körpereigene Antigene. Die Klassifizierung solcher Autoimmunerkrankungen erfolgt anhand der Ausdehnung der Gewebeschädigung. Es werden organspezifische und systemische Autoimmunerkrankungen unterschieden. Zu den organspezifischen Autoimmunerkrankungen zählen z.B. insulinabhängiger Diabetes mellitus (IDDM) Typ I, Basedow-Krankheit, multiple Sklerose und Goodpasture-Syndrom. Systemischer Lupus erythematodes (SLE), Sklerodermie, Sjögren-Syndrom und rheumatoide Arthritis gehören hingegen zu den systemischen Autoimmunerkrankungen. Die Autoantigene, die bei den Krankheiten dieser beiden Gruppen erkannt werden, werden selbst organspezifisch bzw. systemisch exprimiert.

### **1.1.1 Systemischer Lupus erythematodes (SLE)**

Der systemische Lupus erythematodes (SLE) ist eine systemische und chronisch verlaufende Autoimmunerkrankung, bei der Autoantikörper gegen ubiquitär und häufig vorkommende intrazelluläre Antigene, wie beispielsweise DNA, Histone, Ribosomen oder snRNP gebildet werden. Dabei entstehen Immunkomplexe aus Antigenen, Antikörpern und Komplement, die sich in kleinen Blutgefäßen vieler Organe ablagern und dort chronische entzündliche Gewebeschädigungen, wie z.B. Glomerulonephritis, Vaskulitis und Hautausschlag, verursachen.

#### **1.1.1.1 Vorkommen, Häufigkeit und Ätiologie des SLE**

Der SLE ist eine relativ häufige Erkrankung und kommt weltweit mit unterschiedlichen Prävalenzen vor. Die Inzidenz des SLE liegt in der

Allgemeinbevölkerung bei 6-7 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Die Prävalenz der Erkrankung liegt in Europa bei 40 pro 100.000 Einwohner und variiert in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und ethnischer Zugehörigkeit (1; 2).

Frauen sind häufiger als Männer betroffen. 90% aller SLE-Patienten sind Frauen im gebärfähigen Alter. Die geschlechtsspezifische und altersabhängige Inzidenz und Prävalenz des SLE ist auf hormonelle Faktoren der SLE-Pathogenese zurückzuführen.

Ethnische Faktoren scheinen ebenfalls eine wichtige prädisponierende Rolle zu spielen. In den USA erkranken Frauen afrikanischer Herkunft 3 mal häufiger (Prävalenz 1 : 245) an SLE als weiße Frauen (Prävalenz 1 : 700) im entsprechenden Alter. Für Frauen chinesischer, japanischer, philippinischer und hawaiischer Herkunft wurden ebenfalls hohe Prävalenzwerte berichtet (2; 3).

#### **1.1.1.2 Krankheitsbild des SLE**

Der SLE verläuft unter Multiorganbeteiligung, es liegen aber nicht immer alle Symptome gleichzeitig vor. Um weltweit vergleichbare Studien zu ermöglichen, legte das „American College of Rheumatology“ (ACR) im Jahre 1982 11 Klassifikationskriterien (Tab.1) für den SLE fest (4). Sind 4 oder mehr der 11 ACR-Kriterien gleichzeitig oder im Verlauf eines beliebigen Zeitraums positiv, so kann mit 95%iger Wahrscheinlichkeit die Diagnose eines SLE gestellt werden.

Allgemeinsymptome des SLE sind Müdigkeit, Leistungsabfall, Fieber, Hautveränderungen (Raynaud-Beschwerden), Lymphknotenschwellungen und abnorme Sonnenempfindlichkeit.

<b>Kriterium</b>	<b>Definition</b>
Schmetterlingserythem	flach oder erhaben, auf beiden Wangen, den Nasenrücken aussparend
Diskoider Lupus	erythematöse, erhabene Flecken mit keratotischer Schuppung und atrophischen Narben, vorzugsweise an lichtexponierten Stellen
Photosensitivität	rasch auftretender Hautausschlag nach Sonnenlichtexposition (auch anamnestisch)

Schleimhautulzerationen	schmerzlose orale oder nasopharyngeale Ulzerationen
Arthritis	nicht-erosive Arthritis an mehr als zwei peripheren Gelenken (Druckschmerz, Schwellung, Erguß)
Serositis	dokumentierte Pleuritis oder Perikarditis
Glomerulonephritis	anhaltende Proteinurie >0,5g/Tag oder Zylindrurie (hyaline, erythrozytäre, granulierte)
Neurologische Symptome	Krampfanfälle oder Psychosen bei Abwesenheit metabolischer oder medikamentöser Ursachen
Hämatologische Befunde	immunhämolytische Anämie (Retikulozytose, Coombs-Test pos. oder Leukopenie <4000/mm <sup>3</sup> oder Lymphopenie <1500/mm <sup>3</sup> oder Thrombozytopenie <100 000/mm <sup>3</sup> )
Immunologische Befunde	positiver LE-Zell-Test oder ds-DNS-Antikörper-Nachweis oder Sm-Antikörper-Nachweis oder falsch positive Luesreaktion
Antinukleäre Antikörper (ANA)	abnorm hoher ANA-Titer bei fehlender Einnahme von Medikamenten, die zu einem „drug-induced SLE“ führen können

**Tabelle 1: ACR-Kriterien zur Klassifikation des SLE.** Bei gleichzeitigem oder seriellem Nachweis von 4 oder mehr der 11 Kriterien während eines beliebigen Beobachtungszeitraumes gilt ein Patient als an einem SLE erkrankt.

Hautsymptome betreffen etwa 80% der SLE-Patienten. Die wichtigsten sind akute erythematöse Läsionen an lichtexponierten Stellen, Schmetterlingserythem (Abb.1), lokalisierte diskoide, hyperkeratotische Hautläsionen in Verbindung mit Vitiligo und Hyperpigmentation sowie eine fleckige Alopezie und Mundschleimhautulzerationen.



**Abb.1: Schmetterlingserythem.** Hautläsionen beim SLE.

Charakteristisch für den SLE ist eine nicht erosive Arthritis der kleinen Hand- und Fingergelenke in Form von Polyarthralgien wechselnder Intensität und Dauer. Nur selten kommt es zu destruierenden Gelenkveränderungen.

Als Ausdruck einer Vaskulitis der serösen Membranen kommt es häufig zu einer Polyserositis (50-70%). Eine Perikarditis beobachtet man bei 20%, eine Pleuritis bei 50% der SLE-Patienten.

Symptome des zentralen oder peripheren Nervensystems findet man bei 35-70% der SLE-Patienten. Dazu zählen Krampfanfälle, Psychosen, Depressionen, hirnormale Psychosyndrome, transverse Myelitis und periphere Neuropathien.

Die sogenannte Lupusnephritis übt einen gravierenden Einfluss auf die Prognose des SLE-Patienten aus. Etwa 50% der SLE-Patienten entwickeln eine Nephritis. In nahezu allen betroffenen Nieren lassen sich immunkomplexbedingte Veränderungen nachweisen. Diese Veränderungen reichen von reversiblen mesangialen Läsionen (fokal proliferative Glomerulonephritis, etwa 1/3) bis hin zur progredient verlaufenden membranösen Glomerulonephritis (2/3) und sogar in seltenen Fällen zur rapid progressiven extrakapillären Glomerulonephritis.

Bei der Mehrzahl der SLE-Patienten lassen sich hämatopoetische Abnormitäten feststellen. Am häufigsten sind Anämie, Lymphopenie und Granulozytopenie und weniger häufig eine Thrombozytopenie. Als Grund für die Störungen werden ein vermehrter peripherer Abbau durch Autoantikörper und Komplement und eine Knochenmarkdysfunktion verantwortlich gemacht.

### **1.1.2 Sklerodermie**

Die Sklerodermie ist eine systemische Erkrankung unbekannter Ätiologie, die durch eine Verdickung und Verhärtung der Haut mit Beteiligung der Viszeralorgane gekennzeichnet ist. Die Sklerodermie führt zu einer langsam fortschreitenden Fibrose, in späten Stadien zu einer Sklerose.

#### **1.1.2.1 Vorkommen, Häufigkeit und Ätiologie der Sklerodermie**

Die Inzidenz der Sklerodermie beträgt ca. 2 pro 100.000 Einwohner pro Jahr, die Prävalenz liegt bei 1 : 20.000. Frauen sind ähnlich wie beim SLE häufiger

als Männer betroffen. Die ersten Symptome der Erkrankung treten gewöhnlich im 3. bis 5. Lebensjahrzehnt auf. Kinder erkranken sehr selten an Sklerodermie, eine Altersgrenze ist nicht beschrieben.

### 1.1.2.2 Krankheitsbild der Sklerodermie

Die Symptome der Sklerodermie sind ebenso wie die des SLE sehr vielfältig und stellen ein diagnostisches Problem dar. Man teilt die Sklerodermie in eine umschriebene und eine generalisierte Form ein.

Bei der umschriebenen Form, auch „zirkumskripte Sklerodermie“ genannt, finden sich Veränderungen in der Kutis, Subkutis und der Muskulatur, wobei die Hände nicht betroffen sind.

Das klinische Erscheinungsbild der generalisierten Form der Sklerodermie reicht vom isolierten Hautbefall bis hin zur generalisierten Hautsklerose. Mehr als 50% der Patienten entwickeln viszerale Manifestationen, die die Nieren, die Lungen, das Herz und den Gastrointestinaltrakt betreffen.

Die Symptome Raynaud-Syndrom und Gefäßveränderungen treten bei ca. 95% der Sklerodermie-Patienten auf und beginnen meist mit Hautveränderungen (Abb.2) und/oder Gelenkbeschwerden.



**Abb.2: Sklerodermie.** Dargestellt sind die kalkhaltige Ablagerungen: Calcinosis cutis auf den Fingern von Sklerodermie-Patienten (rechts) und typische Ödeme auf Händen und Fingern bei Sklerodermie (links).

Das Raynaud-Syndrom ist durch episodisches Abblassen der Haut und anschließend blaue bzw. ziegelrote Verfärbungen charakterisiert. Es wird von Missempfindungen, Spannungsgefühl und auch Schmerzen, v.a. an den Fingern, aber auch Zehen, begleitet. Die Symptomatik wird meist durch innere (Stress) oder äußere (Kälte) Reize ausgelöst. Die zunehmende Minderperfusion führt zu Nekrosen und Ulzerationen an den Fingerspitzen (Rattenbißnekrosen), mit nachfolgender Narbenbildung, oder Sekundärinfektion mit Ausbildung von Gangrän und nachfolgender Amputation.

## **1.2 Ursachen von Autoimmunerkrankungen**

### **1.2.1 Umweltfaktoren**

Einige Umweltfaktoren sind neben genetischer Prädisposition und Geschlecht als Risiko für den SLE identifiziert worden. Zu diesen Umweltfaktoren zählt man UV-Bestrahlung, Medikamente und Virusinfekte.

Es ist bereits lange bekannt, dass UV-Bestrahlung Schübe eines SLE auslösen kann. Der Mechanismus der UV-induzierten Veränderung ist allerdings nicht genau aufgeklärt. Vermutlich spielen hier ein Zelluntergang mit Freisetzung von photodenaturierter DNA als Antigen, Aktivierung latenter Viren oder immunregulatorische Effekte eine Rolle (5).

Eine Reihe von Medikamenten, besonders Hydralazin, Procainamid und Isoniazid, können einen SLE induzieren. Die Ausprägung der Krankheit ist von Dosis und Dauer der Therapie abhängig. Als Ursache werden ein gestörter Medikamentenmetabolismus oder ein medikamentös bedingter Eingriff in die Immunregulation vermutet. Nach Absetzen des Medikamentes verschwinden die Symptome in der Regel innerhalb weniger Wochen (6).

Mehrere Studienergebnisse legen eine virale Genese des SLE nahe: so können Infektionen mit lymphotropen Viren wie CMV und EBV SLE-ähnliche Erkrankungen auslösen. In der Pathogenese des murinen Lupus wird den Retroviren und ihren Genprodukten eine wichtige Bedeutung zugeschrieben (7; 8). Es gelang auch bereits aus zirkulierenden Immunkomplexen von SLE-Patienten retrovirale RNA zu isolieren (9). Andere Forscher fanden gehäuft serologische Reaktivität gegen endogenes Baboon Retrovirus und murines Leukämievirus (MuLV), sowie gegen retrovirale env- und gag-Peptide (10).

Dabei hatten diese Patienten serologisch vorwiegend anti-RNP und anti-Sm-Antikörper und klinisch vermehrt Hautausschläge und hämatologische Symptome. Auch die Tatsache, dass im Serum von SLE-Patienten Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) und das IFN- $\alpha$ -induzierte MxA-Protein in Leukozyten nachweisbar sind, legt eine virale Genese des SLE nahe (11). In einer großen Studie konnte gezeigt werden, dass SLE-Patienten in einem signifikant jüngeren Alter an EBV-Infektionen erkranken als gesunde Kontrollen (12). Alle SLE-Patienten haben Antikörper gegen das EBV-Protein EBNA-1, die mit den typischen Autoantigenen Ro bzw. Sm kreuzreagieren.

Inwieweit Umweltfaktoren bei der Auslösung der Sklerodermie eine Rolle spielen, ist bisher unbekannt. Eine Rolle von Viren, u.a. CMV, wird angenommen (13; 14).

### 1.2.2 Genetische Risikofaktoren

Durch zahlreiche Familien- und Zwillingsstudien wurde bewiesen, dass hereditäre Faktoren die wichtigsten Risikofaktoren des SLE sind (15). 5-12% der Verwandten ersten und zweiten Grades von SLE-Patienten erkranken ebenfalls an SLE (16). Für homozygote Zwillinge wurde eine konkordante SLE-Erkrankung von 20-57% berichtet, für dizygoten 5% (17).

In mehreren Familienstudien wurden mittlerweile 15-22 Chromosomenregionen mit Risikogenen charakterisiert (Tab.2).

Chromosom	Risikoregionen für SLE	Kandidatengene
<i>Chromosom 1</i>	1q22-24, 1q23, 1q25, 1q31, 1q32, 1q36, 1q42, 1q43	FCGR2A, FCGR2B, FCGR3A, PARP C1q, C4
<i>Chromosom 2</i>	2p15, 2q21-33, 2q37	PDCD1
<i>Chromosom 4</i>	4p15-13, 4p16-15	
<i>Chromosom 6</i>	6p11-21, 6p22	MHC-Haplotypen, C2
<i>Chromosom 7</i>	7p22, 7q21, 7q36	
<i>Chromosom 10</i>	10p13	
<i>Chromosom 12</i>	12q24	NOS1, TCF1, IFN- $\gamma$
<i>Chromosom 13</i>	13q32	



Chromosom 14	14q21-23	
Chromosom 16	16p13, 16q12-21	
Chromosom 17	17q23	ACE
Chromosom 19	19p13	DNase2, Calreticulin, hnRNPs, DNA Methyltransferase, MAPK, C3
	19q13	KIR, ILT
Chromosom 20	20p12, 20p13, 20q11, 20q13	

**Tabelle 2: Lokalisation von genetischen Risikoregionen des SLE beim Menschen.** Aufgelistet sind einige Kandidatengene, die in diesen Regionen lokalisiert sind.

Die Beteiligung genetischer Faktoren ergibt sich auch aus Beobachtungen an Tiermodellen. So konnten in Arbeiten von Wakeland et al. und Kotzin et al. an dem SLE-Mausmodell NZM2410 einige Regionen auf den Chromosomen 1, 4, 7 und 17 als Risikoloci des murinen SLE identifiziert werden (*Sle1*, *Sle2*, *Sle3*, *Sle4*, *Sle5*). Diese Studien haben ebenfalls bestätigt, dass hereditäre Risikofaktoren von einem komplexen Zusammenspiel unterschiedlicher Gene abhängen.

Die genetische Heterogenität zwischen SLE-Patienten erschwert die Identifizierung der Risikogene. So können unterschiedliche Kombinationen von Genvarianten einen gleichen oder ähnlichen SLE-Phänotyp hervorrufen.

### 1.2.2.1 Gene des MHC

Die Genregion, die beim Menschen am stärksten mit dem SLE assoziiert ist (6p11-21), trägt u.a. den MHC-Locus. Diese Region kodiert für Genprodukte, die essentiell für die Regulation der Immunantwort sind. Über sie wird nicht nur das T-Zell-Rezeptor-Repertoire bestimmt, sondern auch die antigenabhängige T-Zell-Proliferation und die B-Zell-Differenzierung reguliert. Somit bestimmen die MHC-Gene über Krankheitsresistenz und Empfänglichkeit sowie über chronisch veränderte Immunantworten (15). Die Gen-Produkte des MHC Klasse I, II und III sind als Risikogene auch mit anderen rheumatischen Erkrankungen assoziiert.

So wurde in weiteren Untersuchungen für Kaukasier eine Korrelation mit den MHC-Haplotypen HLA-B7/DR2 und -B8/DR3 herausgefunden (18). Für die SLE-Nephritis wurde eine vermehrte Assoziation mit DR2, DQw $\beta$ 1 und besonders mit DQ1.AZH beschrieben, aber auch eine verminderte Assoziation mit HLA-DR4. Weitere Kandidaten in der MHC-Region sind die Gene: HLA-A1, C4AQ0, C4B1 und DQ2.

### **1.2.2.2 Komplement-Gene**

Defekte der Komplementkomponenten C1q, C2 und C4 wurden gehäuft bei SLE-Patienten gefunden (19). Die Komplementgene C2, C4A, C4B und Faktor B sind in der MHC Region lokalisiert. Für C4 besteht ein erheblicher Polymorphismus, der für die SLE-Pathogenese bedeutsam sein könnte. Eine verminderte Expression von Komplementproteinen führt zu einer schlechteren Opsonisierung und Beseitigung von Immunkomplexen. Die Hierarchie fehlender Komplementkomponenten als Risikofaktoren für SLE-Anfälligkeit ist folgende: C1q>C4>C2A. Außerdem haben einige Studien gezeigt, dass eine Interaktion zwischen C4AQ0-Haplotypen und DQA0501 stattfindet (20). Es wird vermutet, dass mit der Deletion des C4A-Gens ein benachbartes SLE-„Suppressorgen“ mit deletiert oder fehlreguliert wird. Die Komplementkomponenten C4A und C4B unterscheiden sich in ihren Funktionen und sind in den Allelen C4AQ0 und C4BQ0 mit SLE assoziiert. Auch für andere Komplementkomponenten wie C6, C7, Faktor H, das C4-Bindungsprotein und den C1-Rezeptor wurden Assoziationen mit SLE berichtet (21). Mehrere Maus-Studien konnten die Rolle der C4 Komponente bestätigen. Bei Verlust des C4 verliert das Immunsystem seine Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen und ein SLE kann auftreten.

### **1.2.2.3 Fc-Rezeptor-Gen**

Die Gene, die einen niedrig-affinen Rezeptor für IgG kodieren, gehören zur Immunglobulin-Superfamilie und sind auf dem Chromosom 1q23 lokalisiert. Dazu gehören Fc $\gamma$ RIIA- (CD32A), Fc $\gamma$ RIIIA- (CD16A), Fc $\gamma$ RIIB- (CD16B) und Fc $\gamma$ RIIB- (CD32B) Gene. Da es beim SLE zur Gewebeschädigung durch Immunkomplexe des IgG kommt, ist es nachvollziehbar, dass Polymorphismen

aller vier Fc-Rezeptor-Gene mit dem SLE assoziiert sind, besonders des FcγRIIA und des FcγRIIIA.

FcγRIIa und FcγRIIIa-Moleküle enthalten in ihren cytoplasmatischen Domänen die Struktur motive immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs), die Aktivierungsprozesse der Zelle vermitteln. Die Punktmutationen Histidin (H)/Arginin (R) im Codon 131 des FcγRIIa (CD32) auf der Ebene der genomischen DNA der ITAMs (single nucleotide polymorphism: SNP) beeinträchtigen die Clearance IgG2-haltiger Immunkomplexe. Mehr als 20 Studien in unterschiedlichen ethnischen Gruppen konnten eine Assoziation der Mutation R/H 131 im Fc-Rezeptor IIa mit SLE und auch mit Lupus-Nephritis nachweisen.

FcγRIIIa (CD16) wird auf der Zelloberfläche von natürlichen Killerzellen (NK), Monozyten und Makrophagen exprimiert und bindet an die Subklassen IgG1 und IgG3. Der Polymorphismus T-G im Codon 176, der zum Austausch der Aminosäure Phenylalanin (F) zu Valin (V) führt (22), ist mit dem SLE und speziell mit der Lupus-Nephritis assoziiert.

In den Ablagerungen von Immunkomplexen in der Niere von SLE-Patienten befinden sich am häufigsten die Subklassen IgG2 und IgG3 (23). Die Polymorphismen FcγRIIa-131H/R und FcγRIIIa-176V/F haben unterschiedliche Bindungspräferenzen bei den IgG-Subklassen (24).

#### **1.2.2.4 PDCD1-Gen**

Der inhibitorische Immunorezeptor PDCD1 spielt eine entscheidende Rolle in der peripheren Toleranz des Immunsystems (25). PDCD1-knockout-Mäuse entwickeln eine Glomerulonephritis und Arthritis auf dem C57BL/6 Hintergrund (26). Darüberhinaus hat eine Studie an 2500 Personen eine Assoziation von SNPs im PDCD1 und SLE gezeigt: das SLE-Risiko vergrößert sich bei Europäern um den Faktor 2,6 und bei Mexikanern um 3,6 (27).

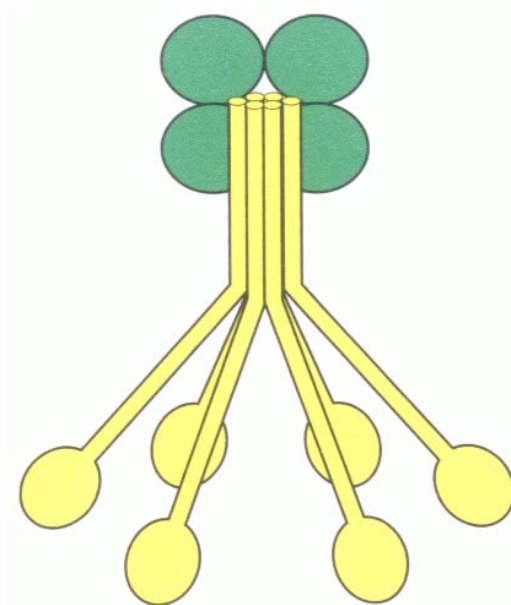
#### **1.2.2.5 Mannanbindendes Lektin (MBL)**

Das mannanbindende Lektin (MBL) ist ein gut charakterisiertes Kollektin und Akut-Phase-Protein, das spezifisch an Mannosereste und andere Zuckermoleküle auf der Oberfläche von Pathogenen bindet. MBL aktiviert die

Komplementkaskade und inaktiviert so Krankheitserreger (28). MBL spielt eine wichtige Rolle bei der Initiierung der angeborenen Immunantwort, Opsonisierung von Mannose- und N-Acetylglucosamin-reichen Mikroorganismen (29) und Aktivierung von Makrophagen über den C1q-Rezeptor (30).

Das MBL-Gen ist auf dem Chromosom 10 lokalisiert. MBL kommt bei den meisten Menschen im normalen Serum in geringen Mengen vor und wird im Verlaufe der Immunantwort verstärkt gebildet.

Das Protein bildet ein Cluster aus zwei bis sechs kohlenhydratbindenden Köpfen, die ihrerseits aus drei Polypeptidketten aufgebaut sind (Abb.3). Die Struktur des MBL ähnelt der Komplementkomponente C1q, obwohl zwischen diesen beiden Proteinen keine Sequenzhomologien bestehen (31). Mit dem MBL-Komplex sind die Serinproteasen MASP-1 und -2 (MBL-assoziierte Serinproteasen) verknüpft (29; 31), die nach der Bindung des MBL-Komplexes an die Oberfläche eines Pathogens die Spaltung von C4 und C2 einleiten. So löst das MBL über den Lektin-Weg eine Komplementaktivierung aus.



**Abb. 3: Schematische Struktur von MBL.** Das Lektin bildet Cluster aus zwei bis sechs kohlenhydratbindenden Köpfen um einen zentralen kollagenähnlichen Stiel (gelb dargestellt). Mit diesem Komplex sind die Serinproteasen verknüpft (grün dargestellt). Nach der Bindung von MBL an bakterielle Oberflächen werden die beiden Serinproteasen aktiviert, die dann ihrerseits das Komplementsystem stimulieren.

Eine MBL-Defizienz liegt bei ca. 5% der Bevölkerung vor (32; 33). Menschen mit einem Defekt dieses Lektins leiden während der frühen Kindheit deutlich öfter an Infektionen. Die MBL-Defizienz wird durch homozygote Punktmutationen in den Allelen B, C und D (Codons 52, 54 und 57) verursacht, die zur Reduktion der MBL-Funktionalität führen. Die Allele mit Mutationen werden 0-Allele genannt, im Gegensatz zu normalen A-Allelen (32; 34; 35). Ferner existieren niedrig-produzierende Haplotypen im Promotorbereich des MBL (MBL-550C/G und MBL-221G/C) (36; 37), die zu verminderten Serumkonzentrationen des MBL führen.

Die MBL-Defizienz und niedrige MBL-Konzentrationen im Serum beeinträchtigen die Fähigkeit zur Opsonisierung und zudem wahrscheinlich die Clearance von Immunkomplexen. Das Risiko, Autoimmunerkrankungen wie z.B. SLE zu bekommen, ist erhöht. Ferner haben Patienten mit IgG-Mangel aufgrund eines variablen Immundefekts eine erhöhte Infektionsrate, wenn zusätzlich das MBL fehlt (37). SLE-Patienten mit zusätzlicher MBL-Defizienz zeigen eine erhöhte Infektionsrate (38).

#### **1.2.2.6 SLE-Risikolocus auf dem Chromosom 19**

In den Chromosomenregionen 19q13 und 19p13 sind mit hoher Wahrscheinlichkeit Risikogene der Multiplen Sklerose (MS) und des SLE lokalisiert.

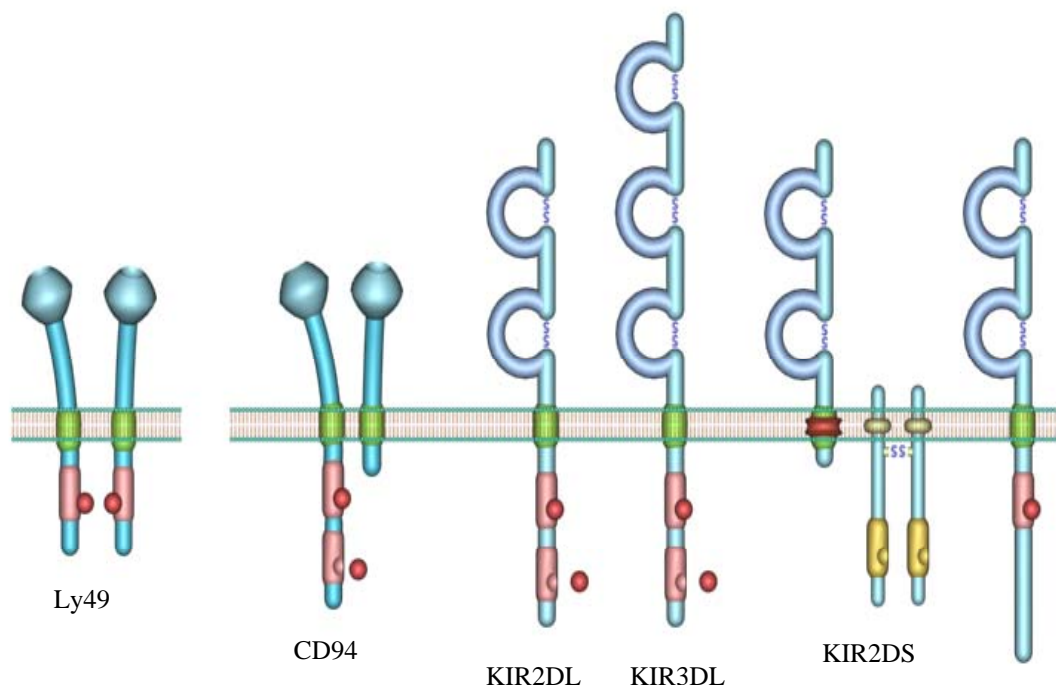
In der Chromosomenregion 19p13.2 ist der SLE-Risikolocus SLED1 lokalisiert, der mit der Produktion von Anti-Doppelstrang-DNA-Antikörper korreliert (39).

Es wurde berichtet, dass nicht nur self-DNA immunogene Eigenschaften bei viralen Infektionen haben kann, sondern auch die Mutationen von Enzymen, die für die DNA-Degradation zuständig sind. Folglich ist die Desoxyribonuklease 2 (DNase 2) ein potenzielles Kandidatengen auf dem Risikolocus 19p13.2, weil die Mutationen in der DNase 1 mit SLE und anderen Autoimmunerkrankungen assoziiert sind (40).

In der Chromosomenregion 19q13 sind die Gene MHC-bindender Rezeptoren, wie z.B. Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) und Immunglobulin-like transcripts (ILT), lokalisiert. Die KIR-Gene in der Region 19q13.4 weisen eine sehr hohe Diversität auf. Es gibt mindestens 13 verschiedene Loci für KIR (41; 42). KIR werden auf humanen NK- und T-Zellen exprimiert und enthalten die inhibitorischen ITIM- bzw. aktivierenden ITAM-Motive, die man in mehreren

Rezeptoren findet, die Aktivierungssignale in Lymphocyten verändern. KIR binden an MHC-Klasse-I-Moleküle (43; 44) und übermitteln Signale, die die Freisetzung zytotoxischer Granula hemmen, wenn NK-Zellen nicht infizierte, gesunde Zellen erkennen. Veränderte oder nicht vorhandene MHC-Klasse-I-Moleküle können kein negatives Signal induzieren, die NK-Zelle wird aktiviert, schüttet den Inhalt ihrer Granula aus und löst damit in der Zielzelle Apoptose aus. KIR können ebenfalls mit dem T-Zell-Rezeptor interagieren und dessen Signal modulieren (45). Somit sind die KIR auch an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt (46; 47).

KIR unterscheiden sich durch die Anzahl ihrer Immunglobulin-domänen (D) und die Länge des intrazellulären Anteils („S“ = short, „L“ = long). (Abb.4) Die Rezeptoren mit einem langen intrazellulären Anteil (KIR2DL1-5 und KIR3DL1, 2, 7) enthalten 1-2 ITIMs, welche die NK- bzw. T-Zell-Aktivität hemmen. Die kurzen Isoformen dieser Rezeptoren (KIR2DS1-6 und KIR3DS1, 2) aktivieren NK- bzw. T-Zellen. Sie sind mit Molekülen assoziiert, die ITAMs enthalten. KIR sind hochspezifisch für ihre Liganden, bei denen es sich um klassische HLA-Moleküle handelt.



**Abb. 4: Schematische Struktur von NK- bzw. T-Zell-Rezeptoren.** Abgebildet sind Lektin-ähnliche Rezeptoren (Ly49 und CD94) und Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR) der NK- bzw. T-Zellen. Aktivierende Motive (ITAMs) sind gelb dargestellt, inhibitorische (ITIMs) rot.

Die Expression des KIR-Musters ist genetisch bedingt. Aus früheren Familienstudien sind ca. 50 unterschiedlichen KIR-Kombinationen, sog. „KIR-Phänotypen“, bekannt (48). So hat jeder Mensch eine eigene Kombination aus unterschiedlichen Anteilen an aktivierenden „DS“- oder inhibitorischen „DL“-KIR. Am häufigsten kommt der KIR-Phänotyp #1 vor, der ein Muster aus drei inhibitorischen KIR 2DL1, 2DL3, 3DL1 und einem aktivierenden KIR2DS4 darstellt.

Die Assoziationen der KIR mit Autoimmunerkrankungen sind schon in der Fachliteratur diskutiert worden: so ist der aktivierende Rezeptor KIR2DS2 mit Vaskulitis bei Patienten mit rheumatoider Arthritis assoziiert (49) und die beiden aktivierenden KIR2DS1 und KIR2DS2 mit Arthritis psoriatica (50).

### **1.3 Zielsetzung**

Genetische Risikofaktoren und wahrscheinlich infektiöse Auslöser bestimmen wesentlich die Prädisposition für SLE und andere Autoimmunerkrankungen. Inzwischen sind viele SLE-Risikoregionen beim Menschen bekannt, die auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind.

Das Ziel der Arbeit war, potenzielle Risikogene des SLE zu identifizieren. Diese sollten einerseits durch die Affymetrix Chip Analyse von SLE-Patienten im Schub und in Remission bestimmt werden. Andererseits sollten Kandidatengene untersucht werden, die an der Abwehr von viralen bzw. bakteriellen Infektionserregern als potentielle Auslöser von Autoimmunerkrankungen beteiligt sind. Geeignete Kandidatengene sollten mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR analysiert und anschließend die Assoziation von Polymorphismen oder Allelen solcher Gene, wie der KIR bzw. MBL, mit SLE bzw. Sklerodermie untersucht werden.

## 2 *Material und Methoden*

### 2.1 *Material*

#### 2.1.1 *Geräte*

ABI's Prism 7700 Sequence Detection System	Perkin-Elmer, Wellerley, USA
Biofuge pico	Heraeus, Osterode
Brutschrank (CO2-Auto-Zero)	Heraeus, Osterode
iCycler iQ Real-Time Detection System	BioRad, München
Diavert Lichtmikroskop	Leitz, Stuttgart
Digital-pH-meter	Knick, Dülmen
Durchflusszytometer (FACScalibur)	BectonDickinson, SanJose, USA
Gelkammer Agarosegele	BioRad, München
Gel Doc 1000	BioRad, München
Laminar Air Flow Class 100	Gelaire, Ebersberg
MaxiGel-Elektrophoresekammer	Pharmacia, Freiburg
Megafuge 2.0R	Heraeus, Osterode
MiniGel-Elektrophoresekammer	BioRad, München
Power Supplies	Pharmacia, Haverhill, USA
SpeedVac-Concentrator	Savant/Jürgens, Albertville, USA
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5346	Eppendorf, Hamburg
UV-VIS Spektrophotometer, UV-1202	Shimadzu, Kyoto, Japan
Vortex Genie 2TM	Bender & Hobein AG, Karlsruhe
Zentrifugen: Biofuge 13	Heraeus, Osterode

#### 2.1.2 *Oligonukleotide*

Alle Oligonukleotide für die MBL-Polymorphismen und KIR-Phenotypisierung wurden von der Firma MWG (Ebersberg) bezogen. Alle Primer wurden



lyophilisiert geliefert, in aqua bidest. in einer Konzentration von 100 pmol/ $\mu$ l gelöst und bei -20°C in Aliquoten gelagert.

### 2.1.2.1 KIR-Primer

Die KIR-Subfamilien wurden durch Oligonukleotide amplifiziert, die von Uhrberg et al. (48) entworfen wurden.

PCR Gruppe	Sense Primer (5'-3')	Antisense Primer (5'-3')	PCR-Produkt Länge (bp)
KIR2DL1	ACT CAC TCC CCC TAT CAG G	AGG GCC CAG AGG AAA GTC A	~1750
KIR2DL2	CCA TGA TGG GGT CTC CAA A	GCC CTG CAG AGA ACC TAC A	~1800
KIR2DL3	CCT TCA TCG CTG GTG CTG	CAG GAG ACA ACT TTG GAT CA	798
KIR3DL1	CCA TCG GTC CCA TGA TGC T	AGA GAG AAG GTT TCT CAT ATG	~1600
KIR2DS1	TCT CCA TCA GTC GCA TGA G	AGG GCC CAG AGG AAA GTT	~1800
KIR2DS2	TGC ACA GAG AGG GGA AGT A	CAC GCT CTC TCC TGC CAA	~1750
KIR2DS3	TCA CTC CCC CTA TCA GTT T	GCA TCT GTA GGT TCC TCC T	~1800
KIR2DS4	CTG GCC CTC CCA GGT CA	GGA ATG TTC CGT TGA TGC	~2000
KIR2DS5	AGA GAG GGG ACG TTT AAC C	GCC GAA GCA TCT GTA GGC	~1950
KIR3DS1	GGC AGA ATA TTC CAG GAG G	AGG GGT CCT TAG AGA TCC A	~1800

**Tabelle 3: Spezifische Primer für KIRs.**

### 2.1.2.2 MBL-PCR Primer

Für die MBL-PCR wurden spezifische Primer eingesetzt, die von Madsen et al. (32) entworfen wurden.

PCR Gruppe	Sense Primer (5'-3')	Antisense Primer (5'-3')	PCR-Produkt Länge (bp)
BC-Allel	ACC CAG ATT GTA GGA CAG AG	AGT TGT TGT TCT CCT GTC CAG	685
D-Allel	CAT CAA CGG CTT CCC AGG CAA AGA CGC G	AGG ATC CAG GCA GTT TCC TCT GGA AGG	125

**Tabelle 4: Spezifische Primer für MBL.**

### 2.1.3 Primer und Sonden für quantitative RT-PCR (TaqMan)

Alle Primer und fluorogenen Sonden für die quantitative Real-Time PCR (TaqMan-PCR) wurden von der Firma BioTeZ (Berlin-Buch, BRD) bezogen. Alle Oligonukleotide wurden lyophilisiert geliefert, nach dem TaqMan PCR Protokoll gelöst, aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die folgenden Primer und Sonden wurden für die Real-Time TaqMan PCR eingesetzt:

#### **KIR 2DL1:**

Sense Primer (5'-3')	CGT GGG CGT GCC TGT C
Antisense Primer (5'-3')	AAG AAC CCA ACA CAC GCC AT
TaqMan-Sonde (5'-3')	6-FAM-CAG CAC CAT GTC GCT CTT GTT CGT CA-TAMRA

**Tabelle 5a: Spezifische Primer für KIR 2DL1.**

#### **KIR 2DS1:**

Sense Primer (5'-3')	TGA ACG TAG GCT CCC TGC A
Antisense Primer (5'-3')	CGG AAA GAG CCG AAG CAT C
TaqMan-Sonde (5'-3')	6-FAM-CCA ACT TTC CTC TGG GCC CTG CCA CCC ATG G-TAMRA

**Tabelle 5b: Spezifische Primer für KIR 2DS1.**

**KIR 2DL2:**

Sense Primer (5'-3')	AGA GGC CCA AGA CAC CCC
Antisense Primer (5'-3')	CAA GGC CTG ACT GTG GTG C
TaqMan-Sonde (5'-3')	6-FAM-AGA TAT CAT CGT GTA CGC GGA ACT TCC AAA TGC T-TAMRA

**Tabelle 5c: Spezifische Primer für KIR 2DL2.**

**KIR 2DS2:**

Sense Primer (5'-3')	TGG TCA GAT GTC AGG TTT GAG C
Antisense Primer (5'-3')	TGG CCT TGG AGA CCC CAT
TaqMan-Sonde (5'-3')	6-FAM-AGG GGA AGT ATA AGG ACA CTT TGC ACC TCA TTG GAG AGC-TAMRA

**Tabelle 5d: Spezifische Primer für KIR 2DS2.**

**KIR 3DL1:**

Sense Primer (5'-3')	TCC AAG GCC AAT TTC TCC AT
Antisense Primer (5'-3')	GTG AGT AAC AGA ACC GTA GCA TCT G
TaqMan-Sonde (5'-3')	6-FAM-TCC CAT GAT GCT TGC CCT TGC AG-TAMRA

**Tabelle 5e: Spezifische Primer für KIR 3DL1.**

**KIR 3DS1:**

Sense Primer (5'-3')	CTA AGG ACC CCT CAC GCC TC
Antisense Primer (5'-3')	TCA CTG GGA GCT GAC AAC TGA
TaqMan-Sonde (5'-3')	6-FAM-TTT CTC CAT CGG TTC CAT GAT GCG TGC C-TAMRA

**Tabelle 5f: Spezifische Primer für KIR 3DS1.**

**KIR 2DL3:**

Sense Primer (5'-3')	AAC AGT GAA CAG GGA GGA CTC TG
----------------------	--------------------------------

Antisense Primer (5'-3')	AAG GGC GAG TGA TTT TTC TCT G
TaqMan-Sonde (5'-3')	6-FAM-CTC AGG AGG TGA CAT ATG CAC AGT TGA ATC A-TAMRA

**Tabelle 5g: Spezifische Primer für KIR 2DL3.**

***hu  $\beta$ -Actin:***

Sense Primer (5'-3')	AGT ACT CCG TGT GGA TCG GC
Antisense Primer (5'-3')	GCT GAT CCA CAT CTG GTG GA
TaqMan-Sonde (5'-3')	6-FAM- TCC ATC CTG GCC TCG CTG TCC A -TAMRA

**Tabelle 5g: Spezifische Primer für hu  $\beta$ -Actin.**

#### **2.1.4 Blutproben**

Blutproben für die DNA-Isolierung wurden von 286 SLE- und 79 Sklerodermie-Patienten aus der Immunologischen Ambulanz der Medizinischen Hochschule Hannover (Abt. Klinische Immunologie) bzw. von 120 gesunden Probanden aus der Blutbank der MHH (Abt. Transfusionsmedizin) und aus Hamburg nach schriftlicher Einwilligung gespendet. Die Blutentnahme erfolgte im Rahmen einer Studie im Kompetenznetz Rheuma und war von der Ethikkommission der MHH genehmigt worden. Das Blut wurde mit 10 % (v/v) 0,1 M Natriumcitrat versetzt.

Außerdem wurden die frisch entnommenen Blutproben für die RNA-Isolierung verwendet. So wurde das Blut von jeweils 15 SLE-Patienten im Schub, SLE-Patienten in Remission und gesunden Kontrollen entnommen und daraus unverzüglich RNA isoliert.

#### **2.1.5 Puffer und Lösungen**

TAE:	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA, pH 8,0
0,5 M EDTA (pH 8,0):	186,1 g Na <sub>2</sub> EDTAx2H <sub>2</sub> O 700 ml aqua bidest.

	mit 10 M NaOH auf pH 8,0 einstellen ad 1 l aqua bidest.
DEPC-Wasser:	400 ml aqua bidest. plus 800 µl DEPC 30 min lang vor dem Autoklavieren schütteln
5 x MOPS:	40 mM NaAc 0,1 M MOPS, pH 7,0 0,5 mM EDTA-DEPC, pH 8,0 lichtgeschützt bei 4 °C 3 Monate haltbar
6 x DNA-Auftragspuffer:	100 µl 2,5% Orange G 500 µl 100% Glyzerin 400 µl aqua bidest.
DNA-Marker:	60 µl Marker 100 µl 6 x DNA-Auftragspuffer 440 µl aqua bidest.
Natriumacetatpuffer:	3 M NaAc, pH 4,5
Ethidiumbromid-Lösung:	10 mg/ml in 1 x TAE, bei 4 °C lichtgeschützt halten

### 2.1.6 Molekulargewichtsstandards

1 kb-DNA-Ladder (Gibco BRL, Eggenstein):

**[bp]:** 75; 134; 154; 201; 220; 298; 344; 396; 506/517; 1018; 1636;  
2036; 3054; 4072; 5090; 6108; 7126; 8144; 9162; 10180;  
11198; 12216

100 bp-DNA-Ladder (NEB, Frankfurt/Main):

**[bp]:** 100; 200; 300; 400; 500/517; 600; 700; 800; 900; 1000; 1200;  
1517

λ DNA/Hind III (Gibco BRL, Eggenstein) [0,5 µg/µl], 1:5 verdünnt:

<b>[bp]</b>	564	2027	2322	4361	6557	9416	23130
<b>ng DNA/10 µl Marker</b>	11,63	41,8	47,9	89,9	135	194	477

### 2.1.7 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien stammen, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen Ambion (Austin, USA), Amersham (Braunschweig, BRD), AppliChem (Darmstadt), Becton-Dickinson (San Jose, USA), Biomol (Hamburg), Biochrom (Berlin, BRD), Biozym (Hamburg), Fluka (Steinheim), Gibco BRL (Eggenstein), BD (Franklin Lakes, USA), Genomed (Löhne), MP Biomedicals GmbH (Eschwege), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Frankfurt/Main), Qiagen (Hilden), Riedel de Haen (Seelze), Roche (Grenzach-Wyhlen), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma Aldrich (München).

### 2.1.8 Antikörper

Die durchflusszytometrischen Analysen wurden mit direkt markierten Antikörpern durchgeführt. Die Antikörper waren mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) oder Allophycocyanin (APC) konjugiert (Tab.6).

Antigen	Klon	Konjugat	Hersteller
CD3	UCHT1 (IgG1)	APC	Pharmingen, Heidelberg
CD16	DJ130C (IgG1)	PE, FITC	Pharmingen, Heidelberg
CD158a	EB6 (IgG1)	FITC	Immunotech, Krefeld
CD158b	GL183 (IgG1)	PE	Immunotech, Krefeld

**Tabelle 6: Die für die FACS-Analyse verwendeten Antikörper.**

### 2.1.9 Enzyme

Alle verwendeten Enzyme stammen, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen Roche Diagnostics GmbH (Grenzach-Wyhlen), Gibco BRL (Eggenstein), MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), New England Biolabs (Frankfurt/Main), Pharmacia (Freiburg), Promega (Mannheim), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München).

**2.1.10 Kits**

GFX™ PCR DNA Band and Gel Purification Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
PAXgene™ Blood RNA Kit (50)	PreAnalytiX, Hilden
QIAamp® DNA Mini Kit	QIAGEN, Hilden
QIAamp® RNA Blood Mini Kit	QIAGEN, Hilden
RNase-Free DNase Set	QIAGEN, Hilden
Omniscript RT Kit	QIAGEN, Hilden
AmpliTaq Gold® Polymerase	Applied Biosystems, Branchburg, USA
TaqMan EZ RT-PCR Core Reagent Kit	Applied Biosystems, Branchburg, USA

**2.1.11 Sonstige Materialien**

MicroAmp® Optical 96-Well Reaktion Plate	Applied Biosystems, Branchburg, USA
Optical Adhesive Cover Starter Kit	Applied Biosystems
PCR-Reaktionsgefäße (0,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
PCR-Reaktionsgefäße (0,25 ml)	Biozym, Hessisch-Oldendorf
Pipettenspitzen, 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter, steril, 20µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter, steril, 10 ml, 300 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml), Safe-Lock	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße steril (0,5 und 1,5 ml), Safe-Lock	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen (15 und 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturpipetten (2, 5, 10 und 25 ml), steril	Greiner, Frickenhausen

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 DNA-Isolierung aus Vollblut**

Die Isolierung der genomischen DNA aus dem Vollblut von Patienten bzw. von gesunden Probanden aus der Blutbank der Medizinischen Hochschule (Institut für Transfusionsmedizin) erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden). Das Protokoll wurde wie von Qiagen beschrieben durchgeführt. Die DNA-Konzentration wurde durch UV-Absorption bestimmt.

### **2.2.2 RNA-Isolierung aus Vollblut**

Die Isolierung von totaler RNA erfolgte aus frisch entnommenem Vollblut von SLE-Patienten bzw. gesunden Kontrollen. Für die Affymetrix Gen Chip Analyse wurde RNA mit Hilfe des QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die für die real-time quantitative RT-PCR (TaqMan-PCR) eingesetzte RNA wurde mit Hilfe von QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen) und PreAnalytiX Kit (QIAGEN / BD) ebenfalls laut Herstellerprotokoll isoliert. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte am UV-Spektrometer. Die RNA wurde hinsichtlich Degradation und Reinheit mittels Gelelektrophorese getestet. Ein Aliquot der RNA wurde mit RNA-Probeladepuffer (enthält Ethidiumbromid) 10 min bei 65°C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. RNA guter Qualität wurde für die Affymetrix bzw. RT-PCR Analysen eingesetzt.

### **2.2.3 Agarosegelelektrophorese für DNA**

Mit der Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe aufgetrennt werden. PCR-Produkte und präparative Verdau können über ein Agarosegel mit anschließender Gelextraktion aufgereinigt werden. Für Nukleinsäuren im Bereich 1.5-7 kb wird eine gute Auftrennung mit einem 0,7%igen Agarosegel erreicht, für Fragmente zwischen 300-1000 bp mit 1%igen, unter 300 bp mit 2-5%igen Agarosegelen. Die entsprechende Menge Agarose wurde im TAE-Puffer in der Mikrowelle oder auf der Heizplatte so lange aufgekocht, bis sich sämtliche Agarosekristalle gelöst hatten. Nach



Abkühlen auf 60 °C wurde 2 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) auf 60 ml Gellösung gegeben und die Agaroselösung in den Gelträger zum Erkalten eingefüllt. Die Proben wurden mit 6 x Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Als Standard-Marker diente entweder die 100 bp bzw. 1 kb-Leiter (bei Größenabschätzung) oder die  $\lambda$ HindIII-Fragmente (als DNA-Konzentrationsabschätzung). Mit TAE als Elektrophoresepuffer wurden bei einer Spannung von 80-100 V die Proben aufgetrennt.

#### **2.2.4 RNA-Gelelektrophorese**

Für die RNA-Gelelektrophorese wurden alle Gegenstände zunächst gereinigt und mit DEPC-Wasser abgespült. Für ein 50 ml Kleingel wurden 0,56 g Agarose abgewogen und in 36 ml DEPC-Wasser aufgeköcht. Nach zügigem Zugeben von 11 ml 5 x MOPS (4 °C) und 10 ml Formaldehydlösung wurde das Gel gegossen. Die Proben wurden mit RNA-Auftragspuffer, der Ethidiumbromid enthält, im Verhältnis 1 : 4 versetzt, 10 min bei 65 °C im Heizblock inkubiert und bis zum Auftragen auf Eis schockgekühlt.

#### **2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction; PCR) erlaubt die gezielte Amplifikation von DNA-Abschnitten. Die Reaktion erfolgt in mehreren Zyklen, die aus drei Schritten aufgebaut sind. Im ersten Schritt wird die DNA durch Erhitzen auf 95 °C in Einzelstränge denaturiert und für 10 min inkubiert, um die AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA Polymerase laut Protokoll zu aktivieren. Im folgenden Schritt binden bei niedriger Temperatur kurze, spezifische, komplementäre Einzelstränge an die DNA (Primer-Annealing). Im letzten Schritt wird bei 72 °C für 5 min die zwischen den Primern liegende DNA-Sequenz amplifiziert (Elongation).

Die Primer-Annealing Temperatur betrug für MBL-PCR 56°C (BC-Allel) und 67°C (D-Allel), für KIR-PCR 60°C.

Es wurde eine chemisch modifizierte thermostabile AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA Polymerase verwendet.

PCR-Ansatz für MBL (BC- und D-Allel):

DNA	50-500 ng
Primer sense (10 pmol/ml)	1 µl
Primer antisense (10 pmol/ml)	1 µl
10 x Polymerase Puffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub> -Lösung (100 mM)	3 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
Polymerase	0,5 µl
aqua bidest.	ad 50 µl

PCR-Ansatz für KIRs:

DNA	50-500 ng
Primer sense (12,5 pmol/ml)	2 µl
Primer antisense (12,5 pmol/ml)	2 µl
10 x Polymerase Puffer, enthält MgCl <sub>2</sub> (15 mM)	2,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 µl
Polymerase	0,5 µl
aqua bidest.	ad 25 µl

PCR- Programm für MBL:

BC-Allel PCR-Produkt:

- I. 95° C für 10 min
- II. 94° C für 1 min  
56° C für 1 min  
72° C für 1 min
- III. 72° C für 3 min

D-Allel PCR-Produkt:

- I. 95° C für 10 min
- II. 94° C für 1 min  
67° C für 1 min  
72° C für 1 min
- III. 72° C für 3 min

Schritt II. wurde 30 x wiederholt.

PCR-Programm für KIR:

- I. 95° C für 10 min

- II. 97° C für 30 sec
  - 62° C für 1 min
  - 72° C für 1 minSchritt II. wurde 5 x wiederholt
- III. 95° C für 30 sec
  - 60° C für 1 min
  - 72° C für 1 minSchritt III. wurde 30x wiederholt.

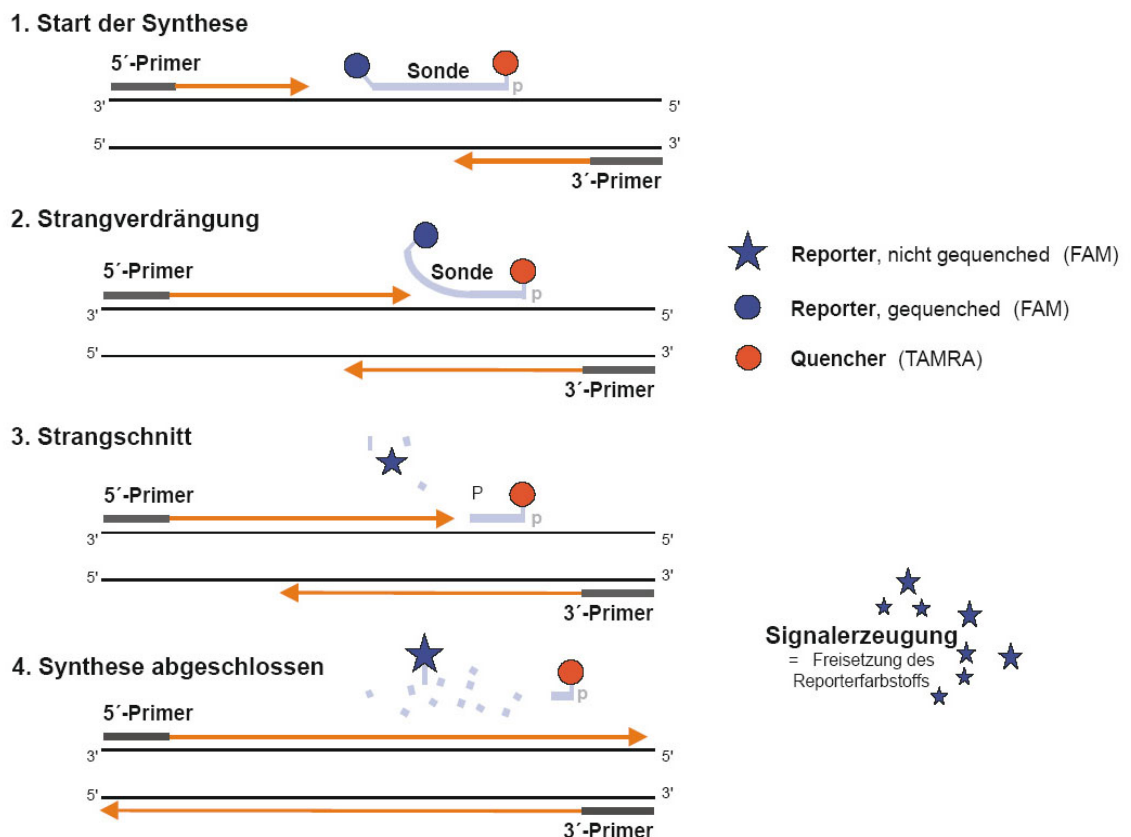
## **2.2.6 Quantitative RT-PCR**

### **2.2.6.1 Theorie der real-time quantitativen RT-PCR (TaqMan-PCR)**

Die quantitative RT-PCR wird eingesetzt, um die Expressionshöhen der RNA in einer Probe zu bestimmen. Analog der konventionellen RT-PCR wird die RNA in cDNA umgeschrieben und diese mit spezifischen Primern amplifiziert. Bei einer normalen PCR lässt sich jedoch das Produkt nur sehr schwer quantifizieren, da bei einem typischen Verlauf die Reaktion von einer exponentiellen Phase, in der in jedem Zyklus nahezu eine Verdoppelung des Produktes erfolgt, in eine Plateauphase übergeht, in der die Reaktion nahezu zum Stillstand kommt und keinerlei Amplifizierung mehr erfolgt. Da das Produkt normalerweise erst nach dem Eintritt der Reaktion in die Plateauphase quantifiziert wird, spiegelt es nicht die tatsächlichen Mengenverhältnisse durch diese Art der Messung wieder.

Eine sehr elegante Methode der Quantifizierung besteht in der Verwendung von sequenzspezifischen Primern in Verbindung mit einer doppelt fluoreszenzmarkierten Sonde, die ebenfalls nur an diese eine definierte Sequenz bindet. Der TaqMan Assay macht sich die 5'-Nukleaseaktivität der Taq Polymerase zunutze (51). Die fluorogene Sonde trägt am 5'-Ende einen sog. Reporterfarbstoff (zumeist ein Fluoreszeinderivat) und am 3'-Ende einen Quencher (Rhodaminderivat). Zusätzlich ist der 3'-Bereich durch einen Phosphatrest blockiert. Wird nun die Sonde durch Licht einer bestimmten Wellenlänge  $\lambda$  angeregt (488 nm), so emittiert der Reporterfarbstoff Licht bei einer längeren Wellenlänge  $\lambda'$ . Im Falle des verwendeten 6-Carboxy-

Fluoreszein (FAM) liegt die Emission bei 518 nm. Die abgestrahlte Fluoreszenz des Reporters wird in der intakten Sonde durch die räumliche Nähe zum Quencher-Farbstoff durch einen Fluoreszenzenergietransfer (FET) unterdrückt. Im Laufe der PCR hybridisieren die Primer und die Sonde an ihre Zielsequenz. Während der Extensionsphase verdrängt die Taq Polymerase die Sonde von der Matrize. Dieses Ereignis aktiviert die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase und die Sonde wird hydrolysiert. Hierdurch werden Reporter und Quencher getrennt, der FET wird unterbrochen und das Fluoreszenzsignal des Reporters kann detektiert werden (Abb.5). Aufgrund der Spezifität der Sonde (maximal 1 Basenaustausch wird von dem System toleriert) kann so die Zunahme eines PCR-Produktes während der gesamten Reaktion gemessen werden. Um Volumina-Schwankungen aufgrund von Pipettierfehlern auszugleichen, enthält der für die TaqMan-PCR verwendete Reaktionspuffer einen passiven Referenzfarbstoff (ROX), der in die Analyse der Fluoreszenzwerte einbezogen wird.



**Abb. 5.: Ablauf der TaqMan PCR.**  
(Verändert nach den Betriebsunterlagen für den PE SDS 7700.)

### **2.2.6.2 Definition der verwendeten Werte**

Das Signal einer TaqMan-PCR entspricht der Veränderung in der Emission der Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes, die durch Hydrolyse der Sonde während der Extensionsphase entsteht.

*Rn-Wert:* Der Rn-Wert entspricht dem normalisierten Reportersignal und wird als Quotient der Emissionsintensität des Reporters dividiert durch die Intensität der Emission der passiven Referenz (ROX) ausgedrückt.

*$\Delta Rn$ -Wert:* Um Hintergrundsignale auszuschalten, werden die gemittelten Fluoreszenzsignale in den ersten Zyklen, in denen noch kein Anstieg der Reporterfluoreszenz durch die Hydrolyse der Sonde gemessen werden kann, aufgenommen und vom Rn-Wert abgezogen. Dieser Wert wird als  $\Delta Rn$ -Wert bezeichnet.

*Threshold:* Threshold bezeichnet den Schwellenwert für die gemessene Reporterfluoreszenz. Er liegt statistisch abgesichert über dem Hintergrundrauschen und wird für jeden TaqMan-Lauf neu definiert.

*Ct-Wert:* Als Ct-Wert oder threshold cycle wird die Zyklenzahl definiert, bei der das Fluoreszenzsignal des Reporters den threshold überschreitet. Er stellt also den Schnittpunkt der threshold Geraden mit der Amplifizierungskurve einer Probe dar. Für die Quantifizierung werden die Ct-Werte der Standardreihe gegen den log-Wert der Ausgangskonzentration aufgetragen und durch Interpolation der Messwerte eine Standardkurve erstellt. Mittels dieser Standardkurve kann die Probe quantifiziert werden.

### **2.2.6.3 Auswahl der Primer und der Sonden**

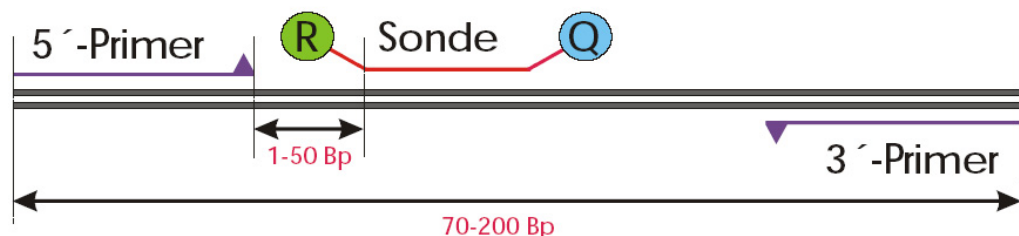
Das Design der genspezifischen Primer und der Sonde unterliegt mehreren spezifischen Anforderungen. So sollten folgende Parameter bei der Auswahl der Primer-Sonden Kombination beachtet werden:

- Die optimale Länge der Sonde beträgt zwischen 20 und 30 Basenpaaren und der Schmelzpunkt sollte mindestens 5-10°C höher

liegen als der der Primer. Der GC-Gehalt der Sonde sollte etwa 50% betragen.

- Aufeinanderfolgende, identische Nukleotide sollten vermieden werden, dies gilt insbesondere für Guanosin. Auch darf die Sonde nicht mit einem Guanosin beginnen, da das Guanosin im geringen Maße auch nach Hydrolyse der Sonde das Signal des Reporters quenchen kann und somit das Ergebnis verfälscht.
- Für die Auswahl der Sonde sollte der Strang ausgewählt werden, der der Sonde mehr Cytosinreste als Guanosinreste liefert.
- Da die Effizienz einer PCR im hohen Maße von der Länge des Amplifikats abhängt, sollte das Amplikon nicht mehr als 70 bis 90 Basenpaare umfassen.
- Der Abstand zwischen dem 3'-Ende des 5'-Primers und dem 5'-Ende der Sonde sollte so wenig Basenpaare wie möglich betragen, damit sichergestellt wird, dass auch jedes Enzymmolekül im Zuge der Extension auf die Sonde trifft.
- Die Schmelztemperatur der Primer sollte bei 60°C liegen und der G-C-Gehalt zwischen 20% und 80% betragen.
- Daneben gelten allgemeine Richtlinien der Primerauswahl, so sollten Komplementaritäten zwischen den Primern und zwischen Sonde und Primern vermieden werden und auch Sequenzen mit auffälliger Sekundärstruktur sollten nicht verwendet werden.

Für die Auswahl der TaqMan Sets wurde die Primer Express Software von ABI benutzt, die die erfolgreichen Parameter unterstützte.



**Abb. 6: Graphische Darstellung des Amplikons für die TaqMan-Analyse.** Die Abkürzungen bedeuten Reporter (R) und Quencher (Q) (verändert nach den Betriebsunterlagen für den PE SDS 7700).

Die Auswahl von Primern und Sonden für KIR war besonders schwierig, weil KIR eine sehr hohe Homologie in ihrer mRNA-Sequenz aufweisen (Abb. 7.). Dafür wurde die mRNA-Sequenzfolge der KIR untereinander dargestellt und gezielt nach Fragmenten gesucht, in denen mindestens 3 Basenaustausche vorhanden sind. So war die Spezifität der Sonde gegeben.

---

KIR2DL1	269	GGGTCTCCAAGGCCAACTTCTCCATCAGTCGCATGACGCAAGACCTGGCAGGGACCTACA
KIR2DL2	250	GGGTCTCCAAAGGCCAACTTCTCCATCGGTCCCATGATGCAAGACCTTGCAGGGACCTACA
KIR2DL3	273	GGGTCTCCAAGGCCAACTTCTCCATCGGTCCCATGATGCAAGACCTTGCAGGGACCTACA
KIR2DS1	249	GGGTCTCCAAGGCCAACTTCTCCATCAGTCGCATGAAGCAAGACCTGGCAGGGACCTACA
KIR2DS4	282	GGGTTTCCAAGGCCAACTTCTCCATTGGTCCCATGATGCCCTGTCCTTGCAGGAACCTACA
KIR2DS2	255	GGGTCTCCAAGGCCAACTTCTCCATCGGTCCCATGATGCAAGACCTTGCAGGGACCTACA
KIR2DS3	247	GGGTCTCCAAGGCCAACTTCTCCATCGGTGCGATGAGGCAAGACCTGGCAGGGACCTACA
KIR2DS5	247	GGGTCTCCAAGGGCAACTTCTCCATCGGTGCGATGACACAAGACCTGGCAGGGACCTACA
KIR3DL1	452	GGGTCTCCAAGGCCAATTTCTCCATCGGTCCCATGATGCTTGCCTTGCAGGGACCTACA

---

**Abb. 7: Ausschnitt aus Sequenz von KIR.** KIR sind in ihrer mRNA-Sequenz hoch homolog. Die homologen Sequenzen sind rot, die abweichenden Basen schwarz bzw. blau dargestellt.

#### 2.2.6.4 Verdünnung der Sonde

Die Konzentration der Sonden-Stammlösung sollte 5 µM betragen. Um den Verdünnungsfaktor zu berechnen, wurde die lyophilisierte Sonde in 500 µl aqua bidest. aufgenommen, geschüttelt und die Konzentration photometrisch bestimmt. Dazu hat sich eine 1/10 Verdünnung der Sonde bewährt. Die Konzentration der Sonde berechnete sich nach folgender Formel:

$$C_{\text{Sonde}} (\mu\text{M}) = \text{OD}_{260} \times 10^6 \times \text{Verdünnungsfaktor} : \sum \text{Extinktionskoeffizienten}$$

Um die Summe der Extinktionskoeffizienten zu berechnen, wurde die Anzahl der einzelnen Basen ausgezählt, mit dem entsprechenden Extinktionskoeffizienten multipliziert und die Werte für FAM und TAMRA addiert. Die einzelnen Koeffizienten sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

<b>Base/Farbstoff</b>	<b>Extinktionskoeffizient (M<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>)</b>
Adenosin	15.200
Cytosin	7.050
Guanosin	12.010
Thymidin	8.400
Reporter (FAM)	20.958
Quencher (TAMRA)	31.980

**Tabelle 7: Extinktionskoeffizienten.**

#### **2.2.6.5 Optimierung der einzelnen TaqMan Sets**

Für jedes Primer-Probenset musste die optimale Konzentration an Manganacetat bestimmt werden. Mangan kommt neben seiner Funktion als essentieller Co-Faktor der DNA Polymerase auch eine weitere Bedeutung in der Modulation des Fluoreszenzsignales zu, da es einen großen Einfluss auf die Stabilität der Hybridisierung der Sonde mit der DNA-Matrix ausübt. Nur eine starke Bindung der Sonde mit ihrer Zielsequenz führt zu einer vollständigen Hydrolyse. Bei schwacher Bindung der Sonde kann es zu dem Effekt kommen, dass die Sonde nur verdrängt wird, aber intakt bleibt und somit kein Signal detektiert werden kann. Für die TaqMan PCR betrug die Mangankonzentration typischerweise zwischen 3,5 und 6 mM, doch wurden in manchen Fällen auch höhere Konzentrationen von bis zu 10 mM Manganacetat eingesetzt. Ein weiterer Optimierungsschritt lag in der Bestimmung der optimalen Konzentration der eingesetzten Primer. Durch verschiedene Kombinationen der Primerkonzentration konnten Unterschiede im Hybridisierungsverhalten der beiden Primer ausgeglichen werden. Dieser Optimierungsschritt wurde durchgeführt, wenn das Signalbild der Reaktion nicht optimal ausfiel. Typischerweise wurden für jeden Primer Konzentrationen von 50 nM, 300 nM und 900 nM ausgetestet, so dass 9 verschiedene Kombinationen möglich waren.



### 2.2.6.6 Pipettierschema einer TaqMan PCR

Bei jeder TaqMan-Reaktion wurde neben der Messung des Zielgens auch die Bestimmung der Expression des Actins durchgeführt. So konnte die Expressionshöhe des Zielgens auf die Expression des Actins normalisiert werden. Wie oben erwähnt wurde, hing die Konzentration an Manganacetat von der verwendeten Sonde ab. In der folgenden Tabelle ist ein typischer Standardmix für eine TaqMan PCR mit einer Endkonzentration der Primer von 300 nM dargestellt. Führte ein Primermatrix zu abweichenden Konzentrationen, mussten die Mengen an Primer und aqua bidest. entsprechend variiert werden (Tab.8).

Komponente	eingesetzte Menge	Endkonzentration
10 x TaqMan PCR-Puffer	2,5 µl	1 x
Mn(OAc) <sub>2</sub> (25 mM)	variabel	variabel
dATP (10 mM)	0,75 µl	200 µM
dGTP (10 mM)	0,75 µl	200 µM
dCTP (10 mM)	0,75 µl	200 µM
dUTP (10 mM)	0,75 µl	200 µM
Primer 1 (10 µM)	1 µl	400 nM
Primer 2 (10 µM)	1 µl	400 nM
Sonde (5 µM)	1 µl	200 nM
<i>rTth</i> DNA Polym. (2,5 U/µl)	1 µl	2,5 U
AmpErase UNG (2 U/µl)	0,25 µl	0,5 U
aqua bidest.	ad 24 µl	

**Tabelle 8: Pipettierschema einer real-time PCR.**

Zu dem Standardmix wurde 1 µl RNA pipettiert. Für jedes TaqMan Set wurde eine Standardreihe pipettiert, die 4 Verdünnungen einer RNA enthielt (1:1; 1:2; 1:4 und 1:8). Die Konzentration der zu quantifizierenden Proben betrug typischerweise 10 ng. Pipettiert wurden jeweils Doppelansätze für die Standardreihe und Dreifachansätze für die Proben.

Für die TaqMan PCR wurde folgendes standardisiertes Temperaturprofil verwendet:

Zyklen	Temperatur, °C	Dauer	Segment
1	50	2 min	UNG-Verdau
1	60	30 min	Reverse Transkription
1	95	5 min	UNG-Aktivierung
40	94	20 sec	Amplifikation
	60	1 min	

**Tabelle 9: Temperaturprofil der real-time PCR.**

### 2.2.6.7 Analyse der TaqMan PCR

Die aufgenommenen Rohdaten wurden durch die Sequence Detection Software (SDS-Software) automatisch analysiert. Das Programm erstellt aus den pipettierten Standardproben eine Standardkurve und gibt die Werte für die Steigung der Kurve, den Y-Achsenabschnitt und den Korrelationskoeffizienten der interpolierten Kurve an. Mit Hilfe dieser Standardkurve war es möglich, die Proben relativ zu den eingesetzten Konzentrationen der Standardproben zu quantifizieren. Zusätzlich erlaubte die Analyse der Steigung der Geraden eine Aussage über die Effizienz der PCR-Reaktion.

Um die Proben zu analysieren wurde die entsprechenden Ct-Werte in Excel importiert und mit Hilfe der Standardkurve in relative Konzentrationswerte umgerechnet. Die Konzentration der Proben errechnete sich dabei wie folgt:

$$\log(\text{Konzentration}_{\text{Probe}}) = \text{Ct-Wert} - (\text{Y-Achsenabschnitt} / \text{Steigung})$$

bzw.

$$\text{Konzentration}_{\text{Probe}} = 10^{[\text{Ct-Wert} - (\text{Y-Achsenabschnitt} / \text{Steigung})]}$$

Für jede TaqMan Probe wurde die Konzentration ermittelt und anschließend die Mittelwerte der identischen Replikate gebildet. Um die Werte zu normalisieren, wurde der Mittelwert des Zielgens durch den Mittelwert des Referenzgens (Actin) dividiert. Man erhielt so eine einheitlose Zahl, über die die relativen Konzentrationen der verschiedenen Proben verglichen werden konnten.

### 2.2.7 Restriktionsendonuklease-Verdau

Alle Enzyme und 10 x Puffer wurden von der Firma NEB bezogen. Wichtig bei der Zusammenstellung der Reaktionskomponenten war, dass das Restriktionsenzym mindestens 1:10 verdünnt wurde, da es in Glycerol gelagert wurde. Die Restriktionstemperatur betrug 37° C, die Restriktionsdauer ca. 12-16 h (über Nacht).

Die Kontrolle der restringierten PCR-Produkte erfolgte über die Gelelektrophorese.

15 µl Restriktionsansatz:	1,5 µl 10 x Puffer
	10 µl des aufgereinigten PCR-Produktes
	5 U Restriktionsenzym
	ad 15 µl aqua bidest.

### 2.2.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden über ein Agarose-Gel aufgetrennt und über den GFX™ DNA and Gel Band Purification Kit von Amersham Pharmacia Biotech aufgereinigt. Die mit einem Skalpell ausgeschnittenen Agarose-Banden wurden gewogen, mit dem 3fachen Volumen des Bindungspuffers (Capture buffer) 10 min bei 60 °C gelöst, auf die GFX-Säule gegeben, 1 min inkubiert und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule mit 500 µl ethanolhaltigem Waschpuffer gewaschen und bei 13000 rpm 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde in ein frisches Reaktionsgefäß gesetzt, die DNA mit 50 µl aqua bidest. 10 min gelöst und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

### 2.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Der DNA- bzw. RNA-Gehalt und die Reinheit wurde in Verdünnungen über eine UV-Messung bei 260 nm (im Falle von RNA auch bei 280nm) bestimmt und gegen H<sub>2</sub>O abgeglichen. Die Verdünnungen der Nukleinsäuren wurden so gewählt, daß die Absorption zwischen 0,1 und 1,0 OD lag.

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde wie folgt berechnet:

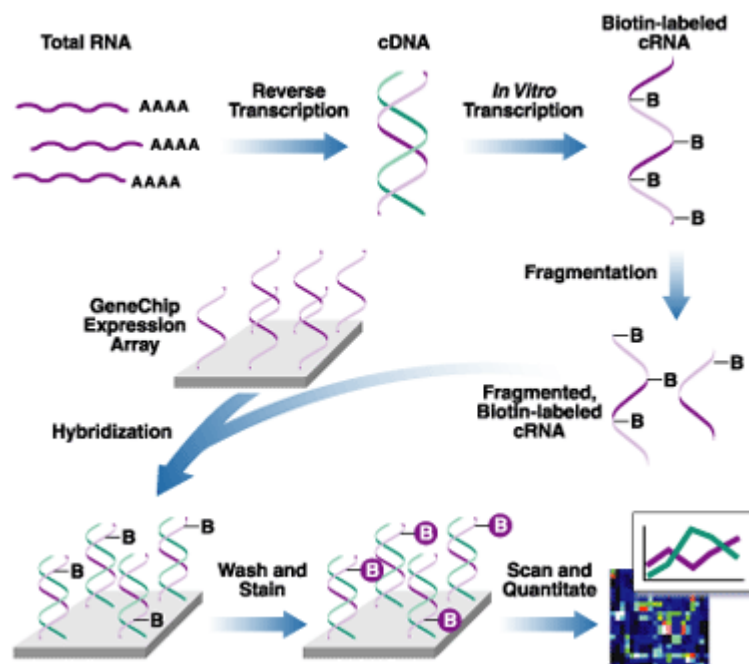
$$\text{RNA}_{\text{Konzentration}} (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 / 1000$$

$$\text{DNA}_{\text{Konzentration}} (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 / 1000.$$

Die Reinheit von RNA wurde aus dem Quotienten der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm berechnet ( $A_{260}/A_{280}$ ). Der Quotient sollte zwischen 1,5 und 1,9 liegen.

### 2.2.10 Affymetrix GeneChip Analyse

Eine Affymetrix GeneChip Analyse wurde an der GBF Braunschweig von der Arbeitsgruppe von Dr. J. Lauber durchgeführt. Dafür wurde gepoolte RNA aus Vollblut von 7 SLE-Patienten in Schub und von 5 SLE-Patienten in Remission mit Hilfe von RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert. Alle weiteren Schritte des Affymetrix Protokolls wurden in Braunschweig durchgeführt. Hier ist das Affymetrix Protokoll im Überblick (Abb. 8):



**Abb. 8: Ablauf der Affymetrix GeneChip Analyse.** (verändert nach Betriebsunterlagen für Affymetrix).

Die einzelnen Schritte des Affymetrix Protokolls sind hier aufgelistet:

- RNA-Isolierung
- Qualitätskontrolle von RNA
- Photometrische Konzentrationsbestimmung
- Erststrang Synthese (Umschrift der RNA in cDNA)
- Zweitstrang Synthese
- Aufreinigung
- In Vitro- Transkription (Umschrift der cDNA in cRNA inkl. Biotin- Labelling)
- Erneute Aufreinigung
- Fragmentierung der cRNA
- Hybridisierung der cRNA-Proben auf den Array (über Nacht)
- Antikörper-Färbung (Markierung via Biotin-Streptavidin)
- Scannen der Arrays
- Primäranalyse (Kontrolle der wichtigsten „Housekeeping-Gene“).

### **2.2.11 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des *unpaired Student's t test*. Die akzeptable Signifikanz für die Aussage „hoch signifikant“ war  $p < 0,05$  und  $p < 0,001$ .

### **2.2.12 Separation von PBL aus Vollblut**

Die Isolierung von Lymphozyten aus Blut von Patienten oder gesunden Spendern erfolgte über eine Dichtegradientenzentrifugation. Heparinisiertes Vollblut wurde zunächst mit PBS 1:2 verdünnt und dann mit 10 ml Ficoll-Trennlösung, Dichte 1,077, in 50-ml-Röhrchen unterschichtet. Nach Zentrifugation bei 1000g für 20 min ohne Bremse wurde die Interphase, die die mononukleären Zellen als Ring über der Ficoll-Lösung enthielt, abgenommen. Die so isolierte Fraktion wurde daraufhin in 50 ml PBS-Puffer bei 1000g und anschließend mit 10 ml PBS-Puffer bei 300g gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in 2 ml PBS-Puffer resuspendiert und gezählt.

### 2.2.13 Durchflusszytometrie (FACS)

In der FACS-Analyse (FACS; *fluorescence activated cell sorter*) kann die Expression von Proteinen auf der Zelloberfläche und unter bestimmten Umständen auch intrazellulär quantitativ gemessen werden. Dabei wurden die Zellen mit einem spezifischen Antikörper gegen das zu untersuchende Protein inkubiert. Wenn dieser Primärantikörper nicht direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war, wurde ein gegen den Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper eingesetzt, der Farbstoff gekoppelt ist. Pro Ansatz wurden etwa 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> Zellen eingesetzt. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an Fc-Rezeptoren zu blockieren, wurden die Proben mit 20 µl humaner IgG-Blocklösung (Endoglobulin) vorinkubiert.

Die Immunfluoreszenzen wurden mit einem Zytofluorimeter ausgewertet. Die zu untersuchenden Zellen werden dabei mit Druck in den so genannten Mantelstrahl (*sheath*) injiziert. Sie werden auf diese Weise beschleunigt und gelangen einzeln hintereinander aufgereiht in die Messkammer. Dort wird jede Zelle von einem kohärenten Laserstrahl getroffen. Das gestreute Licht wird bei 180° (FSC = *forward light scatter*) und bei 90° (SSC = *sideward light scatter*) gemessen. Die entstehende Streuung ist Zelltyp-spezifisch und abhängig von der Größe (FSC) und Granularität (SSC). So entstehen in der Dot Plot Grafik abgegrenzte Punktwolken, die sich den bestimmten Zellarten zuordnen lassen. Durch das Setzen eines „Gates“ werden die gewünschten Zellen eingegrenzt und damit von anderen Zelltypen oder toten Zellen für die Analyse getrennt.

Bei der eigentlichen Fluoreszenzanalyse werden die Antikörper-tragenden Zellen, die auf diese Weise mit einem fluoreszierendem Farbstoff markiert werden, durch einen Laserstrahl bestimmter Wellenlänge angegrenzt und geben dann ein für den Farbstoff charakteristisches Spektrum an Lichtstrahlen ab, das dann durch elektronische Detektoren als Signal aufgefangen und im Vervielfältiger verstärkt wird. Je mehr fluoreszenzmarkierte Antikörper auf der Zelloberfläche gebunden sind, desto größer ist auch die Fluoreszenzintensität der Zelle. Die Autofluoreszenz der Zellen wird durch Negativ-Kontrollen bestimmt und am Computer diskriminiert.

Die durch fluoreszierende, spezifische Antikörper eingefärbten Zellen können so von nicht gefärbten Zellen, die das gesuchte Oberflächenmolekül nicht tragen, unterschieden werden. Die prozentuale Verteilung negativer und

positiver Zellen wird dann im Dot Plot ermittelt. Die Expressionsdichte oder auch die Stärke der Emission wird durch die Höhe der Fluoreszenzintensität (MFI = mediane Fluoreszenzintensität) repräsentiert.

Bei der Auswertung mit entsprechenden Computerprogrammen (CELLQuest oder WinMDI) wurde der Dot Plot gegebenenfalls in Quadranten aufgeteilt sowie die Verteilung der Zellen und die MFI des jeweiligen Quadranten ermittelt.

#### **2.2.14 Durchflusszytometrische Analysen**

Bei den Immunfluoreszenz-Analysen wurden Einfach- und Doppelfärbungen durchgeführt.

Bei der Zweifarbenmessung wurde als erstes die indirekte Färbung durchgeführt. Nach 10 min Inkubation in der Ig-Blocklösung wurde der spezifische Antikörper für 30 min bei 4°C zugegeben. Anschließend wurde nicht gebundener Antikörper durch PBS/BSA/Azid-Lösung abgewaschen und dann mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper 30 min bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde dann erst der direkt gekoppelte Antikörper zur Inkubation zugegeben. Überschüssige Antikörper wurde durch PBS/BSA/Azid weg gewaschen. Um tote Zellen sicher von der Messung ausschließen zu können, wurden die Proben 10 min vor der Messung im FACS mit Propidiumiodid angefärbt.

Bei der Einfarbmessung vereinfachte sich die Messung um einen Farbschritt.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Affymetrix GeneChip Analyse**

#### **3.1.1 Vorbereitung von RNA-Proben für die Affymetrix GeneChip Analyse**

Mit Hilfe einer Affymetrix GeneChip Analyse sollten die hoch- bzw. herunterregulierten Gene bei SLE-Schüben im Vergleich zu SLE-Remissionen identifiziert werden. Hierzu wurden RNA-Proben von SLE-Patienten (n = 7) im akuten Krankheitsstadium (SLE-Schub) und „Ruhestadium“ (Remission) (n = 5) isoliert.

Die RNA wurde jeweils aus frisch entnommenem Vollblut isoliert. Die gepoolten RNA-Proben der SLE-Patienten im Schub und in Remission wurden in Kooperation mit Dr. J. Lauber (GBF Braunschweig) analysiert.

Die RNA im Schub-Pool stammte von 7 SLE-Patienten ausschließlich weiblichen Geschlechts, die RNA im Remission-Pool von 5 SLE-Patienten beider Geschlechter (4 weiblich und 1 männlich).

Nach Affymetrix Protokoll sollte die Gesamtmenge der RNA ca. 9 µg pro Probe betragen. Die RNA-Konzentration sollte mindestens 0,7 µg/µl sein. So hatten unsere RNA-Proben ein Volumen von je 20 µl mit den Konzentrationen:

$c_{\text{SLE-Schub}} = 1,1 \text{ µg/µl}$  und  $c_{\text{SLE-Remission}} = 0,7 \text{ µg/µl}$ . Die Reinheit der RNA-Proben entsprach den Erfordernissen der Affymetrix Analyse und betrug  $R_{\text{E260/E280}}=1,5$ .

#### **3.1.2 Affymetrix GeneChip Analyse**

Zunächst wurde die RNA mit Hilfe des GIBCO Superscript Choice Systems mit T7-dT24 Primer in cDNA umgeschrieben (Erststrang-Synthese). Dann erfolgte die Zweitstrang-Synthese und die cDNA-Aufreinigung. Aus der cDNA wurde mit Hilfe des ENZO BioArray HighYield RNA Transcript Labelling Kits die Biotin-markierte cRNA synthetisiert (In Vitro-Transkription). Die cRNA wurde erneut mit Hilfe des Qiagen RNeasy Kits aufgereinigt und anschließend fragmentiert. Danach wurde die fragmentierte cRNA über Nacht auf den Arrays hybridisiert. Der Hybridisierung folgte eine Antikörper-Färbung der Arrays (Markierung mit Biotin-Streptavidin). Nun erfolgte das Scannen der Arrays mit anschließender Primäranalyse, als Kontrolle wurden die wichtigsten „Housekeeping-Gene“



untersucht. Nach dem Scannen der Arrays wurden die Ergebnisse mit dem Programm Affymetrix Microarray Suite (MAS) 4.0 ausgewertet.

### 3.1.3 Affymetrix GeneChip Ergebnisse

Als Ergebnis der Affymetrix GeneChip Analyse erhielten wir eine Datei mit hoch- bzw. herunterregulierten Genen im Vergleich der RNA aus dem SLE-Schub- mit dem SLE-Remissions-Pool. So ergaben sich im Schub 75 hochregulierte und 170 herunterregulierte Gene.

Die im SLE-Schub hochregulierten Gene sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Chromosomale Lokalisation	Abkürzung	Gen
1q23.3	HSPC163	HSPC163 protein
1q21	FLJ14225	hypothetical protein FLJ14225
1q21	ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
1p36.33	ISG15	interferon-stimulated protein, 15 kDa
1p22.3	GS3686	hypothetical protein, expressed in osteoblast
1p22.3	MTAP44	interferon-induced, hepatitis C-associated microtubular aggregate protein (44kD)
1p22.1		guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kD
2q33.2		DKFZP564A2416 protein
2q32.3-q34		cAMP responsive element binding protein 1
2q23.3	TNFAIP6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6
2p24.3-q24	MDA5	melanoma differentiation associated protein-5
2p12		H.sapiens rearranged gene for kappa immunoglobulin subgroup V kappa IV
3q26.2	IFRG28	28kD interferon responsive protein
3q23		phospholipid scramblase 1
4q32.3	FLJ20035	hypothetical protein FLJ20035
4q22.1-q23	LOC51191	cyclin-E binding protein 1
4q22.1	FLJ20637	hypothetical protein FLJ20637
5q23.3-q31	LMNB1	lamin B1
5q13.1		baculoviral IAP repeat-containing 1
5q13	SMA5	SMA5
6p25.1	MGC3178	
6p21.3-p21		
6p21.3	HLA-DQA1	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1

6p21.3		flotillin 1
6p21.3	H2AFG	H2A histone family, member G
6p21.3	H3FB	H3 histone family, member B
6p21.3	H2BFJ	H2B histone family, member J
6	YKT6	SNARE protein
7q34	FLJ22693	hypothetical protein FLJ22693
7q22.3		similar to murine leucine-rich repeat protein
7q21.3-q22		minichromosome maintenance deficient ( <i>S. cerevisiae</i> ) 7
8q24.3	LY6E	lymphocyte antigen 6 complex, locus E
8q21.13	FABP5	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)
10q25-q26	IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
10q24	IFIT4	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4
10q23.31	RI58	retinoic acid- and interferon-inducible protein (58kD)
11q23.3	KIAA0999	KIAA0999 protein
11q13	FOLR3	folate receptor 3 (gamma)
11p15.5		hemoglobin, beta
11p15.5	HBG1	hemoglobin, gamma A
11p15.5	HBG2	hemoglobin, gamma G
11p15.5	IRF7	interferon regulatory factor 7
12q24.21	KIAA0985	KIAA0985 protein
12q24.2	OAS2	2-5oligoadenylate synthetase 2
12q24.2	OAS3	2-5oligoadenylate synthetase 3
12q24.2	OASL	2-5oligoadenylate synthetase-like
12q24.1	OAS1	2,5-oligoadenylate synthetase 1 (40-46 kD)
12p11.21	LOC51290	CDA14
14q32.33		immunoglobulin heavy constant gamma 3 (G3m marker)
14q32.33		VPS28 protein
14q32	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27
16q13		metallothionein 1F (functional)
16p13.3	HBA1	hemoglobin, alpha 1
16p13.3	HBA1	hemoglobin, alpha 2
16p12-p11.	RBBP6	retinoblastoma-binding protein 6
17q21-qter		myosin, light polypeptide 4, alkali; atrial, embryonic
17q21.2	FLJ11354	hypothetical protein FLJ11354
17q21		interferon-induced protein 35
17q11.2-q2	MCP-1	small inducible cytokine A2 (monocyte chemotactic protein 1, homologous to mouse Sig-je)
19q13.2	ZNF230	zinc finger protein 230
19q13.1	GPR43	G protein-coupled receptor 43

19p13.3		hypothetical protein from EUROIMAGE 2021883
19p13.2-p1	HUPF1	regulator of nonsense transcripts 1
20p13	SN	sialoadhesin
21q22.3	MX1	myxovirus (influenza) resistance 1, homolog of murine (interferon-inducible protein p78)
22q13.1	DJ742C19.2	phorbolin (similar to apolipoprotein B mRNA editing protein)
22q11.1-q1		immunoglobulin lambda locus
22q11.1-q1		immunoglobulin lambda joining 3
22q11.1-q1		H.sapiens mRNA for IgG lambda light chain V-J-C region (clone Tgl11)
Xq22-24	MCT-1	MCT-1 protein

**Tabelle 10: Gene, die im SLE-Schub hochreguliert waren.** Die Chromosomenregionen, in denen anhand früherer Familien-Studien potentielle SLE-Risikogene lokalisiert sind, sind grau markiert.

Die im SLE-Schub herunterregulierten Gene sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Chromosomale Lokalisation	Abkürzung	Gen
1p22.3		LIM domain only 4
1p31.2		prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)
1p31.3	PP1345	
1p31.3-p31	CYP2J2	cytochrome P450, subfamily IJ (arachidonic acid epoxygenase) polypeptide 2
1p35	BAI2	brain-specific angiogenesis inhibitor 2
1p36.2-p36	PAX7	paired box gene 7
1q21-q23	APCS	amyloid P component, serum
1q23		small inducible cytokine subfamily C, member 1 (lymphotactin)
1q23	SCYC2	small inducible cytokine subfamily C, member 2
1q32		complement component (3b4b) receptor 1, including Knops blood group system
1q32.1	ADORA1	adenosine A1 receptor
2p12-q11	GNLY	granulysin
2p22.2	FLJ23459	hypothetical protein FLJ23459
2q12-q22	IL1R2	interleukin 1 receptor, type II

2q32.1	PRO1316	hypothetical protein PRO1316
2q33	FZD7	frizzled (Drosophila) homolog 7
2q35	WNT6	wingless-type MMTV integration site family, member 6
2q35-q36.1	PTPRN	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N
3q26.1		SMC4 (structural maintenance of chromosomes 4, yeast)-like 1
4p16.3		leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1
4q	RRH	retinal pigment epithelium-derived rhodopsin homolog
4q11-q12	KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
4q13.1-q21	PRKG2	protein kinase, cGMP-dependent, type II
4q21	FGF5	fibroblast growth factor 5
4q21.3	DKFZP564 B1162	
4q28	APG-1	heat shock protein (hsp110 family)
5p15	TAS2R1	taste receptor, type 2, member 1
5p15.1-p14		Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434H0229 (from clone DKFZp434H0229)
5q14.1	MGC5499	hypothetical protein MGC5499
5q31.3-q32		secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
5q34-q35	GFPT2	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2
6p11-q11	HCRTR2	hypocretin (orexin) receptor 2
6p12	GSTA4	glutathione S-transferase A4
6p12.1		KIAA0728 protein
6p12.1	BMP5	bone morphogenetic protein 5
6p21.3		Homo sapiens, clone MGC:12387, mRNA, complete cds
6p21.3		Notch (Drosophila) homolog 4
6p21.3		prostate epithelium-specific Ets transcription factor
6p21.3	PPT2	palmitoyl-protein thioesterase 2
6p21.3	CREBL1	cAMP responsive element binding protein-like 1
6p21.31	NG3	NG3 protein
6q12		malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic
6q22.2-23.	PTPRK	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K
6q25.1		Human DNA sequence from clone RP1-6315 on chromosome 6q25.1-26. Contains the 3 part of a novel gene and an exon of the ESR1 gene for estrogen receptor 1 (NR3A1, estradiol receptor), ESTs, STSs and GSSs

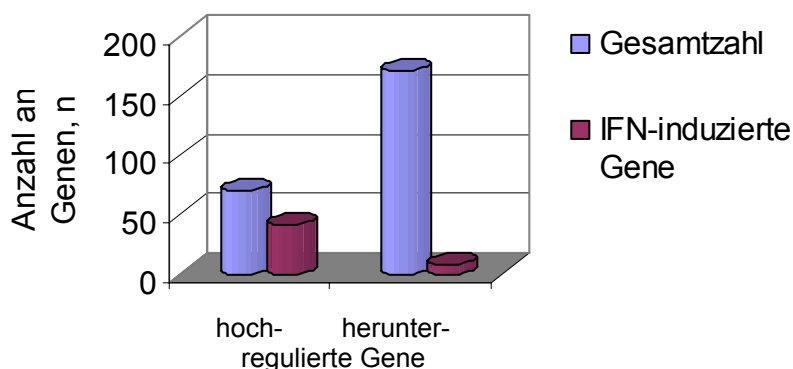
7p15	DFNA5	deafness, autosomal dominant 5
7q22.1	HSPC047	HSPC047 protein
7q31.1		caveolin 2
8p21	FZD3	frizzled (Drosophila) homolog 3
8p22		Putative prostate cancer tumor suppressor
8q24.3	GPT	glutamic-pyruvate transaminase (alanine aminotransferase)
9p22	IFNA13	interferon, alpha 13
9p24-p13	AK3	adenylate kinase 3
9q21.33	CCRK	cell cycle related kinase
9q22	NR4A3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
9q22.1	HFSE-1	Homo sapiens HSFE-1 mRNA, partial cds
9q22.1	NTRK2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
9q33.1	PAPPA	pregnancy-associated plasma protein A
9q34		Human DNA sequence from clone RP4-661I20 on chromosome 20q11.23-12 Contains a gene for a protein similar to RPL12 (ribosomal protein L12), part of a novel Helicase C-terminal domain and SNF2 N-terminal domains containing protein, ESTs, STSs, GSSs and CpG
10p15	ITIH2	inter-alpha (globulin) inhibitor, H2 polypeptide
10pter-q26	FLJ20500	hypothetical protein
10q22.1	NET-7	transmembrane 4 superfamily member (tetraspan NET-7)
11p11.2		folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1
11p12-p11	EXT2	exostoses (multiple) 2
11p12-p13		ESTs, Moderately similar to JC4969 pig-c protein H.sapiens
11p15.2-p1		calcitonin-related polypeptide, beta
11p15.3-p1	Wee1 Hu	wee1+ (S. pombe) homolog
11q13	EFEMP2	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2
12p13.2	PRB1	proline-rich protein BstNI subfamily 1
12q12	FLJ13166	hypothetical protein FLJ13166
12q13	IGFBP6	insulin-like growth factor binding protein 6
12q15	HMGIC	
12q23.1		nuclear receptor subfamily 2, group C, member 1
12q24.33		piwi (Drosophila)-like 1
12q24.33	ZNF84	zinc finger protein 84 (HPF2)

12q24.3-qt	BAZ2A	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2A
13q12.13		Human DNA sequence from clone RP11-352D3 on chromosome 20 Contains a 60S ribosomal protein L21 (RPL21) pseudogene, ESTs, STSs and GSSs
13q12.3-q1	RFC3	replication factor C (activator 1) 3 (38kD)
13q13.1		KIAA0610 protein
13q13.3		A kinase (PRKA) anchor protein 11
13q21		spinocerebellar ataxia 8
13q21.32	bteb2	Kruppel-like factor 5 (intestinal)
13q34	IRS2	insulin receptor substrate 2
13q34		collagen, type IV, alpha 2
14q11.2		nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 4
14q11.2		T cell receptor delta locus
14q23-q24.	SPTB	spectrin, beta, erythrocytic (includes spherocytosis, clinical type I)
14q24.1		KIAA0227 protein
14q24.2	FLJ10811	hypothetical protein FLJ10811
14q32	EMAPL	echinoderm microtubule-associated protein-like
14q32		maternally expressed 3
15q12	KIAA1018	KIAA1018 protein
15q13-qter	M1LP	Homo sapiens microtubule-associated protein 1A like protein (M1LP) mRNA, partial cds
15q14		glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)
15q21	BCL2L10	BCL2-like 10 (apoptosis facilitator)
15q21.2	RALDH2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2
15q21.3	FLJ20151	hypothetical protein FLJ20151
15q22		carbonic anhydrase XII
15q26	PACE4	paired basic amino acid cleaving system 4
15q33.33	FLJ23168	hypothetical protein FLJ23168
16	FLJ20718	hypothetical protein FLJ20718
16p12.1	QPRT	quinolinate phosphoribosyltransferase (nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase (carboxylating))
16p13.3	CCNF	cyclin F
17p13.1	ALOX15B	arachidonate 15-lipoxygenase, second type
17q12-q21	MPP3	membrane protein, palmitoylated 3 (MAGUK p55 subfamily member 3)
17q21.1	FLJ22865	hypothetical protein FLJ22865

19p13.3	TLE1	transducin-like enhancer of split 1, homolog of Drosophila E(sp1)
19p13.3-p1		erythropoietin receptor
19q13.1	ATP4A	ATPase, H+K+ exchanging, alpha polypeptide
19q13.2	CYP2A6	cytochrome P450, subfamily IIA (phenobarbital-inducible), polypeptide 6
19q13.2		cytochrome P450, subfamily IIB (phenobarbital-inducible), polypeptide 6
19q13.2	NCA	
19q13.2	CYP2A7	cytochrome P450, subfamily IIA (phenobarbital-inducible), polypeptide 7
19q13.3-q1		ferritin, light polypeptide
19q13.4	KIR3DL2	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 2
19q13.4	KIR-123FM	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 1
19q13.4	ZIM2	zinc finger, imprinted 2
20q11.23-q	BPI	bactericidal permeability-increasing protein
20q11.2-q1	NNAT	neuronatin
20q13		bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)
20q11.2-q1	NNAT	neuronatin
20q13		bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)
22	KIAA1649	hypothetical protein
22q11.21		catechol-O-methyltransferase
22q13	FLJ20635	hypothetical protein FLJ20635
22q13.1	SYNGR1	synaptogyrin 1
Xp11	SREB3	super conserved receptor expressed in brain 3
Xq21-q22		voltage-dependent anion channel 1 pseudogene
Xq22-q23	MYCL2	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog 2
Yp11.3	RPS4Y	ribosomal protein S4, Y-linked
Yq11	DAZ3	deleted in azoospermia 3
Yq11.221		eukaryotic translation initiation factor 1A, Y chromosome
Yq11.221	PRY	Testis-specific PTP-BL-related protein on Y
Yq11.23	RBM1A1	RNA binding motif protein, Y chromosome, family 1, member A1

**Tabelle 11: Gene, die im SLE-Schub herunterreguliert waren.** Die Bereiche mit potentiellen SLE-Risikogenen sind grau markiert.

Folgende Abbildung repräsentiert schematisch die Affymetrix-Ergebnisse. Viele Gene, die hoch- bzw. herunterreguliert sind, sind IFN-induziert.



**Abb. 9: Ergebnisse von Affymetrix Gene Chip Analyse.** Die Anzahl an unterschiedlich exprimierten Genen bei SLE-Schub- und SLE-Remission-Patienten (blau), und die Anzahl an Gene, die IFN-induziert werden (dunkelrot).

### 3.2 KIR-Phänotypisierung

#### 3.2.1 Bekannte KIR-Phänotypen

Da in der Region 19q13.4 ein Risikolokus des SLE liegt, und einige der dort lokalisierten KIR im SLE-Schub reguliert wurden, und KIR potentiell an der Virusabwehr beteiligt sind, untersuchten wir im Folgenden die Assoziation der KIR mit SLE und Sklerodermie genauer.

Aus Veröffentlichungen von Uhrberg et. al. (48) ist bekannt, dass jedes Individuum ein eigenes genetisch bedingte Repertoire an aktivierenden KIRxDSy und inhibitorischen KIRxDLy hat (x=Anzahl der extrazellulären Ig-Domänen, y=KIR-Subfamilie, L="long": lange cytoplasmatische Domäne (inhibitorisch), S="short": kurze cytoplasmatische Domäne (aktivierend)). Es gibt häufige und seltene KIR-Phänotypen.

Phäno- typ	KIR									
	2DL1	2DL2	2DL3	3DL1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DS1
#1	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-
#2	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+

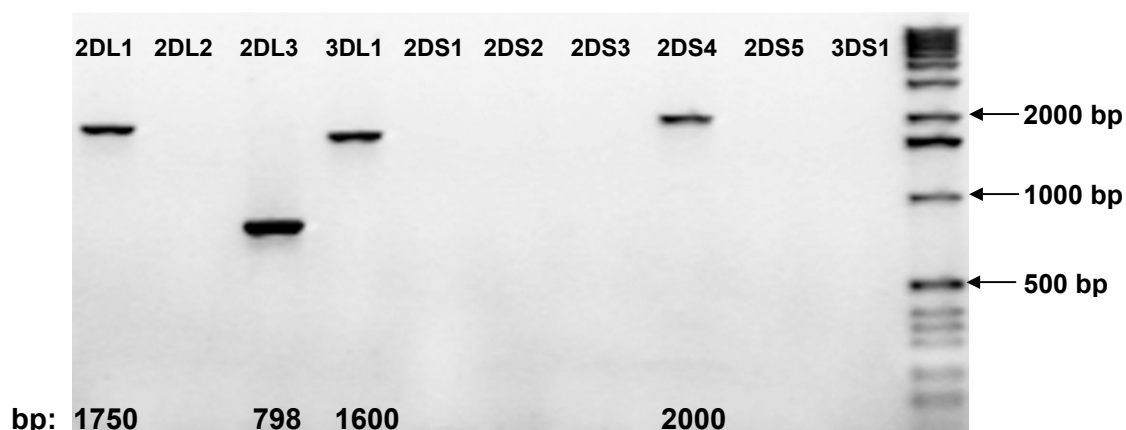


#3	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-
#4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
#5	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
#6	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
#7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
#8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
#9	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
#10	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
#11	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+
#12	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-

**Tabelle 12: Überblick über häufig vorkommende KIR-Phänotypen.** Das „+“ Zeichen steht für „vorhanden“ und „-“ für „nicht vorhanden“. So stellt z.B. der häufigste Phänotyp #1 eine Kombination aus drei inhibitorischen KIR (2DL1, 2DL3, 3DL1) und einem aktivierenden KIR2DS4 dar.

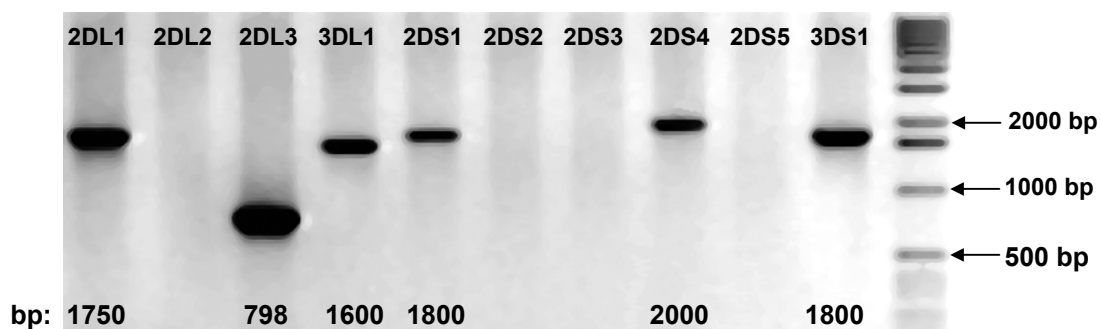
Mit Hilfe einer PCR mit spezifischen Primer für KIR (48) wurden die KIR-Phänotypen von 200 SLE-, 104 Sklerodermie-Patienten und 103 gesunden Kontrollen ermittelt. Dazu wurden die PCR-Produkte auf ein 1,5%-Agarosegel aufgetragen und durch Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. So wurden die KIR-Muster zu den bekannten bzw. neuen KIR-Phänotypen zugeordnet.

Auf den folgenden Abbildungen sind einige häufig vorkommende KIR-Phänotypen: #1, #2 und #7 dargestellt. Die Abb.10 repräsentiert das häufigste KIR-Muster des Phänotyps #1.



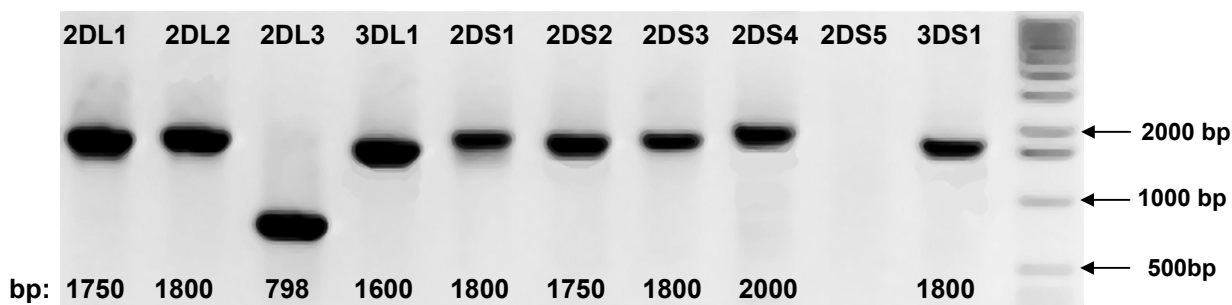
**Abb. 10: Phänotypisierung von KIR.** Dargestellt ist die spezifische Amplifikation des KIR-Phänotyps #1 mittels PCR. Der häufige Phänotyp #1 ist aus drei inhibitorischen KIR (2DL1, 2DL3, 3DL1) und einem aktivierenden 2DS4 zusammengesetzt.

Der KIR-Phänotyp #2 ist im Gegensatz zum Phänotyp #1 zum gleichen Teil aus inhibitorischen und aktivierenden KIR zusammengesetzt (Abb. 11).



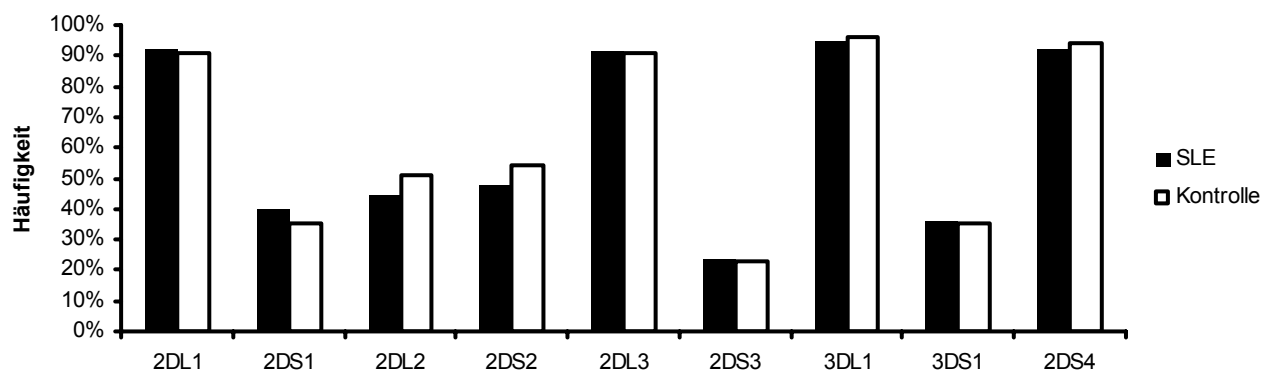
**Abb. 11: Phänotypisierung von KIR.** Spezifische Amplifikation des KIR-Phänotyps #2 mittels PCR. Der häufige Phänotyp #2 ist eine Kombination aus drei inhibitorischen KIR (2DL1, 2DL3, 3DL1) und drei aktivierenden KIR (2DS1, 2DS4, 3DS1).

Beim KIR-Phänotyp #7 (Abb. 12) sind zum größten Teil aktivierende KIR vertreten.



**Abb. 12: Phänotypisierung von KIR.** Spezifische Amplifikation des bekannten KIR-Phänotyps #7 mittels PCR. Der häufige Phänotyp #7 ist eine Kombination aus vier inhibitorischen KIR: 2DL1, 2DL2, 2DL3, 3DL1 und fünf aktivierenden KIR: 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4 und 3DS1.

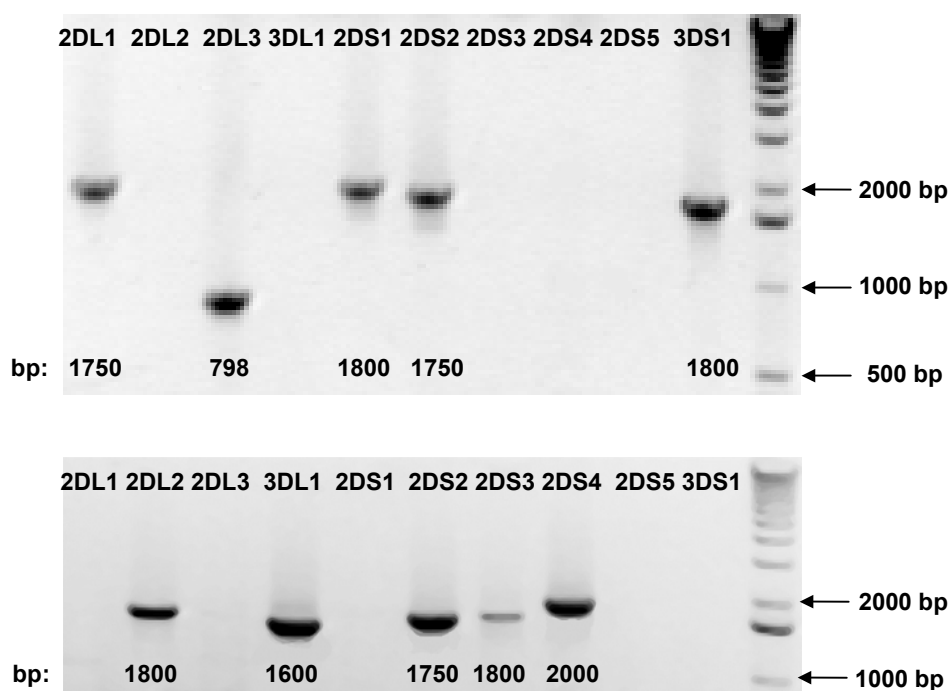
Nachdem die bekannten KIR-Phänotypen bei SLE-, Sklerodermie-Patienten und Kontrollen ermittelt wurden, haben wir die Verteilung von einzelnen aktivierenden und inhibitorischen KIR bei SLE bzw. Sklerodermie mit gesunden Kontrollen verglichen (Abb. 13).



**Abb. 13: Häufigkeit von einzelnen KIR beim SLE.** Sowohl die inhibitorischen als auch die aktivierenden KIR sind bei SLE-Patienten (schwarze Balken) gleich häufig wie bei gesunden Kontrollen (graue Balken).

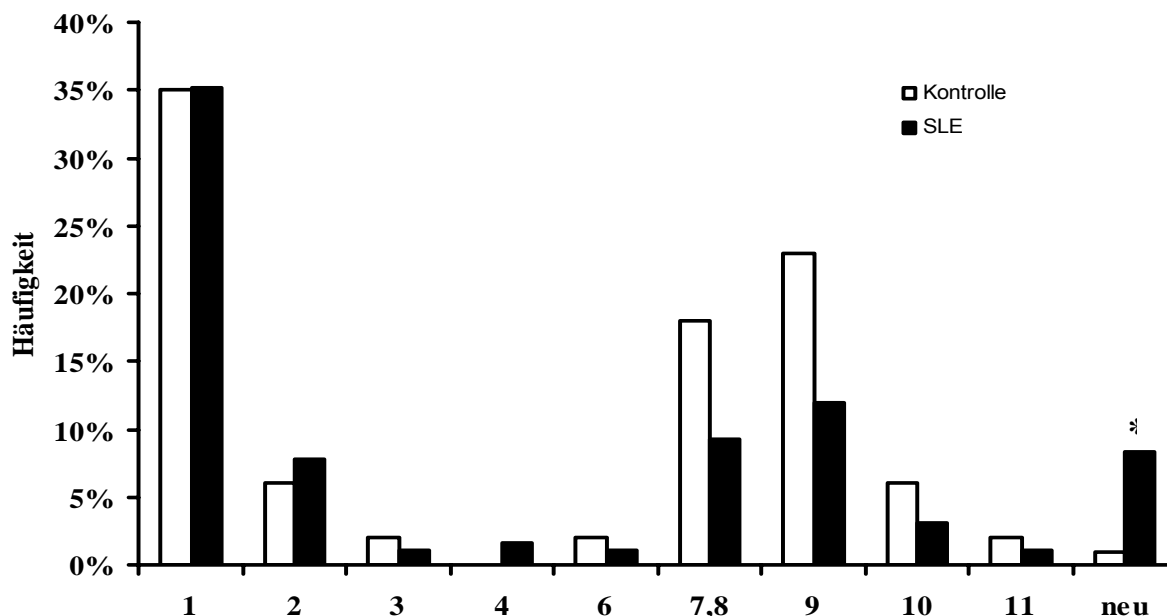
### 3.2.2 Neue KIR-Phänotypen bei SLE und Sklerodermie

Nach dem Vergleich der einzelnen KIR wurde die Verteilung der KIR-Phänotypen (Kombination von KIR) bei SLE, Sklerodermie und Kontrollen analysiert. Bei der Untersuchung der SLE-Patienten wurden neue KIR-Phänotypen entdeckt, die andere Kombinationen an KIR als in bereits veröffentlichten häufigen und seltenen KIR-Phänotypen aufweisen (Abb. 14).



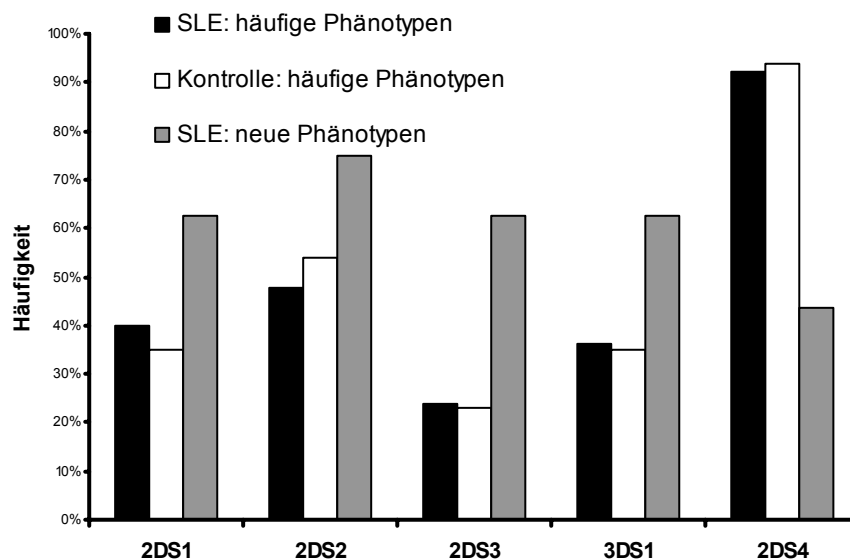
**Abb. 14: Phänotypisierung von KIR beim SLE.** Spezifische Amplifikation von zwei bisher noch nicht publizierten neuen KIR-Phänotypen mittels PCR.

Insgesamt wurden bei 12/200 SLE-Patienten neue KIR-Kombinationen entdeckt, die nur bei SLE-Patienten auftreten. Bei 103 gesunden Kontrollen wurden dagegen nur 2 neue KIR-Phänotypen identifiziert ( $p < 0,02$ ) (Abb. 15).

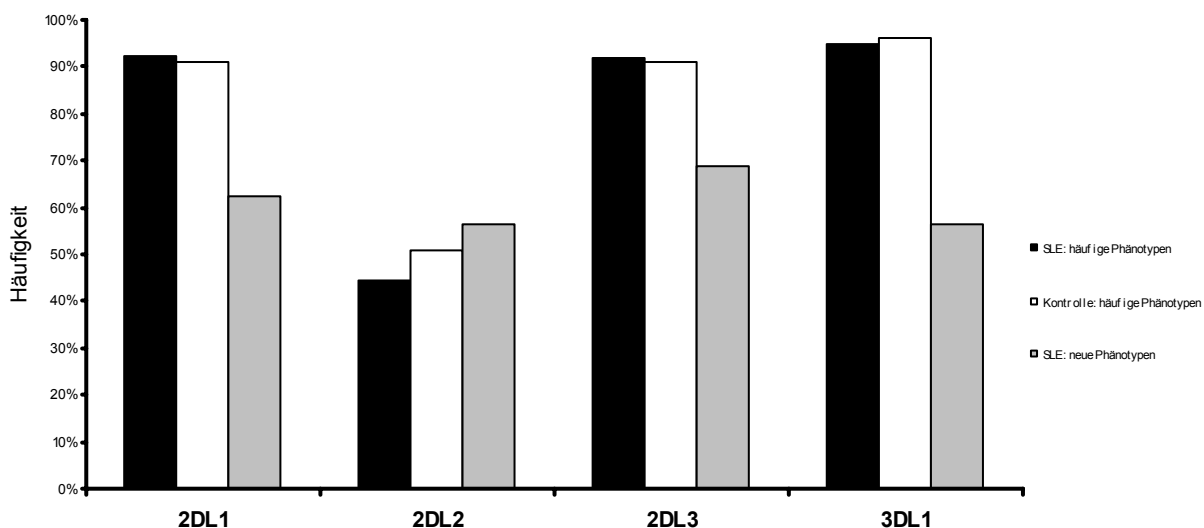


**Abb. 15: Neue und bekannte KIR-Phänotypen beim SLE.** Mittels spezifischer PCR wurden 12 neue KIR-Phänotypen bei SLE-Patienten identifiziert. Im Gegensatz dazu wurden bei gesunden Kontrollen nur 2 neue KIR-Kombinationen festgestellt (Signifikanz  $p < 0,02$ ).

Bei SLE-Patienten scheinen die aktivierenden KIR bei neuen Phänotypen häufiger vorhanden zu sein als die inhibitorischen KIR. Um diese Aussage zu bestätigen, wurden die aktivierenden und inhibitorischen KIR getrennt dargestellt und verglichen (Abb. 16, 17).

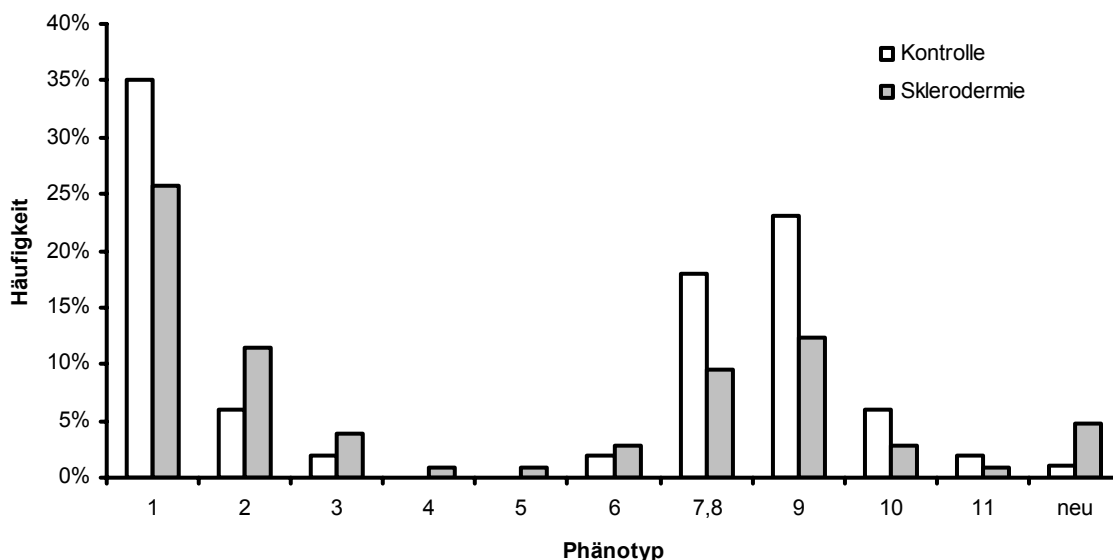


**Abb. 16: Häufigkeiten von aktivierenden KIR in den 12 neuen Phänotypen beim SLE.** In neuen Phänotypen kommen die aktivierenden häufiger als die inhibitorischen KIR. Die häufigen KIR-Phänotypen des SLE sind als schwarze Balken, die häufigen Phänotypen von gesunden Kontrollen als weiße Balken und die neuen Phänotypen des SLE als graue Balken dargestellt.



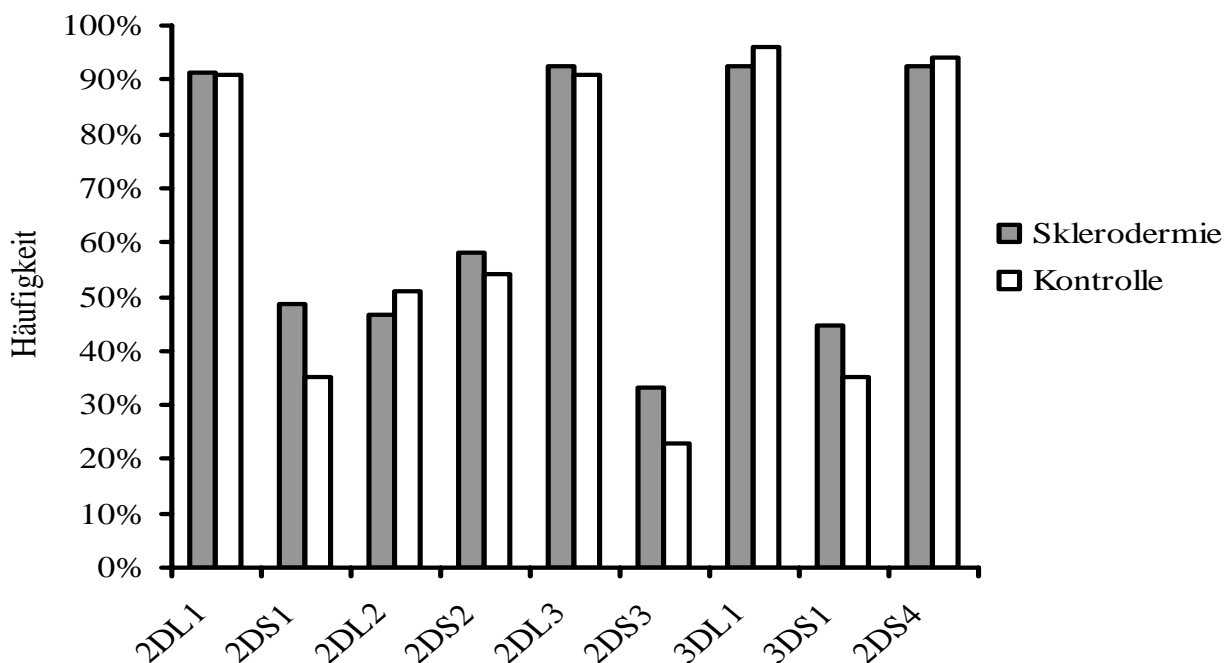
**Abb. 17: Häufigkeiten von inhibitorischen KIR in den 12 neuen Phänotypen beim SLE.** In neuen Phänotypen kommen die inhibitorischen KIR weniger häufig vor als die inhibitorischen KIR. Die häufigen KIR-Phänotypen des SLE sind als schwarze Balken, die häufigen Phänotypen von gesunden Kontrollen als weiße Balken und die neuen Phänotypen des SLE als graue Balken dargestellt.

Die neuen KIR-Kombinationen bei der Sklerodermie waren nicht signifikant häufiger als bei Kontrollen (Abb.18).



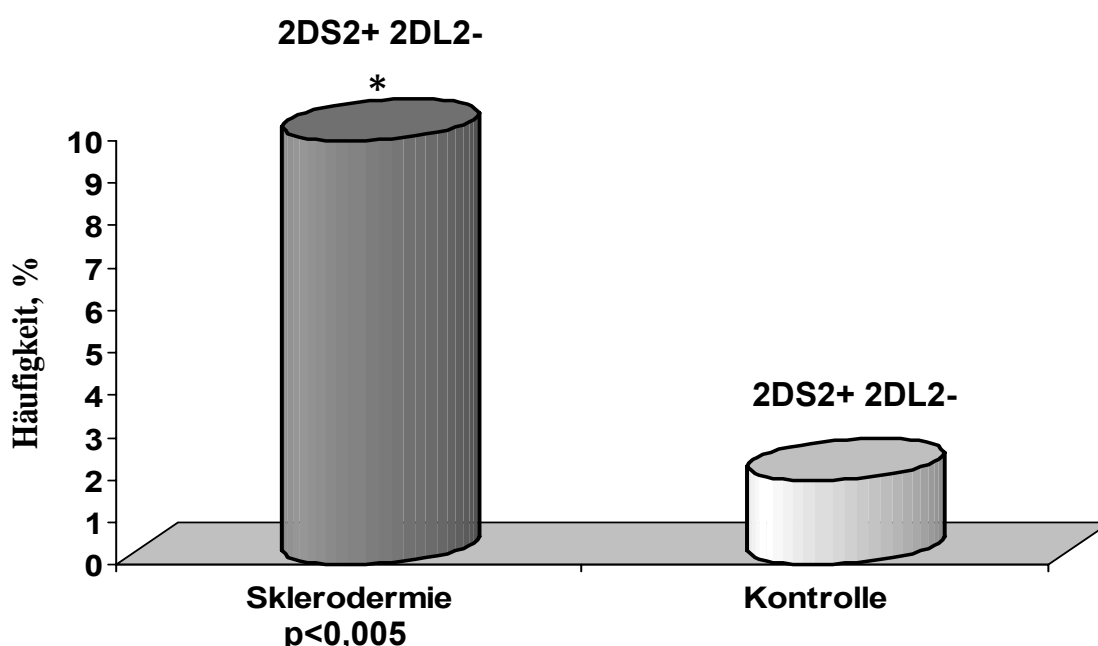
**Abb. 18: Neue und bekannte KIR-Phänotypen bei Sklerodermie.** Fünf neue KIR-Phänotypen wurden bei 104 Sklerodermie-Patienten definiert (n.s.).

Bei der KIR-Phänotypisierung von Sklerodermie-Patienten ergab sich eine ähnliche Verteilung wie beim SLE. Wir konnten zeigen, dass die Häufigkeit einzelner KIR bei Sklerodermie vergleichbar mit der gesunder Kontrollen ist (Abb. 19).



**Abb. 19: Häufigkeit einzelner KIR bei Sklerodermie.** Sowohl inhibitorische als auch aktivierende KIR sind bei Sklerodermie-Patienten (graue Balken) vergleichbar häufig wie bei gesunden Kontrollen (weiße Balken).

Bei 5/104 Sklerodermie-Patienten wurden neue KIR-Phänotypen definiert (Abb.20), die noch nie zuvor in der Literatur beschrieben wurden. Die KIR-Kombination 2DS2+2DL2- wurde bei 12/103 Sklerodermie-Patienten und bei 2/103 Kontrollen beobachtet (Signifikanz  $p < 0,005$ ). Die weiteren Kombinationen an aktivierenden und inhibitorischen KIR-Rezeptoren, wie z.B. KIR2DS1+KIR2DL1- oder KIR2DS3+KIRDL3- oder KIR3DS1+KIR3DL1, waren dagegen nicht mit dieser Erkrankung assoziiert.



**Abb. 20: Häufigkeit der KIR-Kombination 2DS2+2DL2- bei Sklerodermie.** Die Kombination KIR2DS2+KIR2DL2- ist mit Sklerodermie assoziiert ( $p < 0,005$ ).

### 3.2.3 Quantitative RT-PCR (TaqMan) Analyse beim SLE

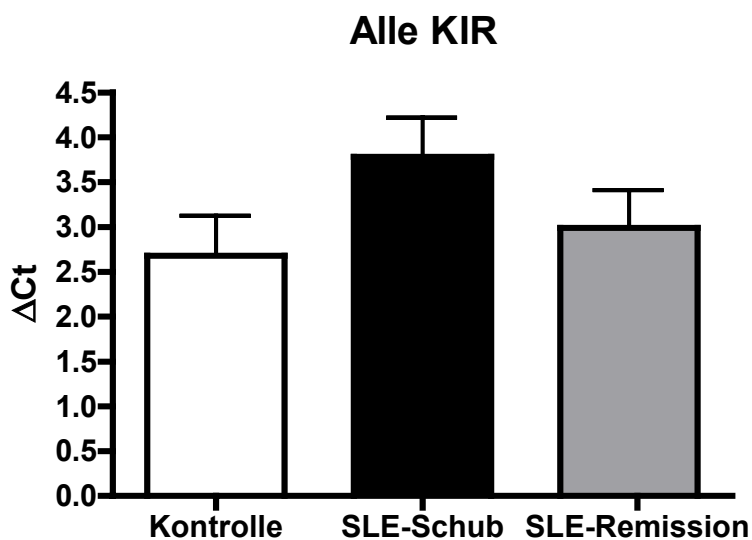
Um die Ergebnisse der KIR-Phänotypisierung und der Affymetrix-Analyse zu erweitern und zu bestätigen, wurde die quantitative Real-Time PCR (TaqMan) mit RNA von SLE-Patienten im Schub, Remission und von gesunden Kontrollen durchgeführt.

Zunächst wurden die spezifischen Primer und Sonden, die den Anforderungen für die quantitative RT-PCR entsprechen, für die KIR entworfen.

Nach erfolgreicher Primer-Auswahl für die real-time RT-PCR wurden die Konzentrationen an  $Mn(OAc)_2$  für jedes Primer-Sondenset für einzelne KIR optimiert und wenn nötig, die Primerkonzentrationen ausgeglichen. Nachdem die Vorbereitungen einer real-time RT-PCR abgeschlossen waren, konnten wir

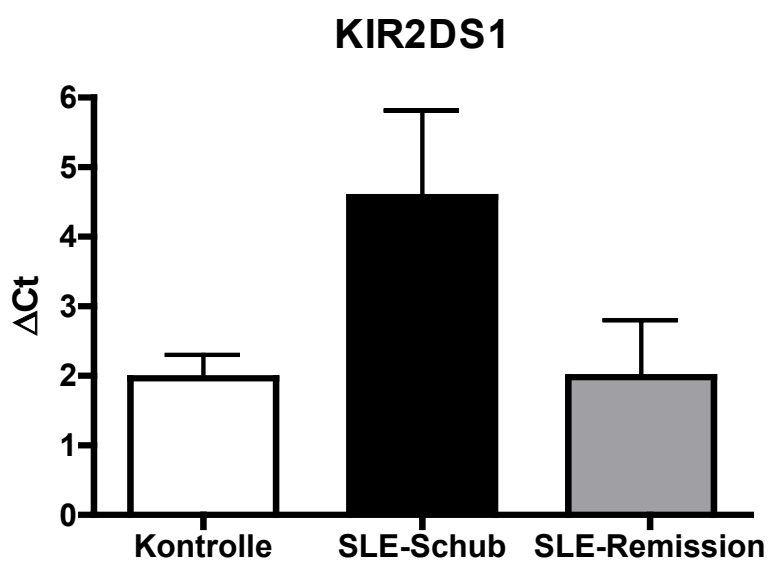
die Expression folgender KIR bei SLE-Patienten im Schub und in Remission und bei gesunden Blutspendern messen: KIR2DL1, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR3DL1, KIR3DS1 und KIR2DL3.

Betrachtet man alle KIR gemeinsam (Abb. 21), sind die KIR im SLE-Schub im Vergleich zur gesunden Kontrollen bzw. SLE-Remission hochreguliert.



**Abb. 21: Expressionsvergleich aller KIR mittels real-time RT-PCR.** Allgemein sind alle KIR auf mRNA-Ebene im SLE-Schub im Vergleich zu gesunden Kontrollen und SLE-Remission hochreguliert.

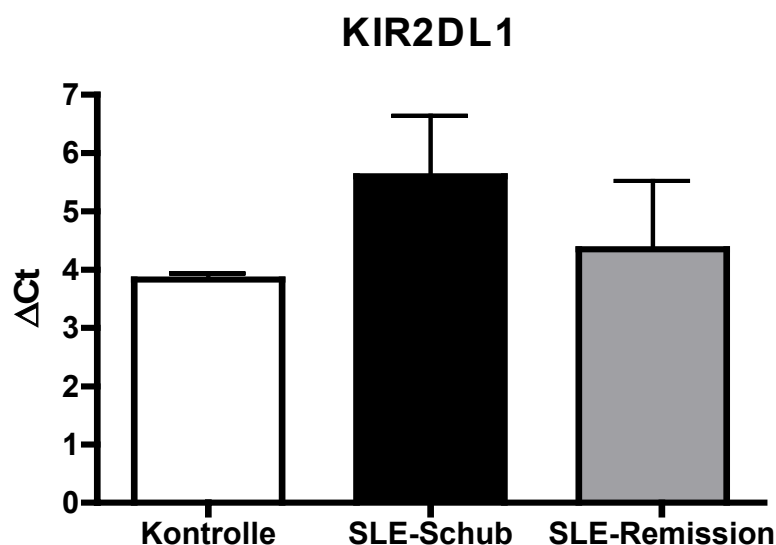
Bei der Analyse der einzelnen KIR zeigte sich, dass der aktivierende KIR2DS1 im SLE-Schub hochreguliert ist (Abb.22).



**Abb. 22: Regulation von KIR2DS1 mittels real-time PCR.** Die Expression des aktivierenden KIR2DS1 ist im SLE-Schub im Vergleich zu gesunden Kontrollen und SLE-Remission signifikant erhöht ( $p < 0,01$ ).



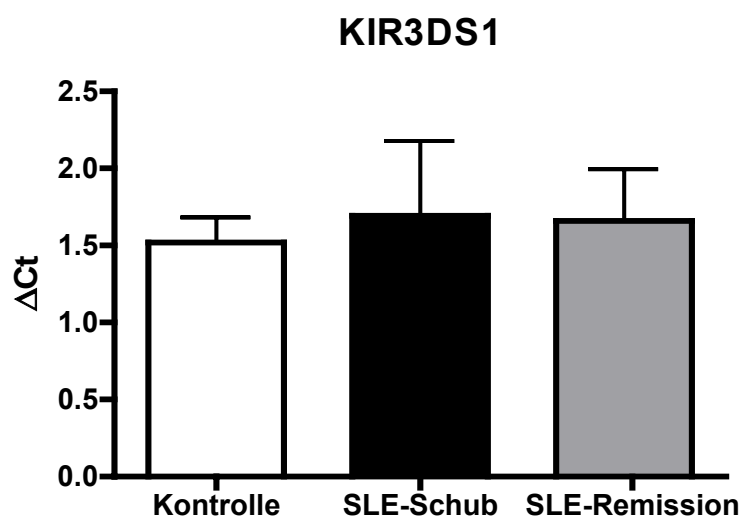
Die Expression des inhibitorischen Rezeptors KIR2DL1 unterscheidet sich dagegen im SLE-Schub nicht von der gesunder Kontrollen bzw. SLE-Remission (Abb.23).



**Abb. 23: Regulation des KIR2DL1.** Die Expression des inhibitorischen KIR2DL1 ist im SLE-Schub im Vergleich zu gesunden Kontrollen und SLE-Remission nicht signifikant verändert.

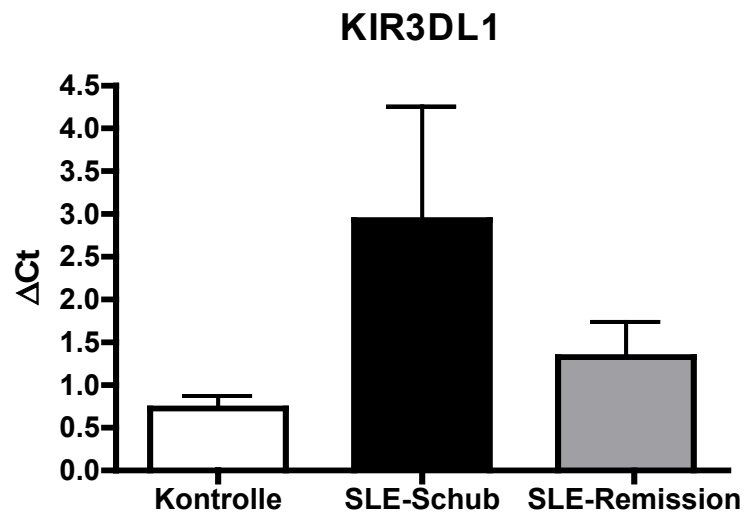
Bei den Rezeptoren KIR3DS1 und KIR3DL1 ergab sich ein anderes Expressionsmuster.

Die Expression des aktivierenden Rezeptor KIR3DS1 ist beim SLE-Schub vergleichbar mit der gesunder Kontrollen und der in SLE-Remission (Abb. 24).



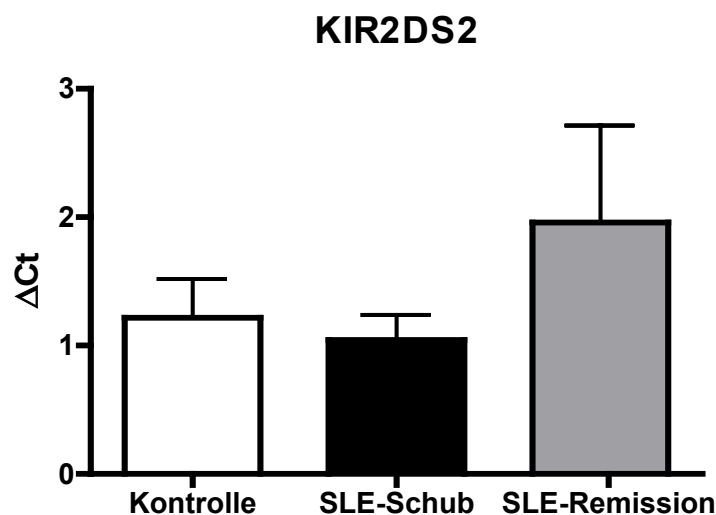
**Abb. 24: Regulation des KIR3DS1.** Die Expression des aktivierenden KIR3DS1 ist im SLE-Schub vergleichbar mit der gesunder Kontrollen und in SLE-Remission (n.s.).

Die Expression des inhibitorischen KIR3DL1 war beim SLE-Schub im Vergleich zu gesunden Kontrollen bzw. SLE-Remission erhöht, ohne dass eine Signifikanz erreicht wurde (Abb. 25).



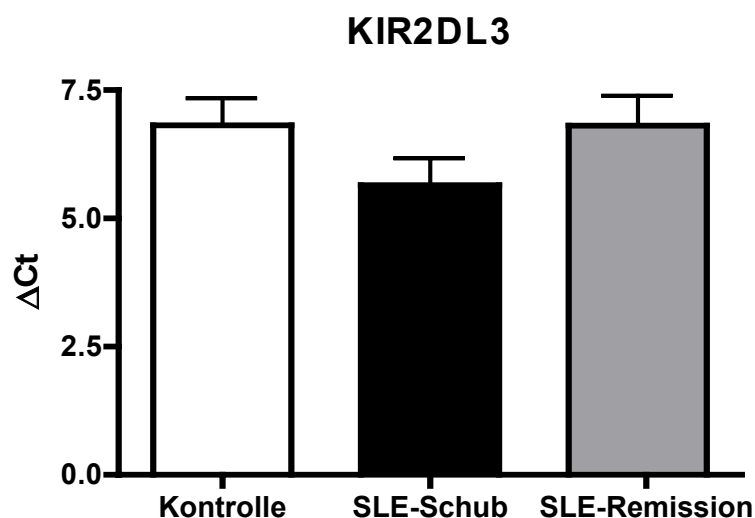
**Abb. 25: Regulation des KIR3DL1.** Die Expression des inhibitorischen KIR3DL1 ist im SLE-Schub im Vergleich zu gesunden Kontrollen und SLE-Remission erhöht (n.s.).

Die Expression des aktivierenden KIR2DS2, der bei den meisten KIR-Phänotypen vorkommt, ist im SLE-Schub gegenüber gesunden Kontrollen und SLE-Remission nicht signifikant verändert (Abb. 26).



**Abb. 26: Regulation des KIR2DS2.** Die Expression des aktivierenden KIR2DS2 ist im SLE-Schub im Vergleich zu gesunden Kontrollen und SLE-Remission niedriger (n.s.).

Die Expression des inhibitorischen KIR2DL3 ist mit der der gesunden Kontrollen und SLE-Remission vergleichbar (Abb. 27).

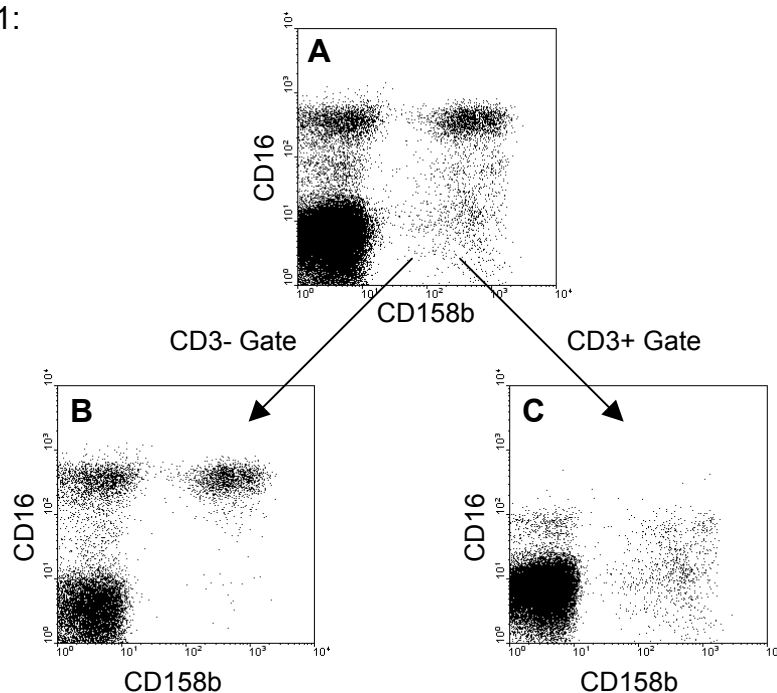


**Abb. 27: Regulation des KIR2DL3.** Die Expression des inhibitorischen KIR2DL3 ist im SLE-Schub vergleichbar mit gesunden Kontrollen und SLE-Remission (n.s.).

### 3.2.4 Durchflusszytometrische Analyse von KIR

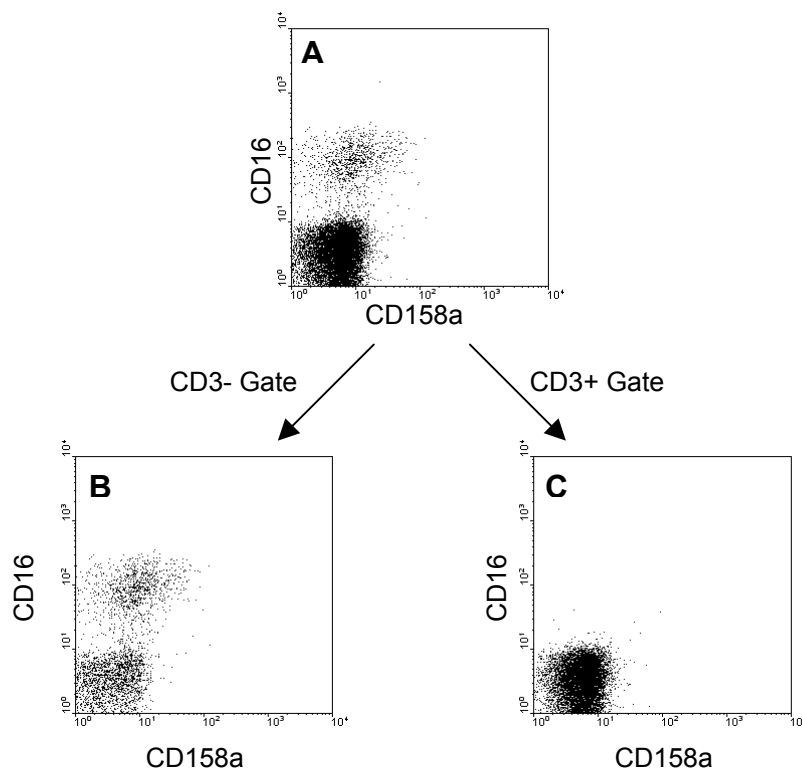
Um die Expression von KIR quantitativ zu bestimmen, musste eine quantitative real-time PCR angewendet werden. Die FACS-Analyse war dagegen ungeeignet, weil es keine Antikörper für einzelne KIR gibt. Der Antikörper CD158a erkennt sowohl den inhibitorischen Rezeptor KIR2DL1 als auch den extrazellulär identischen aktivierenden KIR2DS1. Ein weiterer KIR-Antikörper gegen CD158b erkennt Epitope von drei unterschiedlichen Rezeptoren: KIR2DL2, KIR2DS2 und KIR2DL3. Im Folgenden ist exemplarisch die FACS-Analyse von zwei Spendern gezeigt (Abb.28 und 29).

Spender 1:



**Abb. 28: Expression von CD16 und CD158b auf NK- und T-Zellen.** Dreifachfluoreszenz-Untersuchung von PBMC (Lymphozytengate). (A) Repräsentatives Beispiel der Expression von CD16 und CD158b auf Lymphozyten. (B) CD16<sup>-</sup> und CD158b-exprimierende CD3<sup>-</sup> NK-Zellen. (C) CD16<sup>-</sup> und CD158b-exprimierende CD3<sup>+</sup> T-Zellen.

Spender 2:



**Abb. 29: Expression von CD16 und CD158a auf NK- und T-Zellen.** Dreifachfluoreszenz-Untersuchung von PBMC (Lymphozytengate). (A) Repräsentatives Beispiel der Expression von CD16 und CD158a auf Lymphozyten. (B) CD16<sup>-</sup> und CD158a-exprimierende CD3<sup>-</sup> NK-Zellen. (C) CD16<sup>-</sup> und CD158a-exprimierende CD3<sup>+</sup> T-Zellen.

### 3.3 Assoziation von SLE und Sklerodermie mit MBL-Allelen

#### 3.3.1 RFLP-Analyse der MBL-Allele mittels PCR

Zur RFLP-Analyse der MBL-Allele haben wir DNA-Proben von SLE-Patienten und gesunden Kontrollen isoliert. Tabelle 13 gibt eine Übersicht über die Anzahl der isolierten DNA-Proben von Patienten und Kontrollen, die für die MBL-Analyse eingesetzt wurden.

Patienten bzw. gesunde Kontrollen	Anzahl der DNA-Proben
Gesunde Kontrollen	120
SLE	286

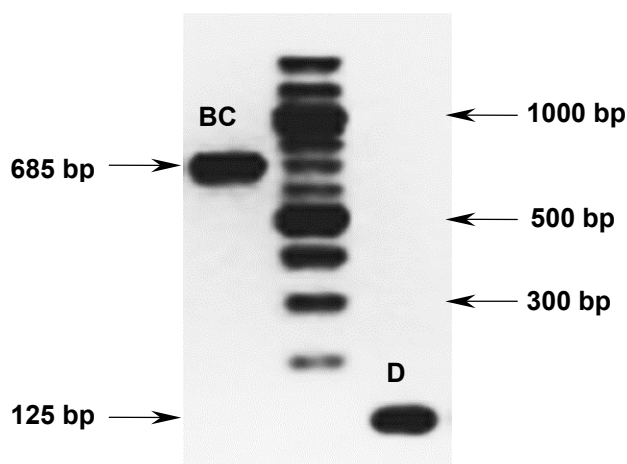
**Tabelle 13: Anzahl der DNA-Proben von Patienten und gesunden Kontrollen.**

Das Exon 1 des MBL-Gens, in dem die für die MBL-Defizienz entscheidenden Aminosäuren in den Positionen 52, 54 und 57 lokalisiert sind, wurde mit Hilfe von zwei Primerpaaren (BC und D) amplifiziert.

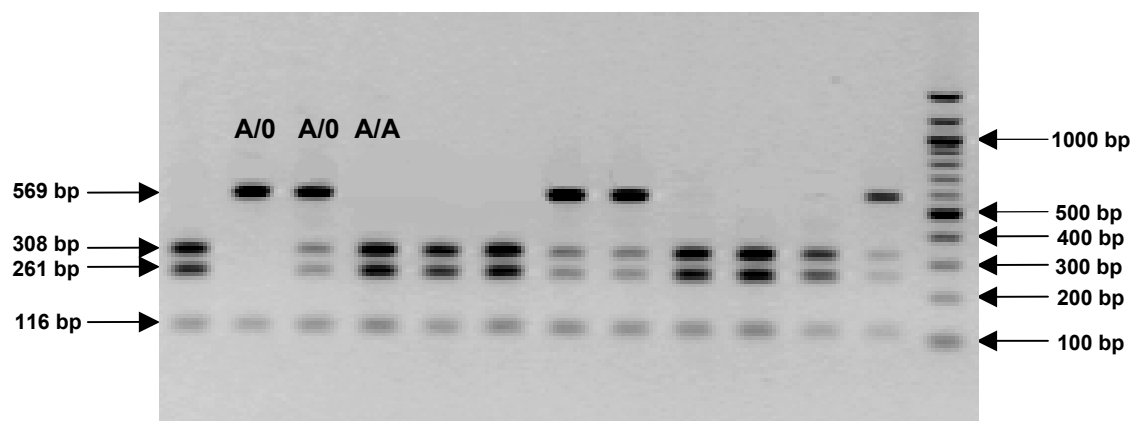
Das BC PCR Produkt ist 685 bp lang und trägt die Mutationsstellen 54 und 57. Das kleinere 125 bp PCR Produkt D amplifiziert die Mutation im Codon 52. Der Erfolg der PCR wurde auf einem 2%-gem Agarosegel verfolgt, die BC und D Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und aus der Agarose extrahiert.

Abb.30 repräsentiert beide PCR Produkte BC und D.

**Abb.30: Restriction fragment length polymorphism (RFLP)-Analyse der MBL-Allele mittels PCR.** Dargestellt sind zwei vom Exon 1 des MBL-Gens amplifizierte PCR-Produkte: BC (685 bp) und D (125 bp). Das BC PCR-Produkt trägt die für die MBL-Defizienz entscheidenden Aminosäuren in Positionen 52, 54 und 57. Das PCR-Produkt D amplifiziert das DNA-Fragment mit Mutationen in Position 52.

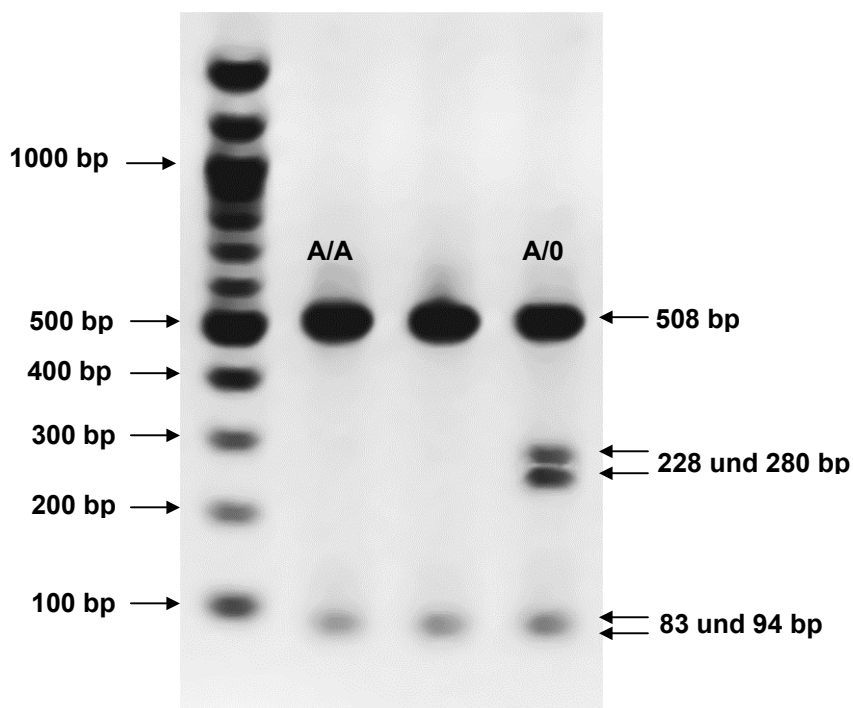


Um die MBL-Mutation im Codon 54 zu detektieren, wurde das BC PCR-Produkt (685 bp) zunächst mit der Restriktase *BanI* verdaut. Dabei ergaben sich je nach MBL-Allel unterschiedliche Restriktionsmuster. Bei WT oder Mutationen in den Codons 52 und 57 erscheinen drei Banden: 116, 261 und 308 bp. Bei einer Mutation im Codon 54 sind zwei Banden auf dem Agarosegel sichtbar: 116 und 569 bp. In der Abb. 31 sind unterschiedliche Restriktionsmuster gezeigt.



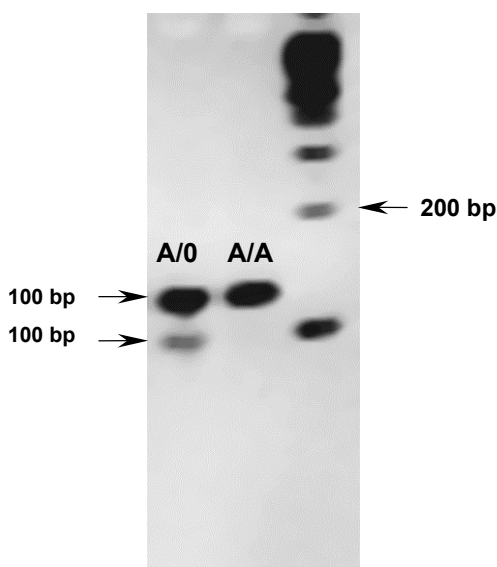
**Abb. 31: Restriction fragment length polymorphism (RFLP)-Analyse der MBL-Allele.** Dargestellt ist die Restriktionsverdau mit *BanI* des 685 bp PCR-Produktes BC vom Exon 1 des MBL-Gens. Für WT (A/A) und Mutationen in den Codons 52 und 54 erscheinen drei Banden: 116, 261 und 308 bp. Für die Mutationen (A/O) in Codon 54 sind zwei Banden 116 und 569 bp zu sehen.

Die Detektion der MBL-Mutation im Codon 57 erfolgt mit einem *MbolI*-Restriktionsverdau des BC Produktes. Für WT und Mutationen in den Codons 52 und 54 sind auf dem Agarosegel drei Banden detektierbar: 83, 94 und 508 bp. Für die Mutation im Codon 57 ergibt sich ein Muster aus vier Fragmenten: 83, 94, 228 und 280 bp. Abb. 32 stellt den Restriktionsverdau mit *MbolI* dar.



**Abb. 32: Restriction fragment length polymorphism (RFLP)-Analyse der MBL-Allele mittels PCR.** Dargestellt ist der Restriktionsverdau des BC PCR-Produkt mit *MbolI*. Die *MbolI*-Restriktion erlaubt eine Detektion der Mutation im Codon 57 des MBL-Gens: für WT (A/A) und Mutationen in den Codons 52 und 54 erscheinen drei Banden (83, 94 und 508 bp). Für die Mutation in Codon 57 vier Banden (83, 94, 228 und 280 bp).

Das kleine 125 bp PCR-Produkt D dient zum Nachweis einer Mutation im Codon 52. Nur das MBL-Allel mit der Mutation im Codon 52 kann von der Restriktase *MluI* enzymatisch verdaut werden. Dabei entstehen zwei Banden: 100 und 25 bp. Für WT und andere Mutationen bleibt das PCR-Produkt unverdaut (Abb. 33). Die Verdau sind auf einem 4%igen MetaPhor Agarosegel detektierbar.



**Abb. 33: RFLP-Analyse der MBL-Allele mittels PCR.** Um eine Mutation in Codon 52 des MBL-Gens zu detektieren, wurde das PCR-Produkt D (125 bp) mit der Restriktase *MluI* enzymatisch verdaut. Die Restriktase schneidet nur das Allel mit Mutation (A/O) im Codon 52 in zwei Fragmente von 100 und 25 bp, WT (A/A) und Mutationen in den Codons 54 und 57 bleiben ungeschnitten.

### 3.3.2 Statistische Auswertung von MBL-Defekten

Die zu MBL-Defekten führenden Mutationen in den Codons 52, 54 und 57 wurden als 0-Allel zusammengefasst. Die Patienten aus einzelnen Krankheits- und Kontrollgruppen wurden in solche mit homozygoten 0/0-Allelen und solche mit hetero- (A/0-Allel) oder homozygoten (A/A-Allel) WT-Allelen getrennt. Die Assoziation der Erkrankung SLE mit der MBL-Defizienz wurde mit Fisher's exact test berechnet.

Es lag keine signifikante Assoziation vor (Tab.14).

Allel	Kontrollen	SLE
A/A	48 (40 %)	164 (57,1 %)
A/0	60 (50 %)	103 (35,9 %)
0/0	12 (10 %)	20 (7,0 %)
Total	120	287

**Tabelle 14: Assoziation des MBL-Defizienz mit dem SLE bzw. gesunden Kontrollen.**

Anschließend wurde die MBL-Defizienz bei den SLE-Patienten mit den Parametern aus Tabelle 15 korreliert.

Klinische Parameter	Laborparameter
Thrombosen	ANA-Titer
Fehlgeburt	ANA-Muster
Sonnenallergie	dsDNA-Ak (RIA)
Aphthen	dsDNA-AK ELISA
Arthritis	dsDNA-AK Crithidia-IF
Muskelschmerz	C3
Krampfanfall	C4
Depression	CH50
Neuropathien	S-Kreatinin
Psychose	Proteinurie
Rippenfellentzündungen (Pleuritis)	Erythrozyturie



Herzklappenentzündungen	BKS in der 1. Stunde
Herzbeutelentzündungen	Hb
ständiges Augenbrennen	Leukozyten
Bindehautentzündungen	Lymphozyten
Ständige Mundtrockenheit	Thrombozyten
Diffuser Haarausfall	Rheumafaktor (pos/neg.)
Kreisrunder Haarausfall	Ak gegen Ro (SSA)
Weißwerden der Finger bei Kälte	Ak gegen La (SSB)
normale Schwangerschaft	Ak gegen U1-snRNP bzw. RNP
Lupusnephritis	Ak gegen Sm
Autoimmunthrombozytopenie	Ak gegen Jo 1
Cutane Vaskulitis	IgM-Ak gegen Cardiolipin-AK
Diskoides Erythem	IgG-Ak gegen Cardiolipin-AK
Schmetterlingserythem	IgA-Ak gegen alpha-Fodrin
Akrale Nekrosen	IgG-Ak gegen alpha-Fodrin
Lymphadenopathie	IgG-Ak gegen Prothrombin G
Splenomegalie (Länge >13cm)	IgG-Ak gegen Thrombin G
Hämolytische Anämie	IgA-Ak gegen $\beta$ 2 Glycoprotein-1
Lupoide Hepatitis	IgG-Ak gegen $\beta$ 2 Glycoprotein-1
Myositis	IgM-Ak gegen $\beta$ 2 Glycoprotein-1
Pneumonitis	
Lungenfibrose	

**Tabelle 15: Klinische und Laborparameter von SLE-Patienten.** Die MBL-Defizienz bei den SLE-Patienten wurde mit diesen Parametern korreliert.

Die Korrelation des MBL-Defektes bei SLE-Patienten mit oben genannten klinischen bzw. Laborparametern ergab keine Assoziation zwischen MBL-Allelen und SLE.

Lediglich der Parameter Rippenfellentzündungen (Pleuritis) hatte eine schwache Assoziation mit homozygoten 0-Allelen des MBL-Gens (Signifikanz  $p=0,022$ ). Diese Assoziation wurde aber nach Bonferroni-Korrektur für multiparametrische Analysen nicht mehr signifikant.

## 4 Diskussion

Genetische Faktoren spielen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des SLE, der Sklerodermie und weiterer Autoimmunerkrankungen. In mehreren Familienstudien wurden bereits Chromosomenregionen, auf denen Risikogene liegen, identifiziert. In einer Reihe von Studien wurden mögliche Kandidatengene untersucht. Die Identifizierung von Risikogenen ist aber durch die genetische Heterogenität der Autoimmunerkrankungen erschwert.

Die genomweite Genexpressionsanalyse mittels Mikroarrays ist eine neue Technologie, die die simultane Messung von Tausenden von mRNA-Transkripten in biologischen Proben erlaubt (52). Diese Methode wurde schon erfolgreich bei der Klassifizierung und Prognose von humanen malignen Tumoren, z.B. Lymphom, Leukämie, Brustkrebs, Darmkrebs und Prostata, und Identifizierung von Genen und gestörten Stoffwechselwegen im kranken Gewebe angewandt (53; 54). Die Hypothese, dass die Genexpressionsanalyse von SLE-Patienten neue Erkenntnisse über die Pathophysiologie der Erkrankung bringen kann, hat schon viele Forscher beschäftigt.

In dieser Arbeit sollte zunächst mit Hilfe von Affymetrix Mikroarrays nach Genen gesucht werden, die bei Patienten im SLE-Schub anders reguliert bzw. exprimiert werden als bei Patienten im Ruhestadium der Autoimmunerkrankung (SLE-Remission). Letztlich wurden im SLE-Schub 75 hochregulierte und 170 herunterregulierte Gene identifiziert. Zu den regulierten Genen zählten u.a.:

1. Zytokinrezeptoren.
2. Fcγ-Rezeptoren.
3. Moleküle der inflammatorischen Interleukin-1-Kaskade.
4. IFN-induzierte Gene.
5. Gene, die mit angeborener und erworbener Immunität im Zusammenhang stehen.
6. Gene, die die Aktivierung von NK- und T-Zellen steuern.

Zu 1. Eine mRNA-Überexpression im SLE-Schub wurde bei folgenden Zelloberflächenmarkern gefunden: TNFR6 (Fas/CD95), TNFR10. Von einem pathogenetischen Zusammenhang zwischen SLE und TNF-Rezeptoren haben

bereits einige Forschergruppen berichtet. Der *TNF-related* Apoptose-induzierende Ligand (TRAIL) ist mit einer Neutropenie bei SLE-Patienten assoziiert (55). Die murine Chromosomenregion 2, in der das TNF- $\alpha$ -Gen lokalisiert ist, wurde mit Hilfe des NZB/NZW F1 Mausmodell des SLE als SLE-Risikolokus definiert (56). Polymorphismen im TNF- $\alpha$ -Gen sind bei der Maus mit Proteinurie als Ausdruck für Glomerulonephritis assoziiert.

Zu 2. Zwei unterschiedliche Fc $\gamma$ -Rezeptoren waren bei SLE-Patienten im Schub überexprimiert: Fc $\gamma$ RIIA (CD32) und Fc $\gamma$ RI (CD64).

Auf dem humanen Chromosom 1q23 gibt es mindestens fünf Fc $\gamma$ R-Gene, die niedrig-affine Rezeptoren für IgG kodieren: IIA, IIB, IIC, IIIA und IIIB. Da beim SLE Gewebeschädigungen durch Immunkomplexe des IgG auftreten, kommen Polymorphismen aller Fc $\gamma$ -Rezeptor-Gene als wichtige Risikogene in Frage. Die Polymorphismen Fc $\gamma$ RIIIA-176F und Fc $\gamma$ RIIA-131R zeigen eine genetische Assoziation mit dem SLE (24; 57-59). Eine Arbeitsgruppe hat bei Japanern eine schwache Assoziation des Threonin-(T)-Allels des Fc $\gamma$ RIIB (60) und zwei weitere Studien mit Fc $\gamma$ RIIIB-NA2 bei Japanern und Spaniern gezeigt (60; 61). Andere Gruppen berichteten, dass sowohl Fc $\gamma$ RIIA als auch Fc $\gamma$ RIIIA Risikofaktoren des SLE sind (24). Der SLE ist danach mit dem Haplotyp assoziiert, der die Allele Fc $\gamma$ RIIA-131R und IIIA-176F trägt. Die Gene Fc $\gamma$ RIIA und Fc $\gamma$ RIIIA sind unterschiedlich in der Affinität zum IgG-Isotyp und im Expressionsmuster.

Die Polymorphismen in Genen Fc $\gamma$ RIIA und Fc $\gamma$ RIIIA sind mit der Clearance von Immunkomplexen assoziiert (62). Bei beeinträchtigter Clearance von Immunkomplexen lagern sich IgG-Immunkomplexe in kleinen Blutgefäßen ab.

Die weiblichen Fc-gamma-knockout-Mäuse des NZB/NZW F1 SLE-Mausmodells, bei denen die aktivierenden Fc-gamma-Rezeptoren (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIII und Fc $\epsilon$ R) mittels Deletion eines gemeinsamen Gens ausgeknockt sind, entwickeln trotz zirkulierender Immunkomplexe keine Glomerulonephritis (63). Der Fc $\gamma$ RII spielt eine wesentliche Rolle bei der Initiierung der Glomerulonephritis durch Immunkomplexe (64).

Zu 3. Drei Moleküle der inflammatorischen Interleukin-1-Kaskade wurden bei SLE-Patienten im Schub reguliert: IL-1 $\beta$ , IL-1-Rezeptor II (IL-1 RII) und der IL-

1-Rezeptor-Antagonist (IL1Ra). Der endogene IL-1-Rezeptor-Antagonist reguliert die Aktivität der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Der IL-1-Gencluster ist auf der Chromosomenregion 2q13-21 lokalisiert, die bereits als SLE-Risikolocus identifiziert wurde. Neulich wurde von der Assoziation von Polymorphismen sowohl im IL-1- als auch im IL-1-Rezeptor-Antagonist-Gen mit SLE und rheumatoider Arthritis berichtet, so dass diese Gene zu den Kandidatengenen von Autoimmunerkrankungen zählen (27; 54).

Zu 4. Einige bekannte IFN-induzierte Gene wurden beim SLE-Schub mittels Affymetrix-Analyse detektiert, z.B. STAT1, STAT3, myxovirus resistance 1 (Mx-1) und ISGF-3. Die Hypothese, dass Interferone bei der Pathogenese des SLE eine wichtige Rolle spielen, wurde schon von mehreren Forschungsgruppen postuliert. IFN- $\gamma$ -transgene Mäuse entwickeln ein „Lupus-ähnliches“ Krankheitsbild (65), und ein SLE-Mausmodell NZB/NZW F1 zeigt nach der Behandlung mit IFN-gamma-Antikörpern eine Besserung des Krankheitsverlaufs (66; 67). Kürzlich wurde ein IFN-induziertes Gen *Ifi202* auf dem Mauschromosom 1 identifiziert (68) und gezeigt, dass bei der Maus Interleukin-6 die Genexpression von *Ifi202* über STAT3-Aktivierung stimuliert (69). Zu der *Ifi202*-Genfamilie gehören beim Menschen IFI16 und AIM2 (70; 71), die wir ebenfalls nach Affymetrix-Analyse beim SLE-Schub als hochreguliert detektiert haben. Diese Gene sind beim Menschen auf dem Chromosom 1q lokalisiert, der als humane Risikoregion für SLE identifiziert wurde (58). Aus der Fachliteratur ist bekannt, dass einige SLE-Patienten erhöhte IFN- $\alpha$ -Konzentrationen im Serum (72; 73) haben, und dass eine signifikante Prozentzahl an Patienten mit viraler Hepatitis, die mit IFN- $\alpha$  behandelt wurden, ähnliche Autoantikörper wie SLE-Patienten entwickeln (73; 74). Ferner wurde berichtet, daß Interferon-induzierte Gene bei SLE-Patienten gehäuft exprimiert werden (75). Wir haben diese Ergebnisse mit unseren verglichen und ausgerechnet, dass von unseren 75 hochregulierten Genen mehr als die Hälfte IFN-induzierte Gene sind (n = 42). Von den herunterregulierten 170 Genen waren dagegen nur 7 IFN-induziert. Diese Ergebnisse sind mit der Hypothese in Einklang, dass der SLE eine virusinduzierte Erkrankung ist. So wurde gezeigt, dass SLE-Patienten die Erkrankung nicht ohne vorherige EBV-Infektion entwickeln und dass SLE-

Patienten eine EBV-spezifische Immunantwort haben, bei der eine IFN-induzierte T-Zell-Aktivierung stattfindet (76).

Ferner besteht eine Kreuzreaktivität SLE-typischer Autoantikörper (gegen Ro und Sm) mit EBNA-1 (*Epstein-Barr Virus nuclear antigen-1*) (77).

Zu 5. Insgesamt waren viele Gene, die für die angeborene und erworbene Immunität wichtig sind, beim SLE-Schub in ihren Affymetrix-Genexpressionsmustern verändert reguliert. Zu diesen zählt das mannanbindende Lektin (MBL), das daher genauer untersucht wurde.

Es gibt kontroverse Publikationen, ob eine Defizienz des MBL mit einer erhöhten Anfälligkeit für Autoimmunerkrankungen wie SLE und rheumatoide Arthritis assoziiert ist. Als ein Mitglied der Kollektin-Familie bindet MBL an Mannosereste und N-Acetyl-Glucosamine von Oligosacchariden, die auf der Zelloberfläche von Bakterien, Viren und Hefen vorhanden sind, und initiiert so den dritten Weg (Lektin-Weg) des Komplement-Systems. Eine Defizienz des MBL liegt bei ca. 5 % Bevölkerung vor (32; 33). Sie wird durch homozygote Mutationen in den Codons 52, 54 und 57 (genannt BC-, D- oder O-Allel) verursacht, die zu strukturellen Veränderungen in der Tripelhelix des MBL führen. Ferner existieren niedrig-produzierende Haplotypen im Promoterbereich des Lektins (MBL-550C/G und MBL-221G/C) (36; 37), die zu verminderten Serumkonzentrationen des MBL führen. Die MBL-Defizienz galt lange als harmlos, neuere Studien zeigten aber, dass dieser Immundefekt dann bedeutend wird, wenn weitere Abwehrmechanismen des Immunsystems gestört sind. So ist eine MBL-Defizienz mit Infektionen, insbesondere Meningitiden, bei Neugeborenen, die noch keine eigene Immunglobulinproduktion haben, assoziiert (Hibberd 1999). Patienten mit IgG-Mangel aufgrund eines variablen Immundefektes haben eine deutlich erhöhte Infektionsrate, wenn zusätzlich das mannanbindende Lektin fehlt (37). Bei der Erkrankung systemischer Lupus erythematoses wurde eine erhöhte Infektionsrate bei Patienten mit MBL-Defizienz beobachtet (38).

Unsere Analyse von 287 SLE-Patienten, verglichen mit 120 gesunden Kontrollen, sollte klären, inwieweit die Defizienz des MBL mit SLE oder mit Komplikationen des SLE assoziiert ist. Mit unseren Ergebnissen konnten wir die Aussagen von anderen Arbeitsgruppen (78-80) bestätigen, dass keine

Assoziation von homo- oder heterozygoten 0-Alleln von MBL mit SLE besteht. An dieser Stelle ist es wichtig zu erwähnen, dass der chromosomale Locus 10q11.2-q21, in dem das mannanbindende Lektin lokalisiert ist, in keiner genomweiten Analyse als Risikobereich des SLE identifiziert wurde (81-83).

Auch die Assoziation der MBL-Defizienz mit der koronaren Herzerkrankung (KHK) wird kontrovers beurteilt. In einer Studie war die MBL-Serumkonzentration überhaupt nicht mit der KHK assoziiert (84), während in anderen Studien 0-Allelen des MBL (85) bzw. MBL-Promoter assoziiert waren (86). In einer kürzlichen Studie, in der 91 dänische SLE-Patienten untersucht wurden, entwickelten 4/7 Patienten mit homozygoten MBL-Allelvarianten einen Myokardinfarkt (87). In unserer retrospektiven Studie an 287 deutschen SLE-Patienten kaukasischer Herkunft konnte aber keine Assoziation von arteriellen Thrombosen, Myokardinfarkt, Hirninfarkt oder Gefäßverschluss in den Beinen mit Allelen des MBL festgestellt werden. In unserer Studie werden die SLE-Patienten mittlerweile schon seit 4 Jahren im Verlauf untersucht, und es gab auch prospektiv keine Assoziation von MBL mit Infarkten. Unsere Patienten waren wesentlich älter als die aus der dänischen Studie. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Patienten mit homozygoten 0-Allelen des MBL im jüngeren Alter an arteriellen Thrombosen oder an Infektionen, den häufigsten letalen Komplikationen des SLE (88) sterben und in unserer Studie nicht berücksichtigt werden konnten.

Dennoch ist nach den Untersuchungen unwahrscheinlich, dass MBL ein Risikofaktor für Myokardinfarkt bei SLE-Patienten ist.

Zu 6. Zu den Genen, die die Aktivierung von T- und NK-Zellen regulieren, gehören die KIR, die die T-Zell-Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor modulieren und die Zytotoxizität von NK-Zellen regulieren. Einige KIR waren im SLE-Schub anhand der Affymetrix-Ergebnisse herunter reguliert.

Als Risikoregion des SLE wurde u.a. der Chromosomenlocus 19q13.4 identifiziert, in dem die KIR lokalisiert sind. Die KIR werden auf humanen NK- und T-Zellen exprimiert und enthalten die inhibitorischen ITIM- bzw. die aktivierenden ITAM-Sequenzen, die die Aktivierungssignale in Lymphozyten modulieren. Inhibitorische KIR mit einem langen intrazellulärem Teil (89) binden an MHC-Klasse-I-Moleküle (43; 44) und vermitteln über SH2-

enthaltende Tyrosin-Phosphatasen im ITIM eine Hemmung der T- bzw. NK-Zelle (90). Dagegen besitzen die kurzen, aktivierenden Isoformen dieser Rezeptoren eine positiv geladene Aminosäure in ihrer transmembranen Domäne (Arginin oder Lysin), über die sie mit einem DAP12-Protein interagieren. Dieses Protein enthält ITAMs, die über die Protein-Tyrosin-Kinasen Syk und ZAP70 eine Aktivierung der Zelle ähnlich wie bei der Aktivierungskaskade von T- und B-Zellrezeptoren einleiten (91). KIR besitzen eine sehr hohe Spezifität für ihre Liganden. Die Expression dieser Rezeptoren ist genetisch determiniert. Aus früheren Familienstudien sind ca. 50 unterschiedlichen KIR-Kombinationen bekannt (48). So hat jeder Mensch eine eigene Kombination aus unterschiedlichen Anteilen an aktivierenden oder inhibitorischen KIR. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde gezeigt, dass SLE- und Sklerodermie-Patienten eigene KIR-Phänotypen besitzen.

Es wurden zwölf neue KIR-Phänotypen beim SLE identifiziert, die in der Fachliteratur noch nicht beschrieben wurden. Unsere Studie zeigt, dass die neuen KIR-Phänotypen mit dem SLE assoziiert sind. Sie sind durch die Häufung von aktivierenden KIR charakterisiert: KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3 und KIR3DS1. Im Gegensatz dazu waren die inhibitorischen KIR (KIR2DL1, KIR2DL3 und KIR3DL1) in den neuen Phänotypen bei SLE-Patienten seltener vertreten. Möglicherweise sind seltene Polymorphismen in KIR-Genen mit von uns definierten KIR-Phänotypen mit dem SLE assoziiert. Alternativ können auch KIR-Haplotypen mit dem SLE assoziiert sein, zu denen auch putative Risikogene außerhalb der KIR-Region auf dem Chromosom 19q13.4 zählen können. Potenzielle Kandidatengene sind in der den KIR benachbarten ILT-Region (*Immunoglobulin-Like Transcript*) lokalisiert. Diese Gene werden von den meisten Zellen des Immunsystems exprimiert. Sie binden an die MHC-Klasse-I-Moleküle und sind in der Lage, ähnlich wie KIR, T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor zu aktivieren.

Eine Assoziation der KIR mit anderen Autoimmunerkrankungen wurde schon in der Fachliteratur diskutiert: so ist der aktivierende Rezeptor KIR2DS2 mit Vaskulitis bei Patienten mit rheumatoider Arthritis assoziiert (49). Eine andere Arbeitsgruppe berichtete über eine Assoziation der Arthritis psoriatica mit Vorhandensein von KIR2DS2 und KIR2DL2, wenn der Ligand des KIR2DL2, das HLA-C-Molekül mit Asparagin in Position 80, fehlt (92). In der vorliegenden

Arbeit konnte eine Assoziation der KIR-Kombination KIR2DS2+KIR2DL2- mit Sklerodermie festgestellt werden.

Die Interaktion zwischen KIR2DL2, das auf NK-Zellen und aktivierten CD4+ und CD8+ T-Zellen exprimiert wird, und dem HLA-C-Molekül kann die Aktivierung von T-Zellen blockieren und eine Zellyse durch NK-Zellen einleiten. Der Ligand des KIR2DS2, das extrazellulär beinahe identisch mit KIR2DL2 und KIR2DL3 ist, bleibt noch unbekannt. Saulquin et. al. konnte mit Hilfe von HLA-Cw3-Tetrameren beweisen, dass sie nur an KIR2DL2 und nicht an KIR2DS2 binden (93). Wahrscheinlich binden aktivierende KIR an den selben Liganden wie inhibitorische KIR, nur mit niedrigerer Affinität. Im Gegensatz dazu zeigte die Aktivierung von NK-Zellen mit monoklonalen Antikörper gegen KIR2DS2, KIR2DL2 und KIR2DL3, dass eine niedrige Antikörper-Konzentration bevorzugt aktivierende Rezeptoren stimuliert, während eine hohe Konzentration beide Rezeptortypen der KIR aktiviert (94). So scheint der inhibitorische Rezeptor eine höhere Affinität zum Antikörper und gleichzeitig aber auch eine höhere Aktivierungsschwelle zu haben. Aus diesem Grund stellen KIR2DS2 und KIR2DL2/KIR2DL3 Antagonisten bei der Feinabstimmung der Aktivierungsschwelle von NK- und T-Zellen dar. Die physiologische Bedeutung von KIR besteht in der Überwachung von Tumoren und in der Virusabwehr. So beeinflusst das KIR-Repertoire die Prognose der HIV-Infektion (92). Es ist vorstellbar, dass KIR eine Rolle bei der Immunantwort gegen putative virale Infektionen spielen, die potentiell SLE bzw. Sklerodermie auslösen können.

In dieser Arbeit war aber nicht nur KIR2DS2 allein, sondern die Kombination KIR2DS2+/KIR2DL2- mit Sklerodermie assoziiert. Es ist noch nicht klar, welchen funktionellen Einfluss das haben könnte, da KIR2DL3 das gleiche MHC-Molekül wie KIR2DL2 zu binden scheint. KIR2DL3 war mit einer Ausnahme bei allen Sklerodermie-Patienten mit der Kombination KIR2DS2+/KIR2DL2- vorhanden.

Um die Beteiligung von KIR2DS2 und KIR2DL2 in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen zu beurteilen, wurden in der Fachliteratur zwei Beispiele klar definiert, und zwar:

- 1). Die Assoziation des KIR2DS2 allein mit Vaskulitis bei den Patienten mit rheumatoider Arthritis, und



2). Die Assoziation des KIR2DS2 bei Fehlen des Liganden für KIR2DL2 bei Patienten mit Arthritis psoriatica.

Wir haben einen dritten Weg beschrieben, in dem der KIR2DS2 in Abwesenheit des KIR2DL2 in der Pathogenese der Sklerodermie involviert ist. Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Assoziation des KIR2DS3 mit der Sklerodermie besteht. Das Molekül KIR2DS3 ist strukturell und funktionell dem KIR2DS2 ähnlich. Diese schwache Assoziation war aber nach Bonferroni's Korrektur für multiparametrische Analysen nicht mehr signifikant.

Die Möglichkeit, dass andere Gene als KIR2DS2 und KIR2DS3, die mit diesen gekoppelt vererbt werden, mit der Sklerodermie assoziiert sind, kann nicht ausgeschlossen werden. Allerdings konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass zumindest Polymorphismen des ILT-2, einem den KIR benachbartem Rezeptor, nicht mit der Sklerodermie assoziiert sind.

Die Prävalenz der Kombination KIR2DS2+/KIR2DL2- war bei den gesunden Kontrollen mit der Prävalenz in einer Kontrollgruppe in einer australischen Studie vergleichbar (41). Die ersten KIR-Haplotypen wurden von Hsu et. al. beschrieben (95). Aber keiner dieser Haplotypen trug die Kombination KIR2DS2+/KIR2DL2-. Dagegen war die Prävalenz der Kombination KIR2DS2+/KIR2DL2- in einer irischen Studie anders als unsere (42). Es sind weitere Studien von Sklerodermie-Patienten aus unterschiedlichen ethnischen Gruppen erforderlich, um die Assoziation von KIR2DS2+/KIR2DL2- mit der Sklerodermie vollständig zu klären. Dennoch scheint die Anwesenheit vom aktivierenden KIR2DS2 und seinen Liganden zur Zeit mit einer Reihe von Autoimmunerkrankungen wie z.B. Sklerodermie assoziiert zu sein, und somit in Zukunft zu einer Zielstruktur für neue Therapiemöglichkeiten zu werden.

## **5 Ausblick**

Die Risikogene des SLE sind im Einzelnen noch unbekannt. Auf der Basis der Ergebnisse der Affymetrix-Genchipanalyse und von früheren genomweiten Untersuchungen konnten die Gene weiter eingegrenzt werden.

In dieser Arbeit wurde insbesondere der Locus 19q13.4 mit den KIR als Risikoregion von SLE und Sklerodermie charakterisiert. Zur Identifikation des Risikogens in dieser Region sind jetzt Assoziationsstudien von Polymorphismen bzw. Allelen und Haplotypen im Locus 19q13.4 mit Autoimmunerkrankungen nötig.

Die genaue Kenntnis der Risikogene könnte in Zukunft zur Verbesserung der Diagnostik, Vorhersage des Erkrankungsrisikos und zu neuen Therapiemöglichkeiten, z.B. Gentherapien, führen.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-converting enzyme
C1q, C2, C3, C4	Komplement Komponenten
CD	Differenzierungscluster
CMV	Zytomegalievirus
DNA	Desoxyribonuclein acid
DNase2	Desoxyribonuklease 2
DNTP	Desoxyribonukleosintriphosphat
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter
FCGR	Fcγ-Rezeptor
Fig1	Interleukin-four induced gene-1
HLA	Human Leukocyte Antigen
hu	human
IC	Immune complexes
IDDM	Insulinabhängige Diabetes mellitus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILT	Immunglobulin-like transcript
ITIMs	Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs
ITAMs	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs
KIR	Killer cell immunglobulin-like receptor
MBL	Mannan-bindendes Lectin
MAPK	Ras-mitogen-activated protein kinase
MASP	MBL-assoziierte Serinprotease
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MS	Multiple Sklerose
NK	Natürliche Killerzellen

NOS1	Nitric oxide synthase 1
n.s.	nicht signifikant
NZB	New Zealand Black mice
NZW	New Zealand White mice
NZM	New Zealand mixed mice
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDCD1	Programmed cell death 1
RNA	Ribonuclein acid
RNP	Ribonukleoproteinpartikel
snRNP	small nuclear RNP
hnRNP	heterogeneous nuclear RNP
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SLEB	SLE susceptibility locus in humans
SNP	Single nucleotide polymorphism
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCF1	Transcription factor 1
TCR	T-Zellrezeptor
WT	Wildtyp

## 7 Literatur

- (1) Hochberg MC. Systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 1990; 16(3):617-639.
- (2) Mills JA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 1994; 330(26):1871-1879.
- (3) Reeves HW. Clinical presentation of systemic lupus erythematosus in the adult. In: Lahita R.G. *Systemic Lupus erythematosus*. New York: Wiley Medical Publication, 1987: 355-382.
- (4) Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25(11):1271-1277.
- (5) Golan TD, Elkon KB, Gharavi AE, Krueger JG. Enhanced membrane binding of autoantibodies to cultured keratinocytes of systemic lupus erythematosus patients after ultraviolet B/ultraviolet A irradiation. *J Clin Invest* 1992; 90(3):1067-1076.
- (6) Schur PH. Clinical features of SLE. In: Kelley WN, *Textbook of Rheumatology*. Philadelphia: Saunders, 1989: 1101-1129.
- (7) Medstrand P, Lindeskog M, Blomberg J. Expression of human endogenous retroviral sequences in peripheral blood mononuclear cells of healthy individuals. *J Gen Virol* 1992; 73 ( Pt 9):2463-2466.
- (8) Christian CL. Etiologic hypotheses for systemic lupus erythematosus. In: Lahita H.G. *Systemic Lupus erythematosus*. New York: Wiley Medical Publications, 1987: 65-79.
- (9) Krapf EF, Leitmann M, Hermann M, Kalden JR. Detection of HIV-homologous DNA and RNA in systemic lupus erythematosus. In: Bautz FA. *Bericht der*

- 
- Heidelberger Akademie der Wissenschaften. Heidelberg-New York: Springer, 1989: 114.
- (10) Blomberg J, Nived O, Pipkorn R, Bengtsson A, Erlinge D, Sturfelt G. Increased antiretroviral antibody reactivity in sera from a defined population of patients with systemic lupus erythematosus. Correlation with autoantibodies and clinical manifestations. *Arthritis Rheum* 1994; 37(1):57-66.
- (11) von Wussow P, Jakschies D, Hochkeppel H, Horisberger M, Hartung K, Deicher H. MX homologous protein in mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1989; 32(7):914-918.
- (12) James JA, Kaufman KM, Farris AD, Taylor-Albert E, Lehman TJ, Harley JB. An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1997; 100(12):3019-3026.
- (13) Vaughan JH, Shaw PX, Nguyen MD, Medsger TA, Jr., Wright TM, Metcalf JS et al. Evidence of activation of 2 herpesviruses, Epstein-Barr virus and cytomegalovirus, in systemic sclerosis and normal skins. *J Rheumatol* 2000; 27(3):821-823.
- (14) Neidhart M, Kuchen S, Distler O, Bruhlmann P, Michel BA, Gay RE et al. Increased serum levels of antibodies against human cytomegalovirus and prevalence of autoantibodies in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1999; 42(2):389-392.
- (15) Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. Genetic susceptibility to rheumatoid arthritis and human leukocyte antigen class II polymorphism. The role of shared conformational determinants. *Am J Med* 1988; 85(6A):17-19.
- (16) Lawrence JS, Martins CL, Drake GL. A family survey of lupus erythematosus. 1. Heritability. *J Rheumatol* 1987; 14(5):913-921.

- 
- (17) Block SR, Winfield JB, Lockshin MD, D'Angelo WA, Weksler ME, Fotino M et al. Proceedings: Twin studies in systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum* 1975; 18(3):285.
- (18) Hartung K, Baur MP, Coldewey R, Fricke M, Kalden JR, Lakomek HJ et al. Major histocompatibility complex haplotypes and complement C4 alleles in systemic lupus erythematosus. Results of a multicenter study. *J Clin Invest* 1992; 90(4):1346-1351.
- (19) Schur PH. Genetics of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1995; 4(6):425-437.
- (20) Davies EJ, Steers G, Ollier WE, Grennan DM, Cooper RG, Hay EM et al. Relative contributions of HLA-DQA and complement C4A loci in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1995; 34(3):221-225.
- (21) Trappeiner G. Complement and complement deficiencies. In: Smolen JS, Zielinsky C.C. *Systemic Lupus erythematosus*. Berlin-Heidelberg: Springer, 1987: 124-144.
- (22) Salmon JE, Pricop L. Human receptors for immunoglobulin G: key elements in the pathogenesis of rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 2001; 44(4):739-750.
- (23) Zuniga R, Markowitz GS, Arkachaisri T, Imperatore EA, D'Agati VD, Salmon JE. Identification of IgG subclasses and C-reactive protein in lupus nephritis: the relationship between the composition of immune deposits and FCgamma receptor type IIA alleles. *Arthritis Rheum* 2003; 48(2):460-470.
- (24) Magnusson V, Johanneson B, Lima G, Odeberg J, Alarcon-Segovia D, Alarcon-Riquelme ME. Both risk alleles for FcgammaRIIA and FcgammaRIIA are susceptibility factors for SLE: a unifying hypothesis. *Genes Immun* 2004; 5(2):130-137.

- 
- (25) Nishimura H, Honjo T. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol* 2001; 22(5):265-268.
- (26) Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999; 11(2):141-151.
- (27) Prokunina L, Castillejo-Lopez C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* 2002; 32(4):666-669.
- (28) Turner MW. Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease. *Immunobiology* 1998; 199(2):327-339.
- (29) Jack DL, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol Rev* 2001; 180:86-99.
- (30) Tenner AJ, Robinson SL, Ezekowitz RA. Mannose binding protein (MBP) enhances mononuclear phagocyte function via a receptor that contains the 126,000 M(r) component of the C1q receptor. *Immunity* 1995; 3(4):485-493.
- (31) Turner MW. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today* 1996; 17(11):532-540.
- (32) Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Thiel S et al. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics* 1994; 40(1):37-44.
- (33) Babovic-Vuksanovic D, Snow K, Ten RM. Mannose-binding lectin (MBL) deficiency. Variant alleles in a midwestern population of the United States. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 82(2):134-8, 141.
- (34) Sumiya M, Super M, Tabona P, Levinsky RJ, Arai T, Turner MW et al. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet* 1991; 337(8757):1569-1570.



- (35) Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AV, Lau YL, Levinsky RJ, Summerfield JA et al. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Genet* 1992; 1(9):709-715.
- (36) Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol* 1995; 155(6):3013-3020.
- (37) Mullighan CG, Marshall SE, Welsh KI. Mannose binding lectin polymorphisms are associated with early age of disease onset and autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Scand J Immunol* 2000; 51(2):111-122.
- (38) Garred P, Madsen HO, Halberg P, Petersen J, Kronborg G, Svejgaard A et al. Mannose-binding lectin polymorphisms and susceptibility to infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999; 42(10):2145-2152.
- (39) Namjou B, Nath SK, Kilpatrick J, Kelly JA, Reid J, Reichlin M et al. Genome scan stratified by the presence of anti-double-stranded DNA (dsDNA) autoantibody in pedigrees multiplex for systemic lupus erythematosus (SLE) establishes linkages at 19p13.2 (SLED1) and 18q21.1 (SLED2). *Genes Immun* 2002; 3 Suppl 1:S35-S41.
- (40) Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, Tsukamoto H, Hashimura C, Urushihara M et al. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2001; 28(4):313-314.
- (41) Witt CS, Dewing C, Sayer DC, Uhrberg M, Parham P, Christiansen FT. Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination. *Transplantation* 1999; 68(11):1784-1789.
- (42) Crum KA, Logue SE, Curran MD, Middleton D. Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertoires. *Tissue Antigens* 2000; 56(4):313-326.

- 
- (43) Peruzzi M, Wagtmann N, Long EO. A p70 killer cell inhibitory receptor specific for several HLA-B allotypes discriminates among peptides bound to HLA-B\*2705. *J Exp Med* 1996; 184(4):1585-1590.
- (44) Moretta A, Vitale M, Bottino C, Orengo AM, Morelli L, Augugliaro R et al. P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med* 1993; 178(2):597-604.
- (45) Cambiaggi A, Darche S, Guia S, Kourilsky P, Abastado JP, Vivier E. Modulation of T-cell functions in KIR2DL3 (CD158b) transgenic mice. *Blood* 1999; 94(7):2396-2402.
- (46) Huard B, Karlsson L. KIR expression on self-reactive CD8+ T cells is controlled by T-cell receptor engagement. *Nature* 2000; 403(6767):325-328.
- (47) Carena I, Shamshiev A, Donda A, Colonna M, Libero GD. Major histocompatibility complex class I molecules modulate activation threshold and early signaling of T cell antigen receptor-gamma/delta stimulated by nonpeptidic ligands. *J Exp Med* 1997; 186(10):1769-1774.
- (48) Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 1997; 7(6):753-763.
- (49) Yen JH, Moore BE, Nakajima T, Scholl D, Schaid DJ, Weyand CM et al. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 2001; 193(10):1159-1167.
- (50) Martin MP, Nelson G, Lee JH, Pellett F, Gao X, Wade J et al. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J Immunol* 2002; 169(6):2818-2822.

- 
- (51) Koop BF, Rowan L, Chen WQ, Deshpande P, Lee H, Hood L. Sequence length and error analysis of Sequenase and automated Taq cycle sequencing methods. *Biotechniques* 1993; 14(3):442-447.
- (52) Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* 1999; 21(1 Suppl):33-37.
- (53) Staudt LM. Gene expression profiling of lymphoid malignancies. *Annu Rev Med* 2002; 53:303-318.
- (54) Ramaswamy S, Golub TR. DNA microarrays in clinical oncology. *J Clin Oncol* 2002; 20(7):1932-1941.
- (55) Matsuyama W, Yamamoto M, Higashimoto I, Oonakahara K, Watanabe M, Machida K et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand is involved in neutropenia of systemic lupus erythematosus. *Blood* 2004; 104(1):184-191.
- (56) Rahman ZS, Tin SK, Buenaventura PN, Ho CH, Yap EP, Yong RY et al. A novel susceptibility locus on chromosome 2 in the (New Zealand Black x New Zealand White)F1 hybrid mouse model of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2002; 168(6):3042-3049.
- (57) Harley JB, Moser KL, Gaffney PM, Behrens TW. The genetics of human systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol* 1998; 10(6):690-696.
- (58) Wakeland EK, Liu K, Graham RR, Behrens TW. Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity* 2001; 15(3):397-408.
- (59) Vyse TJ, Kotzin BL. Genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol* 1996; 8(6):843-851.
- (60) Kyogoku C, Dijstelbloem HM, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A et al. Fcγ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: contribution of FCGR2B to genetic susceptibility. *Arthritis Rheum* 2002; 46(5):1242-1254.

- 
- (61) Gonzalez-Escribano MF, Aguilar F, Sanchez-Roman J, Nunez-Roldan A. FcgammaRIIA, FcgammaRIIIA and FcgammaRIIIB polymorphisms in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunogenet* 2002; 29(4):301-306.
- (62) Miescher S, Spycher MO, Amstutz H, De Haas M, Kleijer M, Kalus UJ et al. A single recombinant anti-RhD IgG prevents RhD immunization: association of RhD-positive red blood cell clearance rate with polymorphisms in the FcgammaRIIA and FcgammaRIIIA genes. *Blood* 2004; 103(11):4028-4035.
- (63) Clynes R, Ravetch JV. Cytotoxic antibodies trigger inflammation through Fc receptors. *Immunity* 1995; 3(1):21-26.
- (64) Radeke HH, Janssen-Graalfs I, Sowa EN, Chouchakova N, Skokowa J, Loscher F et al. Opposite regulation of type II and III receptors for immunoglobulin G in mouse glomerular mesangial cells and in the induction of anti-glomerular basement membrane (GBM) nephritis. *J Biol Chem* 2002; 277(30):27535-27544.
- (65) Seery JP, Carroll JM, Cattell V, Watt FM. Antinuclear autoantibodies and lupus nephritis in transgenic mice expressing interferon gamma in the epidermis. *J Exp Med* 1997; 186(9):1451-1459.
- (66) Balomenos D, Rumold R, Theofilopoulos AN. Interferon-gamma is required for lupus-like disease and lymphoaccumulation in MRL-lpr mice. *J Clin Invest* 1998; 101(2):364-371.
- (67) Jacob CO, van der Meide PH, McDevitt HO. In vivo treatment of (NZB X NZW)F1 lupus-like nephritis with monoclonal antibody to gamma interferon. *J Exp Med* 1987; 166(3):798-803.
- (68) Rozzo SJ, Allard JD, Choubey D, Vyse TJ, Izui S, Peltz G et al. Evidence for an interferon-inducible gene, *Ifi202*, in the susceptibility to systemic lupus. *Immunity* 2001; 15(3):435-443.

- (69) Pramanik R, Jorgensen TN, Xin H, Kotzin BL, Choubey D. Interleukin-6 induces expression of Ifi202, an interferon-inducible candidate gene for lupus susceptibility. *J Biol Chem* 2004; 279(16):16121-16127.
- (70) Johnstone RW, Trapani JA. Transcription and growth regulatory functions of the HIN-200 family of proteins. *Mol Cell Biol* 1999; 19(9):5833-5838.
- (71) Choubey D, Lengyel P. Binding of an interferon-inducible protein (p202) to the retinoblastoma protein. *J Biol Chem* 1995; 270(11):6134-6140.
- (72) Wussow PV, Jakschies D, Freund M, Hehlmann R, Brockhaus F, Hochkeppel H et al. Treatment of anti-recombinant interferon-alpha 2 antibody positive CML patients with natural interferon-alpha. *Br J Haematol* 1991; 78(2):210-216.
- (73) Ronnblom L, Alm GV. A pivotal role for the natural interferon alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in the pathogenesis of lupus. *J Exp Med* 2001; 194(12):F59-F63.
- (74) Fukuyama S, Kajiwara E, Suzuki N, Miyazaki N, Sadoshima S, Onoyama K. Systemic lupus erythematosus after alpha-interferon therapy for chronic hepatitis C: a case report and review of the literature. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(1):310-312.
- (75) Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(5):2610-2615.
- (76) Kang I, Hong MS, Nolasco H, Park SH, Dan JM, Choi JY et al. Age-associated change in the frequency of memory CD4+ T cells impairs long term CD4+ T cell responses to influenza vaccine. *J Immunol* 2004; 173(1):673-681.
- (77) McClain MT, Rapp EC, Harley JB, James JA. Infectious mononucleosis patients temporarily recognize a unique, cross-reactive epitope of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *J Med Virol* 2003; 70(2):253-257.

- (78) Sullivan KE, Jawad AF, Piliro LM, Kim N, Luan X, Goldman D et al. Analysis of polymorphisms affecting immune complex handling in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42(3):446-452.
- (79) Garcia-Laorden MI, Rúa-Figueroa I, Perez-Aciego P, Rodriguez-Perez JC, Citores MJ, Alamo F et al. Mannose binding lectin polymorphisms as a disease-modulating factor in women with systemic lupus erythematosus from Canary Islands, Spain. *J Rheumatol* 2003; 30(4):740-746.
- (80) Horiuchi T, Tsukamoto H, Morita C, Sawabe T, Harashima S, Nakashima H et al. Mannose binding lectin (MBL) gene mutation is not a risk factor for systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA) in Japanese. *Genes Immun* 2000; 1(7):464-466.
- (81) Gaffney PM, Kearns GM, Shark KB, Ortmann WA, Selby SA, Malmgren ML et al. A genome-wide search for susceptibility genes in human systemic lupus erythematosus sib-pair families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(25):14875-14879.
- (82) Moser KL, Neas BR, Salmon JE, Yu H, Gray-McGuire C, Asundi N et al. Genome scan of human systemic lupus erythematosus: evidence for linkage on chromosome 1q in African-American pedigrees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(25):14869-14874.
- (83) Johanneson B, Steinsson K, Lindqvist AK, Kristjansdottir H, Grondal G, Sandino S et al. A comparison of genome-scans performed in multicase families with systemic lupus erythematosus from different population groups. *J Autoimmun* 1999; 13(1):137-141.
- (84) Albert MA, Rifai N, Ridker PM. Plasma levels of cystatin-C and mannose binding protein are not associated with risk of developing systemic atherosclerosis. *Vasc Med* 2001; 6(3):145-149.
- (85) Rugonfalvi-Kiss S, Endresz V, Madsen HO, Burian K, Duba J, Prohaszka Z et al. Association of *Chlamydia pneumoniae* with coronary artery disease and its

progression is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin. *Circulation* 2002; 106(9):1071-1076.

- (86) Best LG, Davidson M, North KE, MacCluer JW, Zhang Y, Lee ET et al. Prospective analysis of mannose-binding lectin genotypes and coronary artery disease in American Indians: the Strong Heart Study. *Circulation* 2004; 109(4):471-475.
- (87) Ohlenschlaeger T, Garred P, Madsen HO, Jacobsen S. Mannose-binding lectin variant alleles and the risk of arterial thrombosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2004; 351(3):260-267.
- (88) Manger K, Manger B, Repp R, Geisselbrecht M, Geiger A, Pfahlberg A et al. Definition of risk factors for death, end stage renal disease, and thromboembolic events in a monocentric cohort of 338 patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2002; 61(12):1065-1070.
- (89) Olcese L, Lang P, Vely F, Cambiaggi A, Marguet D, Blery M et al. Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases. *J Immunol* 1996; 156(12):4531-4534.
- (90) Renard V, Cambiaggi A, Vely F, Blery M, Olcese L, Olivero S et al. Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells: a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes. *Immunol Rev* 1997; 155:205-221.
- (91) Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 1998; 391(6668):703-707.
- (92) Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 2002; 31(4):429-434.

- (93) Saulquin X, Gastinel LN, Vivier E. Crystal structure of the human natural killer cell activating receptor KIR2DS2 (CD158j). *J Exp Med* 2003; 197(7):933-938.
- (94) Warren HS, Campbell AJ, Waldron JC, Lanier LL. Biphasic response of NK cells expressing both activating and inhibitory killer Ig-like receptors. *Int Immunol* 2001; 13(8):1043-1052.
- (95) Hsu KC, Liu XR, Selvakumar A, Mickelson E, O'Reilly RJ, Dupont B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol* 2002; 169(9):5118-5129.



## **8 Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name:	Tanja Momot
Geburtsdatum:	06. Dezember 1970
Geburtsort:	Kosch-Tegirmen, Kirgisistan
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	geschieden, eine Tochter (12)
Privatadresse:	Bomhauer Str. 18 30625 Hannover Tel.: (+49) 511 5510455
Fremdsprachen:	Englisch, Russisch, Spanisch

### **Schulausbildung**

09/1978-06/1988	Schule Nr.7, Kara-Balta, Kirgisistan
06/1988	Schulabschluss mit Auszeichnung, Abitur UdSSR

### **Hochschulausbildung**

07/1988-06/1991	Studium der Technischen Chemie, Mendeleev Universität der chemischen Technologie (Russland, Moskau), 6 Semester. Abbruch wegen Ausreise in die Bundesrepublik Deutschland
07/1991	Einreise in die Bundesrepublik Deutschland als Spätaussiedlerin
11/1991-01/1992	Integraionssprachkurs beim Arbeitsamt Gifhorn
02/1992-10/1992	Erziehungsurlaub
11/1992-06/1993	Stipendiatin der Otto Benecke Stiftung,

	Intensivsprachkurs
04/1993	Anerkennung der allg. Hochschulreife (Abschlussnote 1,3)
10/1993	Immatrikulation im Studiengang Biochemie, Universität Hannover
04/1996	mündliche Diplom-Vorprüfung
07/1999	mündliche Diplomprüfung
08/1999-02/2000	Diplomarbeit im Arbeitskreis Prof. Dr. B. Otto unter Betreuung von Dr. T. Meyer. Thema: "Konstruktion und Reinigung einer Variante des humanen Interferon-beta" (Abschlussnote 2,0)

### **Promotion**

seit 01.05.2000	Doktorarbeit in der Abteilung der Klinischen Immunologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter Prof. Dr. med. R.E. Schmidt in der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Torsten Witte. Thema: „Genetische Risikofaktoren des Systemischen Lupus Erythematodes“
-----------------	--

### **Publikationen**

R. Schwinzer, T. Witte, J. Hundrieser, S. Ehlers, T. Momot, N. Hunzelmann, T. Krieg, R.E. Schmidt, K. Wonigeit. 2003. Enhanced frequency of a PTPRC (CD45) exon A mutation (77C-->G) in systemic sclerosis. Genes Immun. 4(2):168-9.

T. Momot, S. Koch, N. Hunzellmann, T. Krieg, R.E. Schmidt, T. Witte. 2004. Association of Killer Immunglobulin-like Receptors with Scleroderma. *Arthritis Rheum.* 50(5): 1561-5.

T. Momot, K. Ahmadi-Simab, A. Gause, W.L. Gross, E. Gromnica-Ihle, H.H. Peter, K. Manger, H. Zeidler, R.E. Schmidt, T. Witte. 2004. Lack of association of mannose-binding lectin variant alleles with systemic lupus erythematosus. Eingereicht.

T. Momot, T. Kirsch, R.E. Schmidt, T. Witte. 2004. Regulation of Killer Cell Immunglobulin (Ig)-like Receptors (KIR) in SLE Flares. Manuskript in Vorbereitung.

S. Koch, R. Goedde, V. Nigmatova, J. T. Epplen, N. Müller, J. de Seze, P. Vermersch, T. Momot, R. E. Schmidt, T. Witte. 2004. Association of multiple sclerosis with ILT6 deficiency. In press.

### **Tagungsbeiträge**

- |               |  |
|---------------|--|
| Oktober 2000  | 28. Jahrestagung der Arbeitskreises Klinische Immunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie in Frankfurt/M.<br>T. Momot, R.E. Schmidt, T. Witte:<br>„MBL-Deficiency in SLE“.                        |
| November 2003 | 31. Jahrestagung der Arbeitskreises Klinische Immunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie in Frankfurt/M.<br>T. Momot, R.E. Schmidt, T. Witte:<br>“KIR Expression in connective tissue diseases”. |

- Mai 2004                      7. International Congress SLE and Related Conditions "Lupus 2004" in New York, USA  
T. Momot, T. Kirsch, R.E. Schmidt, T. Witte:  
"Regulation of Killer Cell Immunglobulin (Ig)-Like Receptors (KIR) in SLE Flares".
- Juni 2004                      Annual European Congress of Rheumatology "EULAR 2004" in Berlin, Deutschland.  
T. Momot, T. Kirsch, R.E. Schmidt, T. Witte:  
„Expression and Regulation of Killer Cell Immunglobulin (Ig)-Like Receptors (KIR) in SLE and Scleroderma”.  
Reisestipendium vom "EULAR 2004".
- Oktober 2004                Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies for Immunology (JAMI) in Maastricht, Hoolland.  
T. Momot, T. Kirsch, R.E. Schmidt, T. Witte:  
„Killer Cell Immunglobulin (Ig)-Like Receptors (KIR) in SLE and Scleroderma".
- November 2004              4<sup>th</sup> International Congress on Autoimmunity in Budapest, Ungarn.  
T. Momot, T. Kirsch, R.E. Schmidt, T. Witte:  
„Characterisation of Expression and Regulation of Killer Cell Immunglobulin (Ig)-Like Receptors (KIR) in SLE and Scleroderma”.  
Reisestipendium von der deutschen Gesellschaft für Immunologie.

## **9 Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Reinhold E. Schmidt, dem Institutsleiter, für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können und seine immerwährende Unterstützung bei der Teilnahme an mehreren wissenschaftlichen Kongressen und seiner fairen Kritik bei den Vorträgen.

Herrn PD Dr. Torsten Witte, für seine wissenschaftliche Betreuung, die vielen Ideen, Ratschläge und Anregungen, seine Hilfsbereitschaft und Optimismus, seine Geduld und ruhige Art. Es hat mir viel Freude bereitet, in seiner Arbeitsgruppe zu forschen.

Herrn Prof. Dr. Walter Müller, meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit, für die vielen Diskussionen und die motivierenden Gespräche.

Herrn Prof. Dr. Bernd Otto, für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. J. Lauber, GBF Braunschweig, für Kooperation bei Affymetrix GeneChip Analyse.

Herrn Dr. Torsten Kirsch, Abteilung der Nephrologie, MHH, für seine große Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung und dem Design der quantitativen RT-PCR für KIR.

Allen Mitarbeitern (auch ehemaligen) der Klinischen Immunologie für die zahlreiche Tipps und Tricks im Laboralltag und angenehme Arbeitsatmosphäre: Frau Maaß, Adan, Anna, Arne, Bettina, David, Esther, Gerrit, Gisela, Janine, Julia, Kai, Katja, Katy, Kerstin, Lara, Marcus, Margot, Marion, Martin, Metodi,

Nelli, Olga, Pejman, Sabine, Sandra, Silke, Sonja H., Sonja W., Syed, Tibor, Varsha, Wahid, Yu-Han.

Herrn PD Dr. Roland Jacobs für seine Hilfe bei vielen Problemen, besonders mit dem PC.

Allen Patienten, die an unserer Studie teilgenommen haben.

Finanziell unterstützt wurde dieses Projekt von der Fritz-Bender Stiftung, HiLF Medizinische Hochschule Hannover und Kompetenznetz Rheuma: C 2.12, BMBF/DLR.

Allen meinen Freunden für freundliche Anteilnahme an meiner Doktorarbeit.

Zuletzt bedanke ich mich herzlich bei meiner ganzen Familie, besonders bei meinen Eltern für liebevolle Unterstützung in jeder Hinsicht und für den Glauben an mich. Ich freue mich sehr, ihnen diese Arbeit widmen zu können.

Muchas gracias a Francisco por tu amor, motivacion, ayuda y apollo.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig durchgeführt und verfasst habe. Ebenfalls erkläre ich, dass diese Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Es wurden keine anderen außer den angegebenen  
Quellen und Hilfsmitteln verwendet.

Hannover, den 06.10.2004