

Aus der Klinik für Rheumatologie  
Fachkrankenhaus für Rheumatologie und Orthopädie GmbH  
Vogelsang-Gommern  
Klinikdirektor: Prof. Dr. med. habil. J. Kekow

**Biomarker basierte Vorhersage eines Therapieerfolges  
einer anti-TNF-alpha-Therapie bei Patienten mit  
rheumatoider Arthritis**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Marietta Glötzner  
aus Neumarkt i.d.OPf.  
Magdeburg 2012

## Dokumentationsblatt

### Bibliographische Beschreibung:

Glötzner, Marietta:

Biomarker basierte Vorhersage eines Therapieerfolges einer anti-TNF-alpha-Therapie bei Patienten mit rheumatoider Arthritis. - 2012. - 96 Bl. : 10 Abb., 20 Tab., 3 Anh.

### Kurzreferat:

Eine frühzeitige Therapieeinleitung bei der rheumatoiden Arthritis stellt eine wichtige Maßnahme dar, um irreversible Gelenkdestruktionen zu vermeiden. Seit etwa zwölf Jahren werden TNF- $\alpha$ -Blocker erfolgreich zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis eingesetzt. Allerdings bestehen hohe Therapiekosten und bei etwa 25% der Patienten wird ein inadäquates Ansprechen beobachtet.

Ziel dieser Arbeit war es, Biomarker zu identifizieren, die mit einem unterschiedlichen Ansprechen auf die anti-TNF- $\alpha$ -Therapie assoziiert sind. In einer Kohorte von 304 RA-Patienten, die mit Etanercept behandelt und deren klinischer Verlauf bis zu zwölf Monate analysiert wurde, untersuchte man klinische, laborchemische und genetische Parameter. Als klinische Merkmale wurden das Alter, das Geschlecht, das Erkrankungsalter und die Krankheitsaktivität einbezogen. Daneben wurden die CCP-Antikörper und der Rheumafaktor ermittelt. Aufbauend auf Voruntersuchungen und Literaturrecherchen wurde eine Auswahl mehrerer Single-Nukleotid-Polymorphismen (*CLSTN2*, *CLCN1*, *PTPN22*, *MED29*, *FCGR3A*) getroffen.

Es konnten potentielle Therapieresponseprädiktoren identifiziert werden. Patienten mit dem SNP *MED29* CC-Genotyp, dem SNP *PTPN22* A-Allel, einem hoch positiven CCP-AK-Spiegel oder niedrigen DAS28-Ausgangs-Wert zeigten ein schlechteres Ansprechen auf die ETN-Therapie. Bei Differenzierung hinsichtlich des CCP-AK-Status ließ sich ein Ausbleiben des Therapieerfolges bei CCP-AK-negativen SNP *FCGR3A* AA-Genotyp-Trägern und CCP-AK-positiven SNP *PTPN22* A-Allel-Trägern feststellen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass es sinnvoll ist, auf der Suche nach Markern der Therapieantwort, die Patienten in Subgruppen hinsichtlich des CCP-AK-Status zu unterteilen.

## Schlüsselwörter

Rheumatoide Arthritis – Biologika – anti-TNF- $\alpha$ -Therapie – Biomarker – SNP – CCP-  
AK – Therapieantwort – Prädiktoren

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
<b>1 Einführung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Die rheumatoide Arthritis.....	1
1.1.1 Diagnostik der rheumatoiden Arthritis.....	1
1.1.2 Klinischer Verlauf und Prognose.....	5
1.1.3 Medikamentöse Therapie.....	5
1.1.4 Genetischer Hintergrund.....	8
1.2 Biomarker für den Therapieerfolg einer anti-TNF- $\alpha$ -Therapie.....	9
1.3 Zielsetzung.....	11
<b>2 Patienten und Methoden.....</b>	<b>13</b>
2.1 Patienten.....	13
2.1.1 Patienten und Kontrollen.....	13
2.1.1.1 Charakterisierung der RA-Patienten und Kontrollen.....	14
2.1.1.2 Charakterisierung der Gruppe ETN behandelter Patienten.....	15
2.1.2 Dokumentation und Auswertung der Patientendaten.....	16
2.1.2.1 Beurteilung der Krankheitsaktivität.....	17
2.1.2.2 Beurteilung des Therapieerfolges.....	18
2.2 Methoden.....	19
2.2.1 Laborchemische Parameter.....	19
2.2.2 Genetische Parameter.....	20
2.2.2.1 Auswahl der Single-Nukleotid-Polymorphismen.....	20
2.2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	22
2.2.2.2.1 DNA-Extraktion aus Vollblut.....	22
2.2.2.2.2 Genotypisierung.....	23
2.2.2.2.2.1 Allel-spezifische TaqMan <sup>®</sup> PCR.....	23
2.2.2.2.2.2 TaqMan <sup>®</sup> -Reaktionsansatz.....	26
2.2.3 Statistische Auswertung.....	28
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
3.1 Analyse des RA-Gesamtkollektivs und der Kontrollpopulation.....	30
3.1.1 Auswertung der Genotypenanalyse.....	30
3.1.2 Testung der Genotypen auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	31
3.2 Assoziation der Merkmale mit dem Erfolg der anti-TNF- $\alpha$ -Therapie – Analyse des ETN-Patientenkollektivs.....	32
3.2.1 Untersuchung der einzelnen klinischen Parameter.....	32
3.2.2 Untersuchung der laborchemischen Parameter in Abhängigkeit des Therapieerfolges.....	33
3.2.3 Untersuchung der genetischen Parameter in Abhängigkeit des Therapieerfolges.....	34
3.2.3.1 Assoziationsanalysen der Single-Nukleotid-Polymorphismen mit dem Therapieerfolg.....	35
3.2.3.2 Assoziationsanalysen der Single-Nukleotid-Polymorphismen mit dem Therapieerfolg bei Differenzierung zwischen dem CCP-AK-Status.....	37

3.2.3.3	Assoziationsanalysen der Single-Nukleotid-Polymorphismen mit der Krankheitsaktivität im zeitlichen Verlauf von zwölf Monaten .....	39
3.2.4	Untersuchung des Therapieerfolges unter der Kombination signifikanter Merkmale .....	41
3.2.5	Untersuchung der Merkmale in Abhängigkeit des Therapieerfolges im multivariaten Modell .....	43
4	Diskussion .....	45
4.1	Identifizierung genetischer Merkmale.....	45
4.1.1	Vergleich der Genotypisierungsergebnisse mit dem Referenz-Genom HapMap und veröffentlichten Studien .....	53
4.2	Assoziation der klinischen Parameter mit dem Therapieerfolg .....	55
4.3	Assoziation der laborchemischen Parameter mit dem Therapieerfolg .....	56
4.4	Diskussion des prädiktiven Aussagewerts unter der Kombination signifikanter Merkmale .....	57
4.5	Diskussion der Ergebnisse im multivariaten Modell .....	57
4.6	Beurteilung des Studiendesigns und der Auswahl des Studienkollektivs....	58
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	61
	Literaturverzeichnis .....	64
	Tabellenverzeichnis .....	76
	Abbildungsverzeichnis.....	77
	Formelverzeichnis .....	77
	Anhang .....	78
	Publikationen .....	86
	Darstellung des Bildungsweges.....	87
	Danksagungen .....	88
	Erklärung .....	89

## Abkürzungsverzeichnis

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ADA	Adalimumab
AFA	anti-Filaggrin-Antikörper
AK	Antikörper
AKA	anti-Keratin-Antikörper
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ACPA	Antikörper gegen citrullinierte Antigene, <i>anti-citrullinated protein-peptide antibodies</i>
APF	anti-perinukleärer Faktor
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CCP-AK	anti-Citrullin-Antikörper, <i>cyclic citrullinated peptide antibodies</i>
COMP	<i>cartilage oligomeric matrix protein</i>
CRP	C-reaktives Protein
DAS28	<i>disease activity score, 28-joint count</i>
dbSNP	<i>single nucleotide polymorphism database</i>
DMARD	Basistherapeutikum, <i>disease modifying antirheumatic drug</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate, <i>desoxyribonucleosidtriphosphate</i>
dUTPs	Desoxyuridintriphosphate, <i>desoxyuridinetriphosphate</i>
ELISA	enzymgebundener Immunosorbent-Test, <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ETN	Etanercept
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
GH	<i>general health</i>
GWAS	genomweite Assoziationsstudie, <i>genome-wide association study</i>
HAQ	<i>health assessment questionnaire</i>
HLA	menschliches Leukozytenantigen, <i>human leucocyte antigen</i>
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
HWG	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
IFN	Interferon
IFX	Infliximab
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1-Rezeptor Antagonist
KI	Konfidenzintervall

MCP	Metacarpophalangealgelenk
MCV	mutiertes citrulliniertes Vimentin, <i>mutated citrullinated vimentin</i>
MGB	<i>minor groove binder</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, <i>major histocompatibility complex</i>
miRNA	microRNA
mRNA	Boten-RNA, <i>messengerRNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MTP	Metatarsophalangealgelenk
MTX	Methotrexat
MW	Mittelwert
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
NTC	<i>no template control</i>
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
PIP	proximales Interphalangealgelenk
RA	rheumatoide Arthritis
RABBIT	rheumatoide Arthritis: Register zur Beobachtung der Biologika-Therapie
RF	Rheumafaktor
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
RR	relatives Risiko
SD	Standardabweichung, <i>standard deviation</i>
SDS	<i>sequence detection system</i>
SE	<i>shared epitope</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes, <i>standard error of the mean</i>
SJC	Anzahl geschwollener Gelenke, <i>swollen joint count</i>
SNP	Single-Nukleotid-Polymorphismus
SSZ	Sulfasalazin
TGF-β1	<i>transforming growth factor beta-1</i>
TJC	Anzahl der druckschmerzhaften Gelenke, <i>tender joint count</i>
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
TTP	Tristetraprolin
VAS	visuelle Analogskala
χ <sup>2</sup> -Test	Chi-Quadrat-Test

# 1 Einführung

## 1.1 Die rheumatoide Arthritis

Als häufigste entzündlich-rheumatische Gelenkerkrankung beeinträchtigt die rheumatoide Arthritis (RA) den Menschen durch Schmerzen, Bewegungseinschränkung und zunehmenden Funktionsverlust mit Einbußen in der Lebensqualität und Leistungsfähigkeit. Diese chronisch entzündliche Systemerkrankung des rheumatischen Formenkreises führt zur Schädigung von Knochen und Knorpel der betroffenen Gelenke. Daneben sind auch extraartikuläre Manifestationen, beispielsweise in Form von Rheumaknoten, sekundären Vaskulitiden, Beteiligung des Herzens und der Augen möglich. Die weltweite Prävalenz der RA beträgt etwa 1% [1] und zu 2/3 ist das weibliche Geschlecht betroffen. Der Erkrankungsbeginn der RA betrifft jedes Lebensalter, jedoch ereignen sich die meisten Neuerkrankungen zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr.

### 1.1.1 Diagnostik der rheumatoiden Arthritis

Die Diagnose der RA ist vor allem im frühen Krankheitsstadium oftmals schwierig, da das klinische Erscheinungsbild sehr variabel ist. Jedoch ist gerade die frühzeitige Therapieeinleitung eine wichtige Maßnahme, um irreversible Gelenkdestruktionen zu vermeiden. Dies erklärt die Forderung nach einer frühen, sicheren Diagnosestellung.

Klinisch manifestiert sich die RA mit Gelenkschmerzen, Gelenkschwellungen und Morgensteifigkeit – bevorzugt an den kleinen Finger- und Zehengelenken. Im typischen Fall finden sich bei der klinischen Untersuchung symmetrische Schwellungen und Druckschmerzen an mindestens drei Gelenken; dies zeigt sich vor allem an Hand-, Fingergrund- und Fingermittelgelenken. Die Hände und Füße können einen Querdruckschmerz (Gaenslen-Zeichen) aufweisen. In einigen Fällen sind auch große Gelenke wie das Schulter-, Ellenbogen-, Knie-, Hüft-, oder Sprunggelenk betroffen. Die revidierten Diagnosekriterien des American College of Rheumatology (ACR), die 1987 von Arnett et al. veröffentlicht wurden, sind in Tabelle 1 dargestellt [2].



**Tabelle 1: ACR-Kriterien zur Klassifikation der RA von 1987**

Kriterien des American College of Rheumatology
1. Morgensteifigkeit der Gelenke von mindestens einer Stunde Dauer
2. Arthritis von drei oder mehr Gelenkregionen: Weichteilschwellung und Erguss an mindestens drei Gelenkregionen gleichzeitig (die 14 möglichen Regionen sind die rechten oder linken proximalen Interphalangeal- (PIP-), Metacarpophalangeal- (MCP-), Hand-, Ellenbogen-, Knie-, Sprung- und Metatarsophalangeal- (MTP-) Gelenke)
3. Arthritis der Hand: Schwellung mindestens einer Gelenkregion an Hand-, MCP-, oder PIP-Gelenk
4. Symmetrische Arthritis: Symmetrische Beteiligung der gleichen Gelenkregion auf beiden Körperseiten
5. Rheumaknoten: Subkutane Knoten über Knochenvorsprüngen, an den Streckseiten oder in Gelenknähe
6. Rheumafaktoren im Serum nachweisbar: Abnormaler Titer des Serum-Rheumafaktors mit einer Methode, die bei weniger als 5% von normalen Kontrollpersonen positiv ist
7. Typische Röntgenveränderungen der Hände: Gelenknähe Osteoporose und/oder Erosionen (osteoarthrotische Veränderungen allein sind nicht ausreichend)

Wenigstens vier dieser Kriterien müssen erfüllt sein, wobei die Kriterien 1 - 4 für mindestens sechs Wochen bestehen müssen.

Diese Kriterien werden für die Diagnose einer etablierten RA angewendet, sind jedoch für die frühen Stadien der RA weniger gut geeignet. Um dieser Problematik zu begegnen, wurden die ACR-Kriterien von 1987 durch das ACR und die European League Against Rheumatism (EULAR) überarbeitet und die neuen ACR/EULAR-Klassifikationskriterien 2010 für die RA veröffentlicht [3]. Diese Kriterien beziehen die Gelenkbeteiligung, serologische Parameter (Rheumafaktor (RF), Antikörper (AK) gegen citrullinierte Peptid/Protein-Antigene (*anti-citrullinated protein-peptide antibodies*, ACPA), Entzündungsparameter (Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und C-reaktives Protein (CRP)) und die Dauer der Arthritis mit ein. Mit Hilfe dieser neuen Kriterien soll eine frühe Diagnose der RA erleichtert und ein früher Therapiebeginn ermöglicht werden.

Bei fortgeschrittenen oder frühzeitig aggressiven Krankheitsverläufen erweisen sich bildgebende Verfahren als wichtige diagnostische Säule [4;5]. Die konventionelle Röntgendiagnostik liefert in allen Stadien wichtige Erkenntnisse: in frühen Stadien der RA finden sich Weichteilschwellung und Kollateralphänomene (periartikuläre Demineralisierung des Knochens), die auch beim Fehlen von klinischen Zeichen vorhanden sein können [6]. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung treten gelenknahe zystoide Aufhellungen und eine Gelenkspaltverschmälerung aufgrund der Knorpelzerstörung auf. Im Spätstadium kann es zur vollständigen Gelenkzerstörung kommen. Bildgebende Verfahren wie die Magnetresonanztomographie (MRT) und die Arthrosonographie sind besonders gut geeignet, um Frühstadien der RA zu detektieren. Hierbei gewinnt die Arthrosonographie aufgrund fortschreitender Optimierung in der Bildgebung und der Kosteneffizienz zunehmend an Bedeutung in der klinischen Praxis.

Auch laborchemische Untersuchungen liefern einen wichtigen Beitrag zur Diagnosefindung. Der Entzündungsparameter BSG und der serologische Marker CRP werden häufig bei RA-Patienten mit erhöhten Werten vorgefunden. Die Serumspiegel dieser Parameter korrelieren mit dem systemischen Entzündungsgrad und sind somit sehr gut geeignet, um die aktuelle Krankheitsaktivität zu beurteilen [7]. Allerdings sind diese unspezifischen Marker für eine inflammatorische Aktivität keine Indikatoren für das Vorliegen einer RA.

Der RF, als wohl bekanntester labordiagnostischer Marker der RA, ist auch in den ACR-Kriterien zu finden [2]. RF sind Autoantikörper, die gegen den Fc-Teil körpereigener humaner Immunglobuline (Ig) G gerichtet sind [8]. Bei der RA kommen alle Ig-Klassen (IgM, IgA, IgG, IgD und IgE) vor, wobei vor allem die RF vom IgM- und IgA-Typ von Bedeutung sind. Ihre diagnostische Wertigkeit ist allerdings eingeschränkt, da diese AK auch bei anderen Autoimmunkrankheiten, im Rahmen chronischer Infektionserkrankungen oder bei älteren Personen zu finden sind [9]. Die Spezifität der RF wird in der Literatur zwischen 80-93% angegeben [10]. Die Sensitivität liegt bei nur 55-70%, da der Anteil RF-negativer RA-Patienten relativ hoch ist [10]. Der gleichzeitige Nachweis von IgA und IgM gilt als Risikofaktor für die Entwicklung einer RA beim asymptomatischen Patienten [11]. Neben der Diagnosefindung hat

der RF auch als prognostischer Indikator der Krankheitsschwere eine Bedeutung [12;13].

Aufgrund der begrenzten Krankheitsspezifität der RF wurde nach weiteren serologischen Markern gesucht, um die Diagnostik der RA zu verbessern. Erfolgversprechend schienen der 1964 entdeckte anti-perinukleäre Faktor (APF) [14] und die 1979 beschriebenen anti-Keratin-AK (AKA) [15], da sie eine hohe Krankheitsspezifität aufweisen. Es zeigte sich, dass die beiden Autoantikörper APF und AKA gegen citrullinhaltige Filaggrine gerichtet sind, weshalb sie als anti-Filaggrin-Antikörper (AFA) bezeichnet wurden. Schellekens et al. konnten im Jahre 1998 schließlich nachweisen, dass nicht das Filaggrin an sich, sondern dessen Citrullin-Reste für die AK-Reaktion verantwortlich sind [16]. Diese Tatsache veranlasste die Umbenennung der AFA in anti-Citrullin-Antikörper (*cyclic citrullinated peptide antibodies*, CCP-AK). Hinsichtlich der AK-Entstehung wird angenommen, dass es im Rahmen eines Apoptose-Vorgangs zur Citrullinierung von Peptiden kommt und anschließend – über eine Präsentation dieser citrullinierten Proteinfragmente an die T-Zelle mit nachfolgender Aktivierung der B-Zelle – eine Autoantikörper-Bildung induziert wird [16]. Sukzessive fanden sich weitere citrullinierte Antigene wie beispielsweise Fibrinogen [17], Fibrin [18],  $\alpha$ -Enolase [19] und mutiertes Vimentin [20]. Sämtliche AK gegen genannte Antigene werden heute unter dem Begriff der ACPA zusammengefasst. Zum aktuellen Zeitpunkt stehen mit dem Nachweis von AK gegen CCP und mutiertes citrulliniertes Vimentin (*mutated citrullinated vimentin*, MCV) zwei verschiedene kommerzielle Testsysteme für die Labordiagnostik der RA zur Verfügung. Beide Testsysteme besitzen eine sehr hohe, vergleichbare Spezifität (>95%) und eine gute Sensitivität, deren Wert bei den anti-MCV-AK gegenüber den anti-CCP-AK (82% vs 72%) etwas höher liegt [20]. Darüber hinaus sind die ACPA schon in der Frühphase der RA detektierbar. Vor diesem Hintergrund wird deren Bedeutung als wichtige serologische Marker in der Früh- und Differenzialdiagnostik deutlich. Die prognostische Wertigkeit der ACPA liegt darin, dass sie mit einem progressiven, erosiven Krankheitsverlauf korrelieren [21;22]. Zudem konnte eine Assoziation der anti-MCV-AK mit der Krankheitsaktivität nachgewiesen werden [20]. Man geht auch davon aus, dass die ACPA im pathogenetischen Zusammenhang mit der Entwicklung der RA stehen und die Autoimmunität gegen citrullinierte Proteinantigene eine gesonderte klinische und genetische Form dieser Erkrankung darstellt [23].

### 1.1.2 Klinischer Verlauf und Prognose

Die RA kann sehr unterschiedlich verlaufen. In der Mehrzahl der Fälle schreitet die Erkrankung progredient fort. Dies bedeutet eine schubweise oder schleichende Gelenkerstörung mit individuell unterschiedlicher Geschwindigkeit. Laut Untersuchungen von Young et al. entwickeln etwa die Hälfte der Patienten, die sich in einem frühen Erkrankungsstadium der RA befinden, innerhalb von fünf Jahren Einschränkungen ihrer Funktionsfähigkeit [24]. Es sind einige Faktoren bekannt, die als prognostisch ungünstig gelten und helfen den Verlauf der Krankheit einzuschätzen. Hierzu zählen das weibliche Geschlecht, spätes Erkrankungsalter (>60 Jahre), Seropositivität und frühes Auftreten des RF, Seropositivität der CCP-AK, Rauchen, ein niedriger Sozialstatus, hohe BSG- und CRP-Werte, frühe Funktionseinschränkungen sowie frühes Auftreten von Erosionen [25-27].

Hauptsächlich leiden die Patienten unter den Gelenkschmerzen und der zunehmenden Einschränkung bei der Ausführung von Alltagstätigkeiten. Im Verlauf werden einige Patienten hilfs- und/oder pflegebedürftig. Da das Ausmaß der Gelenkerosionen bei spätem Therapiebeginn zunimmt, ist der Zeitpunkt der therapeutischen Intervention von großer Bedeutung für den Krankheitsverlauf des Patienten [28;29].

### 1.1.3 Medikamentöse Therapie

Bis zum Einsatz der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha-Blocker (TNF- $\alpha$ -Blocker) Ende der 1990er Jahre galt die Verwendung von Basistherapeutika (*disease modifying antirheumatic drugs*, DMARD) als wirksamstes Therapieverfahren zur Behandlung der RA. Auch zum aktuellen Zeitpunkt sind sie noch in der Mehrzahl der Fälle das Mittel der ersten Wahl. Häufig werden nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) und Glukokortikoide aufgrund ihrer symptomlindernden und entzündungshemmenden Wirkung als Begleitmedikation eingesetzt. Im Rahmen der DMARD-Therapie kommen bevorzugt Methotrexat (MTX), Sulfasalazin (SSZ) und Leflunomid zur Anwendung. Allerdings profitieren nicht alle Patienten von diesen Therapieformen.

Um auch gegen diese therapierefraktären Verläufe der RA anzugehen, waren zusätzliche Behandlungsoptionen gefordert. Basierend auf dem Verständnis der zentralen Rolle des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  in der Pathogenese der RA

wurde als neue therapeutische Option die Neutralisation dieses Zytokins zur gezielten Behandlung der RA eingeführt [30-32]. TNF- $\alpha$  wird vor allem von Makrophagen, Lymphozyten und Synovialzellen produziert und induziert die Expression anderer pro-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin (IL)-1 und IL-6. Durch die Schaffung dieses pro-inflammatorischen Milieus wird die Pannusbildung in den Gelenken über die Aktivierung und Proliferation der Synovialzellen gefördert [33-36]. Die langfristige Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion führt schließlich zu Knorpelzerstörung und Erosion der Knochen [37;38]. Durch die TNF- $\alpha$ -Blocker ist das bislang gängige Behandlungskonzept der RA, d.h. die Behandlung mittels DMARD, wesentlich verbessert worden. Die große Stärke der TNF- $\alpha$ -Blocker liegt vor allem in der Hemmung der radiologischen Progression, der Reduzierung von Krankheitssymptomen sowie der Verbesserung der Lebensqualität [39]. Zusätzlich stellen sie ein deutlich nebenwirkungsärmeres Therapieprinzip und eine wichtige Behandlungsoption dar, falls die DMARD-Therapie nicht anschlägt oder aufgrund unerwünschter Wirkungen beendet werden muss.

Die Indikation der TNF- $\alpha$ -Blocker beschränkt sich zum aktuellen Zeitpunkt auf Patienten, deren Krankheitsaktivität oder radiologische Progression nicht mittels DMARD-Therapie zu kontrollieren ist oder die hierunter inakzeptable Nebenwirkungen erleiden [40]. Nach heutiger Studienlage ist die Wirksamkeit dieser Pharmaka bei Patienten mit einer DMARD-refraktären RA ausreichend belegt [39;41-44]. Die Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie empfiehlt den Einsatz der Biologika, wenn trotz zwei adäquat durchgeführter DMARD-Therapien inklusive MTX nach sechs Monaten noch eine aktive RA vorliegt. Individuelle Besonderheiten wie z.B. eine sehr hohe Krankheitsaktivität oder Kontraindikationen gegen die DMARD können einen früheren Einsatz rechtfertigen. Allerdings wäre generell eine frühere therapeutische Intervention mit TNF- $\alpha$ -Blockern wünschenswert; denn irreversible Funktionsverluste, bedingt durch eine lange Krankheitsdauer oder starke Krankheitsaktivität, können selbst mit sehr wirksamen Medikamenten nicht mehr rückgängig gemacht werden. Folglich laufen die Patienten Gefahr eine versorgungsbedürftige Behinderung zu erleiden. Studien belegen, dass ein früher Einsatz von TNF- $\alpha$ -Blockern einer Monotherapie mit DMARD überlegen ist [45-47].

Nachteil der Biologikatherapie sind die hohen Jahrestherapiekosten, die jene der DMARD bei Weitem übersteigen [48]. Problematisch ist auch die Tatsache, dass bei 25-30% der Patienten der Therapieerfolg ausbleibt [49-51].

Zum aktuellen Zeitpunkt sind die TNF- $\alpha$ -Blocker Etanercept (ETN) (Enbrel<sup>®</sup>), Infliximab (IFX) (Remicade<sup>®</sup>), Adalimumab (ADA) (Humira<sup>®</sup>), Certolizumab Pegol (Cimzia<sup>®</sup>) und Golimumab (Simponi<sup>®</sup>) zugelassen. ETN ist ein humanes dimeres Fusionsprotein aus zwei extrazellulären TNF-Rezeptordomänen (TNFR2/p75) und dem Fc-Teil eines IgG1-AK. ETN bindet sowohl TNF- $\alpha$  als auch Lymphotoxin- $\beta$  (TNF- $\beta$ ). Bei IFX – seit 1998 in der Anwendung – handelt es sich um einen monoklonalen, chimären (human-murin) AK. Der Fc-Anteil des Ig ist vollständig humanen Ursprungs; der murine Anteil (Mausprotein) bindet freies und gebundenes TNF- $\alpha$ . Der seit 2003 zugelassene TNF- $\alpha$ -Blocker ADA ist ein vollständig humaner monoklonaler AK gegen TNF- $\alpha$ . Mit dem 2009 eingeführten anti-TNF- $\alpha$ -Blocker Certolizumab Pegol werden durch die Konjugation mit Polyethylenglykol (PEGylierung) die pharmakologischen Vorteile einer längeren Verweildauer und einer niedrigeren Dosierung genutzt. Im selben Jahr wurde auch der TNF- $\alpha$ -Blocker Golimumab für die RA zugelassen. Dieser soll durch die Verlängerung des Applikationsintervalls auf eine einmalige monatliche Injektion die praktische Anwendung erleichtern. Die molekulare Wirkungsweise der TNF- $\alpha$ -Blocker ist ähnlich. Durch ihre Interaktion mit TNF- $\alpha$  verhindern sie dessen Bindung an spezifische Rezeptoren und folglich nachgeschaltete Signaltransduktionskaskaden. Zusätzlich können die TNF- $\alpha$ -Blocker über ihre Wechselwirkung mit membrangebundenem TNF- $\alpha$  die zelluläre Apoptose induzieren und somit die Anzahl entzündungsfördernder Zellen reduzieren [52]. Weiterhin scheinen die TNF- $\alpha$ -Blocker auf die Zytokinexpression einzuwirken, da gezeigt werden konnte, dass ETN eine Abnahme der IL-12 stimulierten Interferon (IFN)- $\gamma$ -Produktion bewirkt [53].

Neben den TNF- $\alpha$ -neutralisierenden Substanzen sind zum aktuellen Zeitpunkt weitere Biologika für die Behandlung der RA zugelassen: Anakinra (Kineret<sup>®</sup>) ist dem natürlich vorkommenden Antagonisten gegen den IL-1-Rezeptor nachempfunden und hemmt somit die Aktivität des pro-inflammatorisch wirkenden Zytokins IL-1. Dieser IL-1-Rezeptor Antagonist (IL-1RA) kann seit 2002 angewendet werden. Die Indikation zur Behandlung der RA mit dem CD20-AK Rituximab (MabThera<sup>®</sup>) ist seit 2006 ge-

geben, da sich zeigte, dass Patienten mit fortgeschrittener RA nach Versagen von TNF- $\alpha$ -Blockern von einer selektiven B-Zell-Depletion mit dem CD20-AK Rituximab (MabThera<sup>®</sup>) profitieren. Ein Jahr später erfolgte die Einführung von Abatacept (Orencia<sup>®</sup>). Dieser Wirkstoff vermindert, über die Bindung der Signalmoleküle CD80 und CD86, die Aktivierung von T-Zellen und trägt zur Verringerung der Entzündungsreaktion bei. Tocilizumab (RoActemra<sup>®</sup>), ein monoklonaler AK gegen den IL-6-Rezeptor, ist seit 2009 zur Behandlung der RA zugelassen und wirkt über die Hemmung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6.

#### 1.1.4 Genetischer Hintergrund

Trotz intensiver Forschung ist die Pathogenese und Ätiologie der RA noch weitgehend unklar. Es handelt sich um eine Fehlsteuerung des Immunsystems – eine Autoimmunerkrankung. Man geht von einer multifaktoriellen Genese aus erblicher Veranlagung, hormonellen Einflüssen und Umweltfaktoren aus. Der genetische Hintergrund soll mit etwa 30-60% an der Entwicklung einer RA beteiligt sein [54]. Laut Deighton et al. machen ein Drittel dieses Risikos Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) aus [55]. Ein Teil dieser Gene kodiert für menschliche Leukozytenantigene (*human leucocyte antigen*, HLA). Dabei handelt es sich um Oberflächenmoleküle, deren Hauptfunktion es ist, T-Zellen im Rahmen der Immunantwort Antigene zu präsentieren. Es wurden mehrere HLA-Loci gefunden, die mit der RA assoziiert sind, wobei sich für das HLA-DRB1 Gen die stärkste Assoziation ergab [56]. Es zeigte sich, dass die Transkriptionsprodukte dieser HLA-Allele in einem definierten Molekülabschnitt identische bzw. fast identische Aminosäuresequenzen aufweisen. Diese Region wird als *shared epitope* (SE) bezeichnet und ist an der Antigenpräsentation gegenüber T-Lymphozyten beteiligt. Dies bekräftigt die Vermutung, dass an der Entstehung der RA ein „arthritogenes Antigen“ beteiligt ist. Es wird angenommen, dass dieses Antigen durch Synovialzellen den T-Lymphozyten präsentiert wird. Über Zytokinausschüttungen kommt es zur Aktivierung verschiedener Zellsysteme und der Ausbildung der Entzündungsreaktion. Da durch den MHC-Locus der genetische Hintergrund der Krankheitssuszeptibilität nicht vollständig geklärt werden konnte, wurden weitere genomische Analysen durchgeführt. Insbesondere im Zuge der Entwicklung genomweiter Assoziationsstudien (*genome-wide association study*, GWAS) konnte das Wissen um neue Risiko-

Loci für die RA enorm bereichert werden. Mittlerweile konnten >30 nicht-MHC Risikoallele detektiert werden [57-67]. Diese Loci tragen jedoch nur mit etwa 4% zur genetischen Belastung der RA bei [67]. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die ACPA-negative und ACPA-positive RA mit unterschiedlichen genetischen Risikofaktoren assoziiert sind und somit gesonderte Krankheitsentitäten mit verschiedenen Krankheitsmechanismen darstellen könnten [68;69]. Bei vielen Risiko-Loci der RA konnte die Lokalisation im Genom zwar identifiziert werden, die Mutation oder das Gen, welches kausal mit der Krankheitsentwicklung in Verbindung steht, ist allerdings häufig noch unbekannt.

Neben genetischen Sequenzvariationen stellt auch der Einfluss epigenetischer Faktoren einen wichtigen Schwerpunkt der aktuellen Forschung dar. Die Epigenetik beschäftigt sich mit genregulatorischen Vorgängen zur Steuerung der Genexpression. Diese werden besonders durch die Methylierung und Demethylierung der Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*, DNA), die Acetylierung und Deacetylierung der Histone sowie durch nicht-kodierende Ribonukleinsäuren (*ribonucleic acid*, RNA) gesteuert. Nach derzeitigem Kenntnisstand scheint der Einfluss epigenetischer Modifikationsmechanismen bei der Pathogenese der RA eine wichtige Bedeutung zu spielen, jedoch ist auch in diesem Bereich noch zu wenig über die Abläufe im Detail und deren Tragweite bekannt.

## 1.2 Biomarker für den Therapieerfolg einer anti-TNF- $\alpha$ -Therapie

Aufgrund beträchtlicher Therapiekosten, dem hohen Anteil an Patienten, die nicht zufriedenstellend auf die anti-TNF- $\alpha$ -Therapie ansprechen sowie der Verfügbarkeit alternativer Therapieoptionen aus der Medikamentengruppe der Biologika, besteht höchstes Interesse nach sog. Biomarkern, die den Therapieerfolg der anti-TNF- $\alpha$ -Therapie vorhersagen lassen. Biomarker sind definiert als objektiv messbare und evaluierbare Größen, die Indikatoren für einen physiologischen oder pathologischen Prozess oder die Antwort auf eine therapeutische Intervention sind [70].

Demografische und klinische Charakteristika wurden hinsichtlich ihrer Güte als Responseprädiktoren untersucht. So konnte eine Assoziation des Therapieverhaltens mit der Krankheitsaktivität, dem Behinderungsgrad (evaluiert anhand des *health*



*assessment questionnaire* (HAQ)), dem Zigarettenkonsum und einer begleitenden Einnahme von MTX bzw. NSAR festgestellt werden [71;72]. Zusätzlich zeigten Hyrich et al., dass Frauen mit RA unter der anti-TNF- $\alpha$ -Therapie weniger häufig in Remission gehen als Männer [71]. Entsprechend konnten Mancarella et al. das männliche Geschlecht als positiven Faktor für die Krankheitsremission identifizieren [73]. Allerdings konnte kein Zusammenhang des Geschlechts mit dem Therapieverlauf festgestellt werden [72]. Die Bedeutung des Patientenalters auf den Erfolg der anti-TNF- $\alpha$ -Therapie bleibt kontrovers: Hyrich et al. wiesen keine Assoziation nach [71], wohingegen Hetland et al. dies nicht bestätigten [74]. Übereinstimmend fanden Hyrich et al und Kristensen et al. keine Korrelation der Krankheitsdauer mit der Therapieantwort [71;72].

Auf der Suche nach prädiktiven Serum-Biomarkern wurden im Rahmen von diversen Studien vor allem das *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP), der RF und die CCP-AK analysiert [75-79]. Daraus resultierten jedoch unterschiedliche Ergebnisse. Einige Studien kamen zu dem Schluss, dass Patienten mit schlechtem Ansprechen auf die anti-TNF- $\alpha$ -Therapie höhere CCP-AK-Spiegel [76;77] und IgA-RF-Spiegel [75], Seropositivität der CCP-AK und des RF [79] sowie hohe COMP-Titer [78] zeigten. Morozzi et al. stellten hingegen fest, dass der RF- oder CCP-AK-Status keine Aussage über das Ansprechen auf die Therapie zulasse [78]. Die RF könnten als Parameter für ein Therapiemonitoring geeignet sein, da deren Serumspiegel bei Patienten mit gutem Therapieerfolg signifikant absanken [75;76;78]. Ob dieser Zusammenhang auch für die CCP-AK zutrifft bleibt umstritten, da sich kontroverse Ergebnisse ergaben [75;76;78].

Im Zuge der Aufschlüsselung des humanen Genoms, der Etablierung von großen genetischen Datenbanken sowie der rasanten Entwicklung und Optimierung von Analysemethoden rückten auch genetische Biomarker zunehmend in das wissenschaftliche Interesse. Anders als klinische und laborchemische Marker bieten sie ideale Voraussetzungen für Screening-Parameter, da sie bei jedem Patienten und in allen Krankheitsstadien existieren. Im Hinblick auf die Rolle des TNF- $\alpha$ , als wichtiger Induktor der Entzündungsreaktion, wurden genetische Polymorphismen, die in Verbindung mit dem TNF- $\alpha$ -Metabolismus stehen, mit besonderem wissenschaftlichem Interesse betrachtet. In diesem Zusammenhang wurde der -308 TNF- $\alpha$ -

Genpolymorphismus am häufigsten untersucht. Allerdings bleibt die Datenlage kontrovers und es liegt kein definitives Ergebnis vor [80-83]. Daneben waren auch andere am inflammatorischen Geschehen beteiligte Faktoren von Bedeutung. Beispielsweise analysierten Padyukov et al. Genpolymorphismen im Bereich der kodierenden Sequenzen des IL-1RA, IL-10 und des *transforming growth factor beta-1* (TGF- $\beta$ 1) [83]. Die Autoren konnten zeigen, dass bestimmte Kombinationen einiger dieser Allele mit der Therapieantwort auf ETN assoziiert sind. Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNP) bekannter Suszeptibilitätsgene wie des Fc $\gamma$ -Rezeptors Typ III A (*FCGR3A*, rs 396991) und der Protein-Tyrosin-Phosphatase, nicht-Rezeptor Typ 22 (*PTPN22*, rs 2476601) oder die HLA-DR-SE Allele wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer Güte als therapeutische Biomarker untersucht. Potter et al. konnten keinen Zusammenhang des SNP *PTPN22* mit dem Therapieerfolg zeigen [79]. Einige Studien wiesen eine Assoziation des SNP *FCGR3A* mit der Therapieantwort nach [84;85], wohingegen andere Untersuchungen dies nicht bestätigten [86]. Diskrepanzen ergaben sich auch bei Untersuchungen der HLA-DR-SE Allele. Während Criswell et al. eine Assoziation zwischen zwei Kopien der SE und der Therapieantwort nachwiesen [87], konnten andere Studien diese Ergebnisse nicht bestätigen [79;83;88]. Durch den Einsatz hochauflösender SNP-Arrays ist es heute möglich, GWAS durchzuführen und Zusammenhänge zwischen genetischen Loci und der Therapieantwort in großem Maßstab zu analysieren. Liu et al. konnten in einer GWAS eine Assoziation von 16 SNP mit dem Ansprechen auf die anti-TNF- $\alpha$ -Therapie zeigen [89]. In einer ähnlich angelegten Studie von Suarez-Gestal et al. konnten diese Ergebnisse allerdings nicht bestätigt werden [90].

Trotz zahlreicher Studien konnte bis zum aktuellen Zeitpunkt kein Biomarker identifiziert werden, der sicher den Erfolg einer anti-TNF- $\alpha$ -Therapie bei RA-Patienten vorhersagt und damit in der klinischen Routine – im Sinne einer personalisierten Therapie – seine Anwendung findet.

### 1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Assoziation ausgewählter klinischer, laborchemischer und genetischer Merkmale mit dem Therapieerfolg der ETN-Therapie bei RA-Patienten zu analysieren und Biomarker zu identifizieren, die das individuelle An-

sprechen auf die Therapie vorhersagen können. Weiterhin sollten Zusammenhänge ausgewählter genetischer Parameter mit der Krankheitsdisposition zur RA geprüft werden.

Erkenntnisse über die Assoziation einiger Merkmale mit dem Therapieerfolg könnten zur Optimierung der Therapie beitragen. Dadurch wäre die Möglichkeit gegeben, ein individuell zugeschnittenes, kosteneffektives Therapiemanagement zu bieten.

## 2 Patienten und Methoden

### 2.1 Patienten

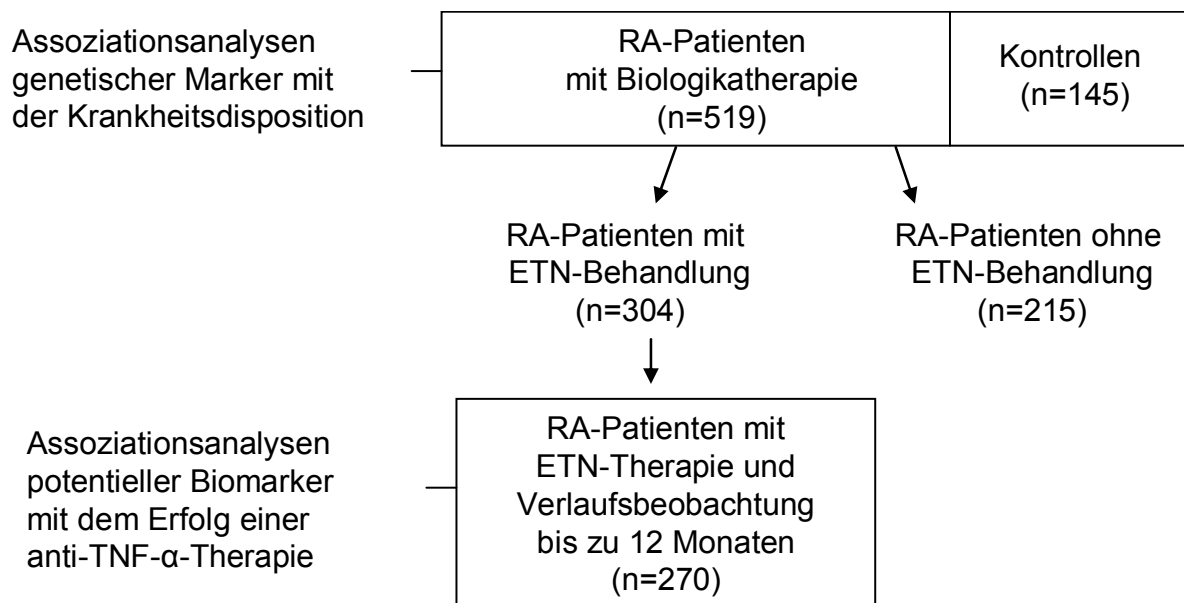
#### 2.1.1 Patienten und Kontrollen

In die retrospektive Analyse wurde ein Kollektiv von 519 RA-Patienten der Klinik für Rheumatologie Vogelsang einbezogen, deren Diagnose anhand der von Arnett et al. 1987 revidierten ACR-Kriterien gestellt wurde [2]. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung galten noch nicht die aktuellen ACR/EULAR-Klassifikationskriterien [3]. Bei der o.g. Studienpopulation handelt es sich um RA-Patienten, die zumindest zeitweilig eine Biologikatherapie erhielten und somit im Biologika-Register RABBIT gemeldet waren. Patienten mit juveniler ideopathischer Arthritis oder anderen Arthritiden wurden ausgeschlossen.

Innerhalb des Gesamtkollektivs der RA-Patienten befand sich eine Patientensubgruppe (n=304), welche im Zeitraum von 1999 bis 2008 mit ETN behandelt und deren klinischer Verlauf unter dieser Therapie bis zu zwölf Monate analysiert war. Die Therapie verlief entweder als Monotherapie oder in Kombination mit einem DMARD; im Regelfall erhielten die Patienten eine subkutane Injektion von 25 mg ETN zwei Mal wöchentlich.

Die Kontrollgruppe setzte sich aus 145 Gesunden bzw. an Polyarthrose, Fibromyalgie und Osteoporose erkrankten Patienten zusammen.

Wie in Abbildung 1 dargestellt, wurde anhand des Studienkollektivs der 519 RA-Patienten und 145 Kontrollen die Assoziation ausgewählter genetischer Marker mit der Krankheitsdisposition untersucht. Schwerpunkt der Analysen waren die 304 mit ETN behandelten RA-Patienten. Anhand dieser Studienpopulation wurde die prädiktive Aussagefähigkeit klinischer, laborchemischer und genetischen Parameter auf das Therapieverhalten der ETN behandelten Patienten geprüft. Da 34 der 304 Patienten nicht zum Kontrolltermin erschienen waren, konnte der Therapieverlauf nur für 270 Patienten vollständig verfolgt werden.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der untersuchten Kollektive**

Es wurden nur Patienten und Kontrollen kaukasischer Herkunft in die Studie einbezogen. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg genehmigt (13/08), und das schriftliche Einverständnis der Patienten lag vor.

#### 2.1.1.1 Charakterisierung der RA-Patienten und Kontrollen

Die in Tabelle 2 aufgeführte RA-Patientenpopulation bestand aus 406 weiblichen (78,2%) und 113 (21,7%) männlichen Personen. Das Verhältnis männlich : weiblich = 1 : 3,6 entsprach der in der Literatur beschriebenen Geschlechterverteilung bei der RA. In der Kontrollgruppe mit 62,1% Frauen und 37,9% Männern (bei 90 weiblichen und 55 männlichen Kontrollen) konnte trotz größtmöglicher Anpassung an die Patientengruppe nur ein Verhältnis von 1 : 1,6 (männlich : weiblich) erreicht werden. Es wurden Patienten im Alter von 25 bis 93 Jahren erfasst. Die Altersspanne der Kontrollen betrug 21 bis 95 Jahre. Das mittlere Alter der Patienten war 61 Jahre und der Kontrollen 50 Jahre. Die RA trat bei den Patienten mit durchschnittlich 44,5 Jahren auf. Bei 325 Patienten waren Angaben über eine Glukokortikoidtherapie und bei 372 Patienten über eine DMARD-Therapie vorhanden. Es erhielten 243 (74,8%) Patienten eine Glukokortikoidtherapie und 237 (63,7%) Patienten eine DMARD-Therapie.

Von diesen bekamen 55,7% MTX, 35,4% Leflunomid und 8,9% andere DMARD (Sulfasalazin, Hydroxychloroquin, Azathioprin, Ciclosporin).

**Tabelle 2: Beschreibung der Patienten**

Parameter	RA-Patienten	Kontrollen
Anzahl <i>n</i>	519	145
Alter <i>a</i> , MW ( $\pm$ SD)	60,9 ( $\pm$ 12,1)	50,0 ( $\pm$ 24,6)
Anteil Geschlecht <i>w/m</i> , %	78,2 / 21,7	62,1 / 37,9
Erkrankungsalter <i>a</i> , MW ( $\pm$ SD)	44,5 ( $\pm$ 13,3)	
Serumkonzentration der CCP-AK U/ml, MW ( $\pm$ SD) <sup>1</sup>	1011,1 ( $\pm$ 972,3)	20,3 ( $\pm$ 2,9)
Serumkonzentration des RF U/ml, MW ( $\pm$ SD) <sup>2</sup>	66,7 ( $\pm$ 50,5)	
DMARD % ( <i>n</i> )	63,7 (237)	
MTX % ( <i>n</i> )	55,7 (132)	
Leflunomid % ( <i>n</i> )	35,4 (84)	
Andere % ( <i>n</i> )	8,9 (21)	
Steroide % ( <i>n</i> )	74,8 (243)	

MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung (*standard deviation*)

<sup>1</sup> Cut-off-Wert: 25 U/ml; > 25 U/ml: positiv

<sup>2</sup> Cut-off-Wert: 20 U/ml; > 20 U/ml: positiv

### 2.1.1.2 Charakterisierung der Gruppe ETN behandelter Patienten

Insgesamt wurden 304 Patienten mit gesicherter Diagnose einer rheumatoiden Arthritis und einer Behandlung mit ETN in die Analyse einbezogen. Tabelle 3 gibt einen Überblick der Patienten-Charakteristika bezüglich Alter, Geschlecht, Erkrankungsalter, durchschnittlicher Erkrankungsdauer in Jahren bei Therapiebeginn, durchschnittlicher Serumkonzentration der CCP-AK und des RF sowie der Begleitmedikation. Der durchschnittliche *disease activity score, 28-joint count* (DAS28, siehe Kapitel 2.1.2.1) von 5,8 zeigt, dass die Krankheitsaktivität innerhalb des Patientenkollektivs zu Therapiebeginn sehr hoch war. Es gab keine signifikanten Unterschiede der Charakteristika gegenüber dem Gesamtkollektiv der Rheumapatienten. Bei 272 ETN-Patienten wurden Angaben zur begleitenden DMARD-Therapie und bei 243 zur begleitenden Glukokortikoidtherapie gemacht. 75% der ETN-Patienten bekamen bei Therapiebeginn Glukokortikoide. Etwa 60% erhielten neben der Biologikatherapie zusätzlich DMARD. Unter ihnen wurden 48,5% mit MTX, 41,8% mit Leflunomid und 9,7% mit anderen DMARD (siehe Kapitel 2.1.1.1) behandelt.

**Tabelle 3: Hauptcharakteristika der ETN-Patienten**

Parameter	RA-Patienten
<b>Anzahl <i>n</i></b>	304
<b>Alter <i>a</i>, MW (<math>\pm</math> SD)</b>	58,8 ( $\pm$ 12,0)
<b>Anteil Geschlecht <i>w/m</i>, %</b>	79,5 / 20,5
<b>Erkrankungsalter <i>a</i>, MW (<math>\pm</math> SD)</b>	44,2 ( $\pm$ 13,8)
<b>Erkrankungsdauer bei Therapiebeginn <i>a</i>, MW (<math>\pm</math> SD)</b>	10,5 ( $\pm$ 8,7)
<b>Serumkonzentration der CCP-AK U/ml, MW (<math>\pm</math> SD)<sup>1</sup></b>	997,2 ( $\pm$ 1021,1)
<b>Serumkonzentration des RF U/ml, MW (<math>\pm</math> SD)<sup>2</sup></b>	62,1 ( $\pm$ 52,8)
<b>DMARD % (<i>n</i>)</b>	60,7 (165)
<b>MTX % (<i>n</i>)</b>	48,5 (80)
<b>Leflunomid % (<i>n</i>)</b>	41,8 (69)
<b>Andere % (<i>n</i>)</b>	9,7 (16)
<b>Steroide % (<i>n</i>)</b>	75,7 (184)
<b>Ausgangs-DAS28 <i>n</i>, MW (<math>\pm</math> SD)</b>	5,8 ( $\pm$ 1,2)

<sup>1</sup> Cut-off-Wert: 25 U/ml; > 25 U/ml: positiv

<sup>2</sup> Cut-off-Wert: 20 U/ml; > 20 U/ml: positiv

### 2.1.2 Dokumentation und Auswertung der Patientendaten

Die Anamnesedaten wurden retrospektiv aus den Krankenakten der Klinik für Rheumatologie Vogelsang erhoben. Die Evaluation wurde durch eine Dokumentation mittels einheitlichem Erhebungsbogen, in Anlehnung an das Biologika-Register RABBIT, durchgeführt. Neben der Dokumentation der Medikation mit DMARD, Biologika und Glukokortikoiden war vor allem auch die Beurteilung des Krankheitszustandes von Bedeutung. Hierfür wurden mehrere klinische Parameter zur Evaluation herangezogen:

- Zahl der druckschmerzhaften Gelenke (*tender joint count*, TJC)
- Zahl der geschwollenen Gelenke (*swollen joint count*, SJC)
- Einschätzung des allgemeinen Gesundheitszustandes durch den Patienten auf einer unipolaren, numerischen Ratingskala von 0 mm (sehr gut) bis 10 mm (sehr schlecht) (*general health score*, GH)

### 2.1.2.1 Beurteilung der Krankheitsaktivität

Um die Einschätzung der Krankheitsaktivität unter standardisierten und validierten Bedingungen zu gewährleisten, wurde der DAS28 verwendet [91]. Wie in der unten stehenden Formel ersichtlich, berechnet sich der DAS28 aus den Erhebungsdaten SJC, BSG, GH, TJC. Die Anzahl schmerzhafter und geschwollener Gelenke wurde unter Einbezug von 28 definierten Gelenken (*28-joint count*, DAS28) ermittelt. Der Einzelparameter TJC hat den größten Einfluss auf den Wert des DAS28, gefolgt von der BSG (1h-Wert). Die subjektive Bewertung des Krankheitszustandes (GH) durch den Patienten hat nach dem SJC am wenigsten Gewicht.

#### Formel 1: Berechnung des DAS28

$$\text{DAS28}^1 = 0,56 \cdot \sqrt{\text{TJC28}} + 0,28 \cdot \sqrt{\text{SJC28}} + 0,70 \cdot \ln(\text{BSG}) + 0,014 \cdot \text{GH}$$

<sup>1</sup> Folgende Gelenke wurden erfasst: Schulter-, Ellenbogen-, Hand-, Fingergrund- (*MCP*), Fingermittel- (*PIP*), Daumengrund-, Daumenend- und Kniegelenk.

Der DAS28 kann Werte zwischen 0 und 10 annehmen. Dabei sind folgende Schwellenwerte von Bedeutung (siehe Tabelle 4):

**Tabelle 4: Einteilung des DAS28**

DAS28 aktuell			
DAS28 < 2,6	2,6 ≤ DAS28 < 3,2	3,2 ≤ DAS28 < 5,1	DAS28 ≥ 5,1
Remission	geringe Krankheitsaktivität	mittlere Krankheitsaktivität	hohe Krankheitsaktivität

Die Zuverlässigkeit des DAS28 zur Evaluation der Krankheitsaktivität wurde durch mehrere Studien bestätigt [91-93]. Durch die Anwendung dieses allgemein hin anerkannten validierten, standardisierten und normierten Messinstrumentes war somit die Voraussetzung gegeben, die eigenen Ergebnisse mit anderen Studien zu vergleichen.



### 2.1.2.2 Beurteilung des Therapieerfolges

Zur Wirkungskontrolle der verordneten ETN-Therapie waren die Patienten drei, sechs und zwölf Monate nach Therapiebeginn ambulant vorstellig. Die Untersuchungsergebnisse wurden in einem Erhebungsbogen dokumentiert. Zur Beurteilung des Therapieerfolges wurden die EULAR-Response-Kriterien herangezogen [94]. Diese berücksichtigen neben dem aktuellen DAS28 zusätzlich die Differenz zum Ausgangswert vor Therapiebeginn. Tabelle 5 zeigt die Einteilung der Patienten anhand der EULAR-Response-Kriterien in gute und moderate Responder sowie Therapieversager.

**Tabelle 5: EULAR-Response-Kriterien**

DAS28 aktuell	DAS28: Differenz zum Ausgangswert		
	>1,2	≤1,2 und >0,6	≤0,6
<3,2 inaktiv	Gute Response		
>3,2 und ≤5,1 mäßsig aktiv		Moderate Response	
>5,1 sehr aktiv			Keine Response

Für diese Studie wiesen die EULAR-Response-Kriterien jedoch einige methodische Nachteile auf. Patienten mit sehr hohen DAS28-Werten vor Therapiebeginn erreichen nur in Ausnahmefällen eine Abnahme des DAS28 unter den Wert 3,2, obwohl sie klinisch beachtliche Erfolge zeigen. Dieser Sachverhalt ist durch die EULAR-Response-Kriterien nicht berücksichtigt und diese Patienten werden folglich nicht in der Gruppierung einer guten Response auftauchen. Weiterhin zeigt die klinische Praxis, dass es für Patienten mit moderater Response schwierig ist, eine Verbesserung der Krankheitsaktivität von 1,2 zu erreichen. Überdies stellt die statistische Analyse mit der relativ großen Gruppe moderater Responder gegenüber den mengenmäßig geringer ausfallenden Patienten ohne bzw. mit guter Response ein weiteres Problem dar, da es sich quantitativ um sehr ungleiche Gruppen handelt. Auch im klinischen Einsatz wäre ein Modell mit einer klaren Trennung in Therapieerfolg und -versagen sinnvoller, weil dem Kliniker so die Zuordnung der Patienten einfacher gemacht wird. Um dieser Problematik gerecht zu werden, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Differenz des DAS28 nach drei Monaten zum Ausgangs-DAS28-Wert ermittelt. Aus dieser kontinuierlichen Variablen wurde anschließend ein dichotomes Merkmal gebildet, indem die Patienten mit einer Differenzänderung  $\geq 1,2$  als Respon-

der (Rs) und diejenigen  $<1,2$  als Nonresponder (NRs) eingestuft wurden (siehe Tabelle 6). Die Differenzänderung von 1,2 Punkten orientiert sich an den EULAR-Kriterien und gewährleistet für alle Patienten die gleichen Voraussetzungen, unabhängig von ihrem DAS28-Ausgangswert, als Rs klassifiziert zu werden. Als primärer Endpunkt zur Responsebestimmung wurden drei Monate gewählt, da die deutsche Gesellschaft für Rheumatologie zu diesem Zeitpunkt die Wirksamkeitsprüfung der Biologikatherapie und gegebenenfalls den Wechsel des Präparates bei fehlendem Ansprechen empfiehlt.

**Tabelle 6: Definition der Responder und Nonresponder**

Differenz des DAS28_t3** zum Ausgangs-DAS28-Wert*	
$\geq 1,2$	$< 1,2$
Responder (Rs)	Nonresponder (NRs)

\*DAS28 vor Therapiebeginn; \*\*DAS28 nach drei Monaten Therapie

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Laborchemische Parameter

Als unspezifische Entzündungsparameter wurden die BSG und die CRP-Konzentration bei den Patienten erfasst. Die BSG wurde nach einer Stunde auf der Millimeterskala des Blutsenkungsröhrchens abgelesen. Der Normwert für Frauen liegt unter 30 mm/h, bei Männern unter 20 mm/h. Der Serumspiegel des CRP wurde mittels Immunturbidimetrie festgestellt. Das Prinzip beruht auf einer Trübungszunahme der Lösung bei der Entstehung von Antigen-AK-Komplexen. Diese resultiert in einer Lichtschwächung, deren Stärke ein Maß für die Konzentration darstellt.

Als weitere Laborparameter wurden der IgG-RF und die CCP-AK zum Zeitpunkt der Therapieeinstellung in die Datenerhebung einbezogen.

Die Bestimmung der RF-Serumkonzentration erfolgte aus dem Patientenserum mittels immunturbidimetrischem Latextest (Test RF-II, Cobas-Integra 400/400 plus Gerät, Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim). Dieser auf dem Prinzip der Immunturbidimetrie beruhende Test wurde entsprechend den Herstellerinformationen durchgeführt. Dabei agglutinieren humane RF mit Latexpartikeln, die mit humanem

IgG beschichtet sind. Durch diese Bildung von Immungagregaten kommt es zur Trübungszunahme der Lösung. Der Niederschlag wird im durchfallenden Licht bei 583 nm bestimmt. Als positiv galt ein Wert von >20 U/ml.

Der Nachweis der CCP-AK erfolgte mit einem enzymgebundenen Immunosorbent-Test (*enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA), (CCP ELISA, Menarini Diagnostics, Florenz, Italien). Dieses immunologische Nachweisverfahren misst IgG-AK gegen CCP im Humanserum. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Im ersten Schritt wurden die Mikrotiterplatten, die mit synthetischen Citrullin-Peptiden (Antigen) beschichtet sind, mit jeweils 100 µl vorverdünnten (1:50) Serumproben und Standards für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die spezifischen CCP-AK binden an die Antigene auf der Mikrotiterplatte. Nicht gebundene Serumbestandteile wurden im nachfolgenden Waschverfahren entfernt. Anschließend wurden jeweils 100 µl der Konjugatlösung (anti-human-IgG, Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP)-markiert) in die Reaktionswells gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation erfolgte nochmals ein Waschzyklus, danach wurden 100 µl der Chromogen-/Substratlösung (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) hinzugegeben. Das Substrat wird bei Bindung des enzymmarkierten AK umgesetzt und es erfolgt eine Farbreaktion. Die Substratreaktion wird nach 30 Minuten mit 100 µl 0,5 molarer Schwefelsäure abgestoppt. Das Vorhandensein von CCP-spezifischen AK wird anhand der Farbentwicklung photometrisch bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen. Die Standardkurve umfasste den Bereich zwischen 25-3200 U/ml. Patienten mit Serumwerten >25 U/ml wurden als positiv und >1600 U/ml als hoch positiv klassifiziert. Die Klasseneinteilung des Wertebereichs erfolgte dabei anhand der Häufigkeiten der Messwerte, wobei die Begrenzung zwischen CCP-AK-negativen und CCP-AK-positiven Serumwerten durch den cut-off-Wert gegeben war.

## **2.2.2 Genetische Parameter**

### **2.2.2.1 Auswahl der Single-Nukleotid-Polymorphismen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf verschiedene Single-Nukleotid-Polymorphismen bezüglich ihrer Aussagefähigkeit als prädiktive Biomarker untersucht. Eine hypothesenbasierte Auswahl wurde mit den SNP *PTPN22* und *FCGR3A* getroffen. Der SNP *PTPN22* ist in der Literatur als Risikoallel für die RA vorbeschrie-

ben und der SNP *FCGR3A* wurde bereits hinsichtlich der Aussagefähigkeit als Responsemarker der anti-TNF- $\alpha$ -Therapie bei RA-Patienten untersucht (siehe Kapitel 1.1.4 und 1.2). Beide waren vielversprechende Kandidaten für weitere Untersuchungen und boten zusätzlich die Möglichkeit, die eigenen Ergebnisse in den aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisstand einzuordnen. Hypothesenunabhängig wurden die übrigen drei SNP gewählt. Die SNP Calsyntenin 2 (*CLSTN2*, rs 1026773) und Chloride Channel 1 (*CLCN1*, rs 2103193) wurden im Rahmen eines globalen Ansatzes in Form des Mapping 50K Hind 240 SNP Arrays selektiert. Hierbei handelt es sich um Voruntersuchungen der Klinik für Rheumatologie Vogelsang. Der SNP Mediator complex subunit 29 (*MED29*, rs 10414216) wurde anhand von Genexpressionsdaten der Arbeitsgruppe ausgesucht [95]. In Tabelle 7 sind die Charakteristika der SNP aufgeführt, für die eine Allel-spezifische TaqMan<sup>®</sup> Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) durchgeführt wurde.

**Tabelle 7: Übersicht über die Charakteristika der SNP für die Allel-spezifische TaqMan<sup>®</sup> PCR**

SNP	rs <sup>1</sup>	Lokalisation	Basen-tausch	AS-Austausch und Position	Referenz-sequenz <sup>2</sup>	Richtung	Reporter-Fluoreszenz-Farbstoff	ABI_Nr <sup>3</sup>
MED29	rs 10414216	Chr.19; q13 3'UTR	[C/T]		TGGAGAA[C/T] CGTGTTA	rev	VIC(C) FAM(T)	C_1309078_10
CLSTN2	rs 1026773	Chr.3; q23-24 Intron 2	[G/T]		ATTCTTA[G/T] TATCTTC	rev	VIC(G) FAM(T)	C_1867526_10
CLCN1	rs 2103193	Chr.7; q35 Intron 12	[G/A]		GTACATA[C/T] GATGCCA	rev	VIC(A) FAM(G)	C_11579998_10
FCGR3A	rs 396991	Chr.1; 1q23 Exon 4	[C/A]	V176F	CTCCCAA[C/A] AAGCCCC	fw	VIC(C) FAM(A)	C_25815666_10
PTPN22	rs 2476601	Chr.1; 1p13 Exon 14	[A/G]	R620W	CCACTGG[T/C] CTGTCT	rev	VIC(A) FAM(G)	C_16021387_20

<sup>1</sup>rs-Nummer = Referenznummer in der SNP-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Snp> [29.04.2012])

<sup>2</sup>Die Referenzsequenz bezieht sich auf die Nukleotide-Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide> [29.04.2012])

<sup>3</sup>Die ABI\_Nr verlinkt direkt zu den Details des Genotyping Assay für diesen SNP (URL: [http://www3.appliedbiosystems.com/AB\\_Home/index.htm](http://www3.appliedbiosystems.com/AB_Home/index.htm) [29.04.2012])

Chr. = Chromosom; V = Valin; F = Phenylalanin; W = Tryptophan; R = Arginin; rev = Reverse; fw = Forward; p = kurzer Chromosomenarm; q = langer Chromosomenarm

## 2.2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.2.1 DNA-Extraktion aus Vollblut

Die Blutproben wurden durch die Klinik für Rheumatologie Vogelsang zur Verfügung gestellt. Die DNA-Isolierung aus 2 ml Vollblut erfolgte gemäß den Herstellerangaben mit dem QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Midi Kit (Qiagen GmbH, Hilden). 2 ml EDTA-Blut wurden mit 200 µl Qiagen<sup>®</sup> Protease versetzt und nach Zugabe von 2,4 ml Puffer AL nochmals gut durchmischt. Während der zehnmütigen Inkubation bei 70°C wurden die Proteinstrukturen mithilfe der Protease gespalten und die DNA aus dem Zellkern freigesetzt. Anschließend wurde 2 ml unvergälltes, wasserfreies Ethanol zugesetzt und die DNA gefällt. Die Probe wurde auf eine Spinsäule gegeben und 3 Minuten bei 1850 g zentrifugiert. Die Nukleinsäuren wurden in diesem Schritt an die polare Oberfläche der Silicapartikel in der Spinsäule gebunden. Die nachfolgenden Wasch- und Zentrifugationsschritte (AW1 bei 3220 g für 2 Minuten, AW2 bei 3220 g für 25 Minuten) mit je 2 ml Puffer AW1 und AW2 bewirkten die Abtrennung der niedermolekularen Proteinbestandteile und Lipide von der Silicasäule. Am Ende wurde die DNA mit 300 µl Puffer AE im Zentrifugationsschritt (10 Minuten bei 3220 g) von der Säule eluiert.

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgte mittels Spektralphotometer (UV-Spectrophotometer, Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Uppsala). Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Abnahme der Lichtintensität eines monochromatischen Lichtstrahles, der durch eine Lösung definierter Dicke führt, indirekt proportional zur Konzentration der gelösten Substanz:

#### **Formel 2: Berechnung der Extinktion $E_\lambda$**

$$E_\lambda = -\lg\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot d$$

$I_1$ : Intensität des transmittierten Lichtes

$I_0$ : Intensität des einfallenden (eingestrahnten) Lichtes

$c$ : Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit, Einheit: [mol·l<sup>-1</sup>]

$\epsilon_\lambda$ : dekadischer molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$ , Einheit: [l·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>]

$d$ : Weglänge des Lichtes im Material, Einheit: [cm]

$E_\lambda$ : Extinktion (Absorbans des Materials für Licht der Wellenlänge  $\lambda$ )

Die Extinktion durch die DNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 0,5 cm ermittelt. Durch Umformung der obigen Gleichung kann die DNA-Konzentration wie folgt berechnet werden:

### Formel 3: Berechnung der DNA-Konzentration

$$c(DNA) = \frac{E_{\lambda}}{\varepsilon_{\lambda} \times d} \times M_{\lambda}$$

$c(DNA)$ : Konzentration der DNA in Lösung [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]

$E_{\lambda}$ : gemessene Extinktion

$d$ : Schichtdicke der Küvette [cm]

$\varepsilon_{\lambda}$ : molarer Extinktionskoeffizient (empirisch ermittelt und substanzspezifisch) [ $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ]

$M_{\lambda}$ : mittlere molare Masse der DNA [ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]

Um die gewünschte Einheit von  $\mu\text{g}/\text{ml}$  zu erhalten, wurden die molare Masse und der Faktor 1000 in die Formel integriert.

Der Reinheitsgrad der DNA wird durch das Verhältnis der Extinktion  $E_{260}/E_{280}$  bestimmt, da DNA bei einer Wellenlänge von 280 nm und Proteine bei einer Wellenlänge von 260 nm substanzspezifisch absorbieren. Der Wert sollte zwischen 1,8-2,1 liegen.

#### 2.2.2.2.2 Genotypisierung

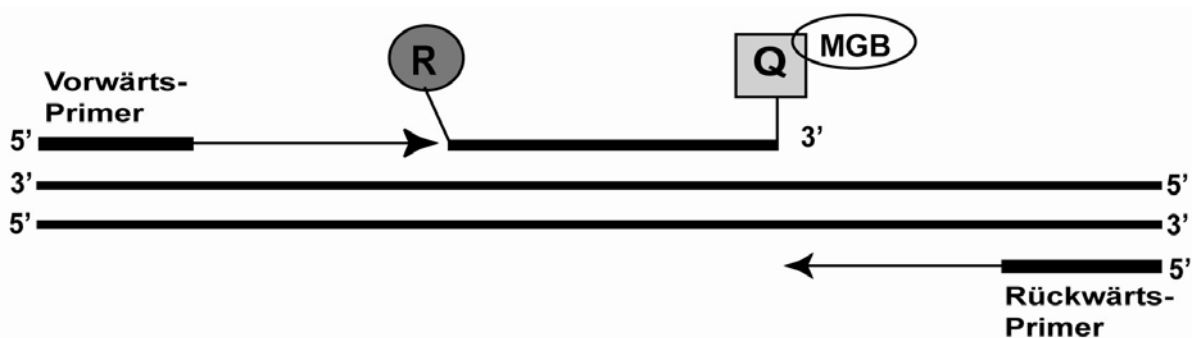
Die Genotypenanalyse der fünf SNP erfolgte in einem PCR basierten Verfahren unter Einsatz sequenzspezifischer Sonden nach dem TaqMan<sup>®</sup>-Prinzip.

##### 2.2.2.2.1 Allel-spezifische TaqMan<sup>®</sup> PCR

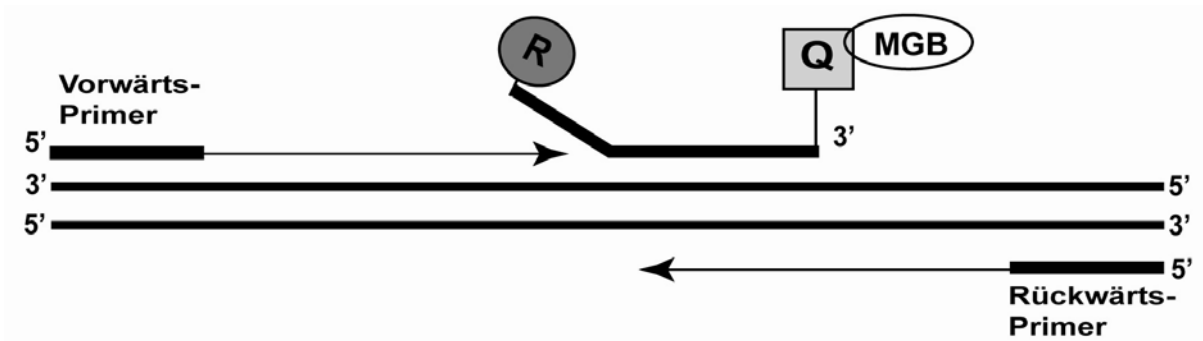
Die Allel-spezifische TaqMan<sup>®</sup> PCR beruht auf dem von Mullis u. Faloona [96] beschriebenen Verfahren der PCR. Sie wurde entwickelt, um Nukleinsäuresequenzen aus einem ganzen Genom vervielfältigen zu können. Das Prinzip beruht auf einer enzymatisch, exponentiell verlaufenden in vitro Methode bei der die gewünschte Zielsequenz durch immer wiederkehrende Zyklen aus drei Schritten amplifiziert wird. Dieses Verfahren wurde im Laufe der Zeit weiterentwickelt und optimiert. Für diese Arbeit wurde der 1993 von Lee et al. [97] entwickelte TaqMan<sup>®</sup> PCR Assay eingesetzt.

Um eine Differenzierung der Allele und die Identifikation von SNP zu ermöglichen, wurde ein TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assay verwendet. Dieser besteht aus zwei locus-spezifischen PCR Primern, die den zu untersuchenden SNP flankieren, und zwei Allel-spezifischen Oligonukleotid TaqMan<sup>®</sup>-Sonden. Jedem Allel wurde ein Fluoreszenzfarbstoff mit individueller Emissionswellenlänge zugeordnet (Multiplex-PCR-Methode). Diese Reporter-Fluoreszenzfarbstoffe (VIC für Allel 1 oder FAM für Allel 2) markieren das 5'-Ende der TaqMan<sup>®</sup>-Sonden. Die Fluoreszenzemission dieser Reporter-Fluoreszenzfarbstoffe wird bei intakter Sonde mittels strahlungsfreier Energieübertragung (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET) durch einen am 3'-Ende befindlichen Quencher unterdrückt. Während eines PCR-Zyklus kommt es zur sequenzspezifischen Hybridisierung zwischen Sonde und Template (siehe Abbildung 2, Punkt 1). In der Extensionsphase wird die Sonde mittels einer 5'-3'-Exonuklease-Funktion der Ampli Taq<sup>®</sup> DNA Polymerase hydrolysiert. Dies hat zur Folge, dass die räumliche Nähe zwischen Quencher und Reporterfarbstoff aufgehoben und die Fluoreszenzstrahlung freigesetzt wird (siehe Abbildung 2, Punkt 2-4). Bei jedem PCR-Zyklus wird dieser Vorgang wiederholt und das Fluoreszenzsignal nimmt exponentiell zu. Um störende Fluktuationen der Fluoreszenz auszugleichen, wird dem Reaktionspuffer ein passiver Referenzfarbstoff ROX zugesetzt. Zur Verbesserung der Sondenstabilität befindet sich zusätzlich am 3'-Ende ein *minor groove binder* (MGB). Dieser erhöht die Schmelztemperatur und ermöglicht somit das Design von kürzeren Proben [98].

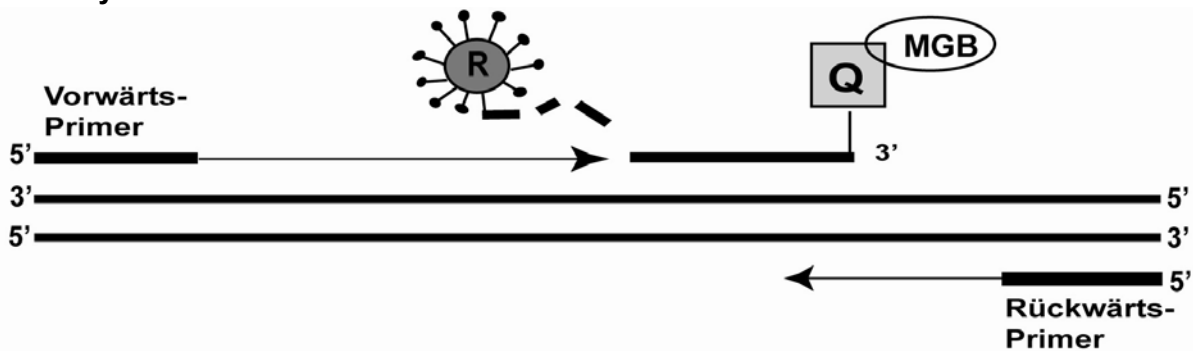
### 1. Sequenzspezifische Anlagerung der PCR-Primer und der TaqMan<sup>®</sup>-Sonde



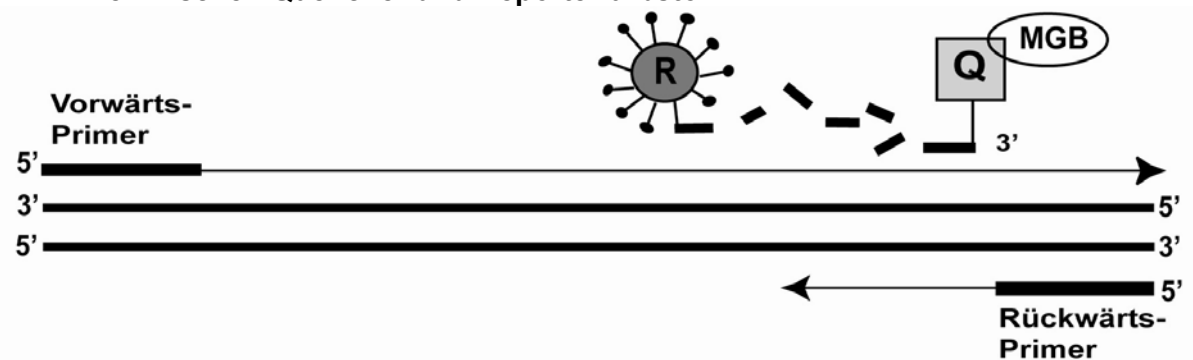
## 2. Primer-Extension und Sondenverdrängung



## 3. Sondenhydrolyse mittels 5'-3'-Exonuklease-Funktion der Ampli Taq<sup>®</sup> DNA Polymerase



## 4. Vollständige Synthese des PCR-Produktes und Aufhebung der räumlichen Nähe zwischen Quencher und Reporterfarbstoff



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der TaqMan<sup>®</sup> PCR**

R = Reporter; Q = Quencher; MGB = minor groove binder;  
(in Anlehnung an: <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html>[22.04.2012])



#### 2.2.2.2.2 TaqMan®-Reaktionsansatz

Der Reaktionsansatz für den TaqMan® PCR Assay umfasste ein Volumen von 5 µl. Die Bestandteile sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

**Tabelle 8: Reaktionsansatz für einen TaqMan® PCR Assay mit Allel-Diskriminierung**

Menge	Bestandteil
2 µl	mit Aqua bidest. verdünnte (1:10) genomische DNA
0,25 µl 20-fach konzentriert	spezifisches Primerpaar und fluorogene Sonden
0,25 µl	Aqua bidest.
2,5 µl 2-fach konzentriert	Master Mix

Alle Primer und Sonden für die SNP-Analyse wurden von der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) synthetisiert und als eingefrorenes gebrauchsfertiges Gemisch geliefert (Assays-on-Demand™). Um eine bestmögliche Reproduzierbarkeit sicherzustellen, wurde der Taq Man® Universal PCR Master Mix der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) verwendet. Dieser beinhaltet mehrere Reaktionskomponenten und reduziert damit die Pipettierschritte auf ein Minimum. Er enthält PCR-Puffer, Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>), Desoxyribonukleosidtriphosphate (*desoxyribonukleosidtriphosphate*, dNTPs), Desoxyuridintriphosphate (*desoxyuridintriphosphate*, dUTPs), den passiven Referenzfarbstoff ROX sowie eine modifizierte Form der rekombinanten AmpliTaq® DNA Polymerase, AmpliTaq Gold®.

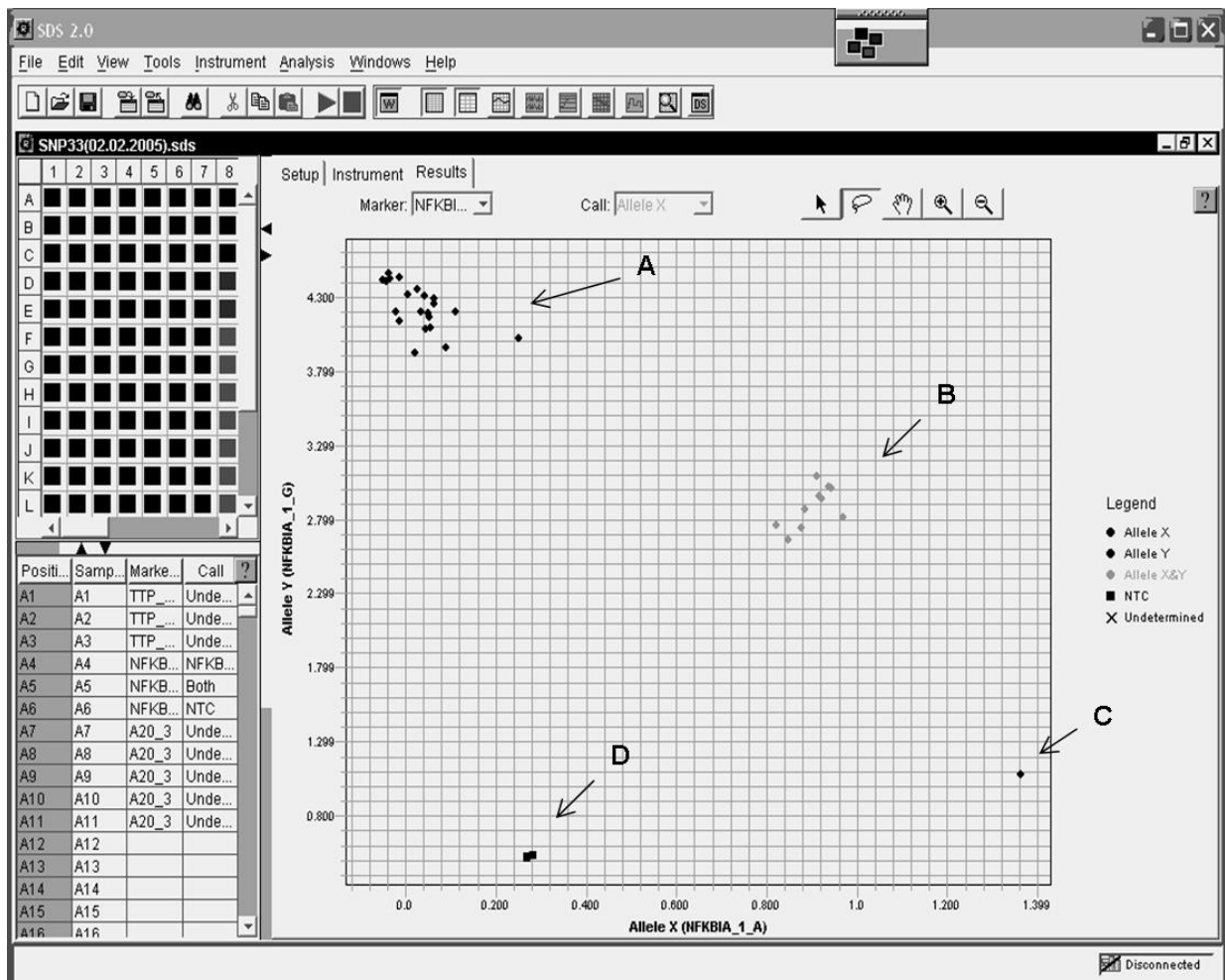
Die fertigen Reaktionsansätze wurden in 384 *well*-Platten pipettiert. Bei einem TaqMan® PCR-Ansatz wurden parallel 100 Probanden analysiert. Zusätzlich wurden pro Ansatz drei Wasserkontrollen mitgeführt (*no template control*, NTC). Zur Kontaminationsprophylaxe wurden die Pipettierschritte unter einer Laminar-Airflow-Werkbank und sterilen, DNasefreien Einwegmaterialien durchgeführt. Als interne Prüfung der Analyseergebnisse auf Genauigkeit und Reproduzierbarkeit wurden typisierte Kontrollen jedem Lauf beigefügt. Der fertige Ansatz wurde zum Kontaminations- und Verdunstungsschutz mit einer transparenten Folie (*optical adhesive film*) versiegelt. Um die Bildung isolierter Tropfen am Gefäßrand zu verhindern, wurden die Mikrotiterplatten kurz zentrifugiert. Es folgte die Durchführung der PCR im ABI PRISM® 7900HT. Bei dem TaqMan® PCR Assay wurde folgendes Thermoprofil angewendet:

**Tabelle 9: Thermoprofil des TaqMan<sup>®</sup> PCR Assays**

	<b>einleitende Denaturierung</b>	<b>Denaturierung</b>	<b>Annealing/Extension</b>
<b>Zeit und Temperatur</b>	10 min 95°C	15 sec 92°C	1 min 60°C
	initialer Schritt	40 Zyklen	

Vor Beginn der sich wiederholenden Zyklen wurde als initialer Schritt eine einleitende Denaturierung über 10 Minuten durchgeführt. Da Annealing- und Extensionsphase in einem Schritt zusammengefasst wurden, handelte es sich bei dem angewendeten Profil um eine Zwei-Schritt-PCR. So konnten hohe Temperaturen während der Extensionsphase umgangen und eine bessere Stabilität der TaqMan<sup>®</sup>-Sonden gewährleistet werden. In der Annealing-/Extensionsphase lagerten sich die sequenzspezifischen Primer und TaqMan<sup>®</sup>-Sonden an die DNA an. Die Ampli Taq<sup>®</sup> DNA Polymerase konnte somit die Nukleotide an die Primersequenzen anfügen und die Neusynthese der komplementären Stränge sicherstellen. Eine vollständige TaqMan<sup>®</sup> PCR dauerte 90 Minuten.

Die Fluoreszenzemissionen wurden mithilfe des ABI PRISM<sup>®</sup> 7900HT *sequence detection system* (SDS), Applied Biosystems, USA im geschlossenen Reaktionsgefäß für jeden Zyklus erfasst und ermöglichten die Kontrolle der PCR-Reaktion. Die Allel-Diskriminierung erfolgte in einem Post-PCR-read als Endpunktbestimmung. Die Berechnung der Genotypen wurde mittels SDS Software 2.1 durchgeführt. Folgende Abbildung gibt ein Beispiel, wie die Allel-Diskriminierung mittels SDS Software 2.1 dargestellt wurde.



**Abbildung 3: Darstellung der Allel-Diskriminierung mittels SDS Software 2.1**

Dargestellt ist das Ergebnis einer Genotypisierung. Die verschiedenen Punktwolken entsprechen den drei möglichen Genotypen. Pfeil A: Homozygotie für Allel 1; Pfeil B: Heterozygotie für Allel 1 und Allel 2; Pfeil C: Homozygotie für Allel 2; Pfeil D: Wasserkontrolle

### 2.2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte via Statistik- und Analyse-Software SPSS<sup>®</sup> Version 15 (SPSS Inc., Chicago, USA) für Windows<sup>®</sup> in Kooperation mit dem Institut für Biometrie und medizinische Informatik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. Stetige Merkmale wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung und in einigen Fällen mit Minimal- und Maximalwert angegeben. Zur Ermittlung von Mittelwertsunterschieden von mehr als zwei Gruppen und ihrer Signifikanzprüfung wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) verwendet. Bei signifikanten Ergebnissen folgte eine post-hoc-Analyse nach Tukey. Die diskreten Merkmale wurden als absolute Zahl oder Prozentanteil angegeben. Zu-

sammenhänge wurden mittels Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ -Test) nach Pearson geprüft. Zusätzlich ist eine logistische Regression und eine Diskriminanzanalyse durchgeführt worden. Als Signifikanzniveau für alle Tests wurde der Wert 0,05 gewählt, da das Ziel der Untersuchung eine Hypothesenfindung darstellt. Um die Verteilung der Genotypen aller SNP nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) zu prüfen, wurde der Chi-Quadrat-Test angewendet. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der im Internet erhältlichen Software von Wienker und Strom (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Analyse des RA-Gesamtkollektivs und der Kontrollpopulation

Die Allel- und Genotypenverteilung von fünf SNP wurde anhand des Gesamtkollektivs der 519 RA-Patienten und der 145 Kontrollen untersucht. Die Genotypisierungsergebnisse wurden auf Abweichungen vom HWG geprüft. Als zusätzliche Kontrolle wurde die Genotypenverteilung mit dem Referenz-Genom HapMap sowie mit veröffentlichten Studien verglichen.

##### 3.1.1 Auswertung der Genotypenanalyse

Tabelle 10 gibt einen Überblick über die Verteilung der Genotypen und der Allelhäufigkeiten in der Gesamtkohorte aller RA-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusätzlich wurde die Genotypenverteilung isoliert für CCP-AK-positive RA-Patienten betrachtet.

**Tabelle 10: Genotypenverteilung und Allelhäufigkeiten bei RA-Patienten und Kontrollen**

SNP	$\Sigma$	Genotypen % (n)			p	Allelfrequenz %	
<b>MED29</b>		<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>		<b>C</b>	<b>T</b>
<i>RA-Patienten</i>	494	45,8 (226)	44,5 (220)	9,7 (48)	0,511	68,0	32,0
<i>RA_CCPp</i>	242	44,2 (107)	45,0 (109)	10,7 (26)	0,579	66,7	33,2
<i>Kontrollen</i>	142	41,5 (59)	50,0 (71)	8,5 (12)		66,5	33,5
<b>CLSTN2</b>		<b>TT</b>	<b>TG</b>	<b>GG</b>		<b>T</b>	<b>G</b>
<i>RA-Patienten</i>	431	26,0 (112)	51,0 (220)	23,0 (99)	0,454	51,5	48,5
<i>RA_CCPp</i>	232	26,3 (61)	50,4 (117)	23,3 (54)	0,567	51,5	48,5
<i>Kontrollen</i>	106	26,4 (28)	45,3 (48)	28,3 (30)		49,1	50,9
<b>CLCN1</b>		<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>		<b>C</b>	<b>T</b>
<i>RA-Patienten</i>	432	33,3 (144)	50,0 (216)	16,7 (72)	0,788	58,3	41,7
<i>RA_CCPp</i>	234	32,1 (75)	51,3 (120)	16,7 (39)	0,919	57,7	42,3
<i>Kontrollen</i>	104	29,8 (31)	52,9 (55)	17,3 (18)		56,2	43,8
<b>FCGR3A</b>		<b>AA</b>	<b>AC</b>	<b>CC</b>		<b>A</b>	<b>C</b>
<i>RA-Patienten</i>	424	30,9 (131)	55,2 (234)	13,9 (59)	0,947	58,5	41,5
<i>RA_CCPp</i>	235	28,1 (66)	55,3 (130)	16,6 (39)	0,735	55,7	44,3
<i>Kontrollen</i>	103	32,0 (33)	53,4 (55)	14,6 (15)		58,7	41,3
<b>PTPN22</b>		<b>GG</b>	<b>GA</b>	<b>AA</b>		<b>G</b>	<b>A</b>
<i>RA-Patienten</i>	443	68,2 (302)	28,9 (128)	2,9 (13)	0,194	82,6	17,4
<i>RA_CCPp</i>	237	66,2 (157)	31,6 (75)	2,1 (5)	0,098	82,1	17,9
<i>Kontrollen</i>	116	76,7 (89)	20,7 (24)	2,6 (3)		87,1	12,9

p = Ergebnis des Chi Quadrat Tests ( $\chi^2$ -Test) bezieht sich auf den Vergleich der Genotypenhäufigkeiten zwischen RA-Patienten und Kontrollen; RA\_CCPp = CCP-AK-positive Patienten

Die Genotypenverteilung der untersuchten SNP wies einige Abweichungen zwischen RA-Patienten und Kontrollen auf. Eine Überprüfung mit dem Chi-Quadrat-Test zeigte keinen statistischen Unterschied zwischen den untersuchten Studienpopulationen.

Es zeigte sich jedoch ein Trend zur statistischen Signifikanz bei der Assoziationsanalyse des SNP *PTPN22* zwischen CCP-AK-positiven Patienten und Kontrollen (siehe Tabelle 10): bei den CCP-AK-positiven RA-Patienten trat das seltenere Allel A mit 17,9% vs 12,9% in der Kontrollgruppe häufiger auf. Anteilig war der heterozygote Genotyp GA mit 31,6% bei den CCP-AK-positiven Patienten (vs 28,9% im Gesamtkollektiv und 20,7% bei den Kontrollen) stärker vertreten.

Auch bei Analyse der *FCRG3A*-genotypisierten Probanden deutete sich eine abweichende Genotypenverteilung mit anteilig häufigerem Auftreten des homozygoten Genotyps CC im Kollektiv der CCP-AK-positiven Patienten an (16,6% bei den CCP-AK-positiven RA-Patienten vs 13,9% im Gesamtkollektiv und 14,6 bei den Kontrollen). Es ließ sich jedoch kein Trend zur statistischen Signifikanz abzeichnen.

### **3.1.2 Testung der Genotypen auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht**

Befindet sich eine Population im HWG, so besagt dies, dass die Häufigkeiten des heterozygoten und der homozygoten Genotypen über die Generationen hinweg konstant bleiben. Eine Genotypenverteilung der Kontrollpopulation gemäß dem HWG gilt als Voraussetzung für Assoziationsanalysen genetischer Fall-Kontroll-Studien [99]. Die Genotypisierungsergebnisse der untersuchten Kontrollen ergaben hinsichtlich aller SNP eine Verteilung gemäß dem HWG. Die Patientenpopulation befand sich hinsichtlich des SNP *FCGR3A* nicht im HWG ( $p=0,005$ ). Ursächlich für diese Abweichung ist wahrscheinlich eine Spontanmutation, die der Selektion unterworfen wurde. Da diese mutante Variante kausalen Einfluss auf die Erkrankung haben könnte, ist eine Verteilung entgegen des HWG bei der kranken Studienpopulation möglich und erlaubte die Durchführung weiterer populationsgenetischer Analysen.

## 3.2 Assoziation der Merkmale mit dem Erfolg der anti-TNF- $\alpha$ -Therapie – Analyse des ETN-Patientenkollektivs

Für die nachfolgend aufgeführten Untersuchungen wurden nur die ETN-Patienten in den Subgruppen Responder und Nonresponder analysiert. Wie in Kapitel 2.1.2.2 erläutert, wurde als Therapieerfolg – orientiert an den EULAR-Response-Kriterien – eine Differenz des DAS28-Wertes von 1,2 Punkten nach drei Monaten definiert. Unter den ETN behandelten Patienten zeigten nach drei Monaten 194 (71,9%) einen Therapieerfolg, wohingegen bei 76 (28,1%) Personen kein Therapieansprechen beobachtet werden konnte. Ob es geeignete Merkmale gibt, die zur Differenzierung zwischen NRs und Rs beitragen, wurde zuerst für die einzelnen Parameter mittels univariater Analyse geprüft. Anschließend wurden die signifikanten Merkmale kombiniert und deren Assoziation mit dem Therapieverhalten untersucht. Zusätzlich wurde eine multivariate Analyse durchgeführt.

### 3.2.1 Untersuchung der einzelnen klinischen Parameter

Für die Untersuchung der Assoziation klinischer Merkmale vor Therapiebeginn mit dem Ansprechen auf ETN standen für die retrospektive Analyse Daten von 270 Patienten zur Verfügung. Die erfassten Parameter sind in Tabelle 11 dargestellt. Erkrankungsalter, Geschlecht und das Alter der Patienten zeigten keine Assoziation zum Therapieerfolg. Es konnten unterschiedliche Tendenzen bei Rs und NRs hinsichtlich der Krankheitsaktivität (DAS28) festgestellt werden. Die NRs – die definitionsgemäß keine Verbesserung der Krankheitsaktivität von mindestens 1,2 erreichten – zeigten durchschnittlich niedrigere Mittelwerte des Ausgangs-DAS28-Wertes gegenüber den Rs – deren Krankheitsaktivität nach drei Monaten stärker zurückging. Das Ergebnis erwies sich als hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Bei Betrachtung der einzelnen Komponenten des DAS28, konnten Signifikanzen für die klinischen Einzelparameter VAS, TJC und SJC nachgewiesen werden (siehe Tabelle 11).

**Tabelle 11: Ergebnisse der univariaten Analyse klinischer Parameter mittels Chi-Quadrat-Test bzw. Mittelwertsvergleich**

	NRs 28,1 (76)**		Rs 71,9 (194)**		Σ	p	RR für NRs (95%KI)
Erkrankungsalter *	44,9 ± 12,8 (75)		44,6 ± 13,6 (184)		259	0,773	
Alter *	58,5 ± 11,6 (71)		59,3 ± 11,8 (178)		249	0,816	
Geschlecht** w vs m	28,6 (61)	26,3 (15)	71,4 (152)	73,7 (42)	270	0,754	1,1 (0,7-1,8) <sup>ns</sup>
Ausgangs-DAS28*	5,1 ± 1,2 (76)		6,1 ± 1,2 (194)		270	0,000	
Sjc_t0*	6,2 ± 5,4 (76)		10,3 ± 6,4 (194)		270	0,000	
Tjc_t0*	6,7 ± 6,0 (76)		10,8 ± 7,0 (194)		270	0,000	
Vas_t0*	57,6 ± 21,5 (76)		66,8 ± 20,5 (194)		270	0,006	
Bsg_t0*	40,2 ± 28,8 (76)		48,0 ± 29,1 (194)		270	0,080	

p = Ergebnis der Varianzanalyse bzw. des Chi Quadrat Tests ( $\chi^2$ -Test); NRs = Nonresponder; Rs = Responder; \* MW±SD (n) ; \*\* % (n) ; <sup>ns</sup> nicht signifikant ; RR = relatives Risiko

### 3.2.2 Untersuchung der laborchemischen Parameter in Abhängigkeit des Therapieerfolges

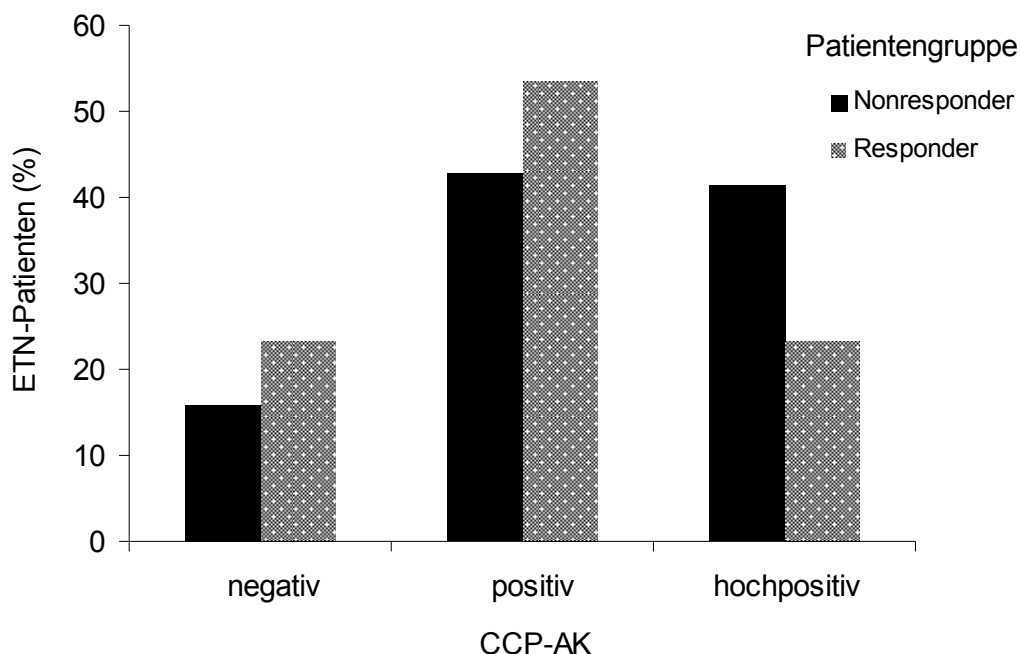
Es wurden die laborchemischen Parameter RF und CCP-AK untersucht. Es konnte eine Assoziation zwischen schlechtem Therapieansprechen und dem CCP-AK-Spiegel als signifikant nachgewiesen werden. Wie in Tabelle 12 dargestellt, stellte sich bei der statistischen Analyse der ETN-Patienten mittels Varianzanalyse ANOVA eine signifikante Abweichung der CCP-AK-Spiegel zwischen NRs und Rs heraus. So lagen durchschnittlich höhere Mittelwerte der CCP-AK bei den NRs vor ( $p=0,035$ ). Anhand der Klassifikation der Patienten in einen negativen, positiven und hoch positiven CCP-AK-Status konnte ein signifikanter Zusammenhang mit dem Therapieverhalten festgestellt werden ( $p=0,026$ ). Bei Therapieversagern wurden signifikant häufiger hoch positive CCP-AK-Spiegel nachgewiesen als bei Therapierespondern (41,3% vs 23,2%). Diese Ergebnisse sind in Tabelle 12 und Abbildung 4 dargestellt. Der RF-Spiegel zeigte keine Assoziation mit dem Therapieverhalten. Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Zusammenhang zwischen RF-positivem AK-Status und Therapieversagen ( $p=0,015$ ). Da jedoch bei einem hohen Patientenanteil keine Daten über den RF-Status vorlagen, die CCP-AK den stärkeren Marker ausmachen und eine hohe Übereinstimmung zwischen RF- und CCP-AK-Seropositivität besteht, wurde der RF in nachfolgende Analysen nicht mehr gesondert einbezogen.



**Tabelle 12: Ergebnisse der univariaten Analyse laborchemischer Parameter mittels Chi-Quadrat-Test bzw. Mittelwertsvergleich**

	NRs 28,1 (76)**	Rs 71,9 (194)**	Σ	p	RR für NRs (95%KI)
RF (U/ml)*	63,3 ± 38,9 (48)	61,7 ± 60,2 (101)	149	0,331	
RF+ vs RF-**	38,0 (41) 17,1 (7)	62,0 (67) 82,9 (34)	149	0,015	2,2 (1,1-5,0)
CCP-AK (U/ml)*	1234,0 ± 1083,9 (63)	920,0 ± 997,7 (155)	218	0,035	
CCP**					
negativ (≤25 U/ml)	15,9 (10)	23,2 (36)	218	0,026	
positiv (>25 U/ml)	42,9 (27)	53,5 (83)			
hoch positiv (>1600 U/ml)	41,3 (26)	23,2 (36)			

p = Ergebnis der Varianzanalyse bzw. des Chi Quadrat Tests ( $\chi^2$ -Test); NRs = Nonresponder; Rs = Responder; \* MW±SD (n) ; \*\* % (n) ; <sup>ns</sup> nicht signifikant ; RR = relatives Risiko



**Abbildung 4: Verteilung der CCP-AK bei Respondern und Nonrespondern**

### 3.2.3 Untersuchung der genetischen Parameter in Abhängigkeit des Therapieerfolges

Für die fünf Single-Nukleotid-Polymorphismen *CLSTN2*, *CLCN1*, *PTPN22*, *MED29* und *FCGR3A* wurde geprüft, ob zwischen NRs und Rs ein Unterschied hinsichtlich der Genotypenhäufigkeit vorliegt. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die SNP in Abhängigkeit vom CCP-AK-Status eine unterschiedliche Genotypenverteilung bei Rs und NRs aufweisen. Zusätzlich konnten ca 2/3 der ETN-Patienten über einen Zeit-

raum von einem Jahr beobachtet werden und somit die Therapie auch im längerfristigen Verlauf analysiert werden.

### 3.2.3.1 Assoziationsanalysen der Single-Nukleotid-Polymorphismen mit dem Therapieerfolg

Es wurden Assoziationsanalysen der SNP *CLSTN2*, *CLCN1*, *PTPN22*, *MED29* und *FCGR3A* mit der Therapieantwort durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

**Tabelle 13: Ergebnisse der univariaten Analyse genetischer Parameter mittels Chi-Quadrat-Test**

	NRs 28,1 (76)**	Rs 71,9 (194)**	Σ	p	RR für NRs (95%KI)
<u>MED29</u> **					
CC	54,9 (39)	40,1 (75)	258	0,032	1,5 (1,02-2,3)
CT+TT	45,1 (32)	59,9 (112)			
<u>CLSTN2</u> **					
TT	27,7 (18)	25,8 (47)	247	0,769	1,1 (0,7-1,7) <sup>ns</sup>
TG+GG	72,3 (47)	74,2 (135)			
<u>CLCN1</u> **					
GG	28,1 (18)	37,0 (67)	245	0,199	0,7 (0,5-1,2) <sup>ns</sup>
GA+AA	71,9 (46)	63,0 (114)			
<u>FCGR3A</u> **					
AA	34,3 (23)	30,2 (55)	249	0,535	1,2 (0,8-1,8) <sup>ns</sup>
AC+CC	65,7 (44)	69,8 (127)			
<u>PTPN22</u> **					
GA+AA	44,9 (31)	28,8 (53)	253	0,015	1,6 (1,1-2,5)
GG	55,1 (38)	71,2 (131)			

p = Ergebnis des Chi Quadrat Tests ( $\chi^2$ -Test); NRs = Nonresponder; Rs = Responder; \*\* % (n);  
<sup>ns</sup> nicht signifikant; RR = relatives Risiko; zur Berechnung der relativen Risiken wurden die mutierten Allele gegenüber dem Wildtyp betrachtet

Signifikante Ergebnisse ergaben sich für die SNP *MED29* und *PTPN22*. Hinsichtlich der drei SNP *CLSTN2*, *CLCN1* und *FCGR3A* konnte keine signifikant differierende Genotypenverteilung bei Rs und NRs festgestellt werden.

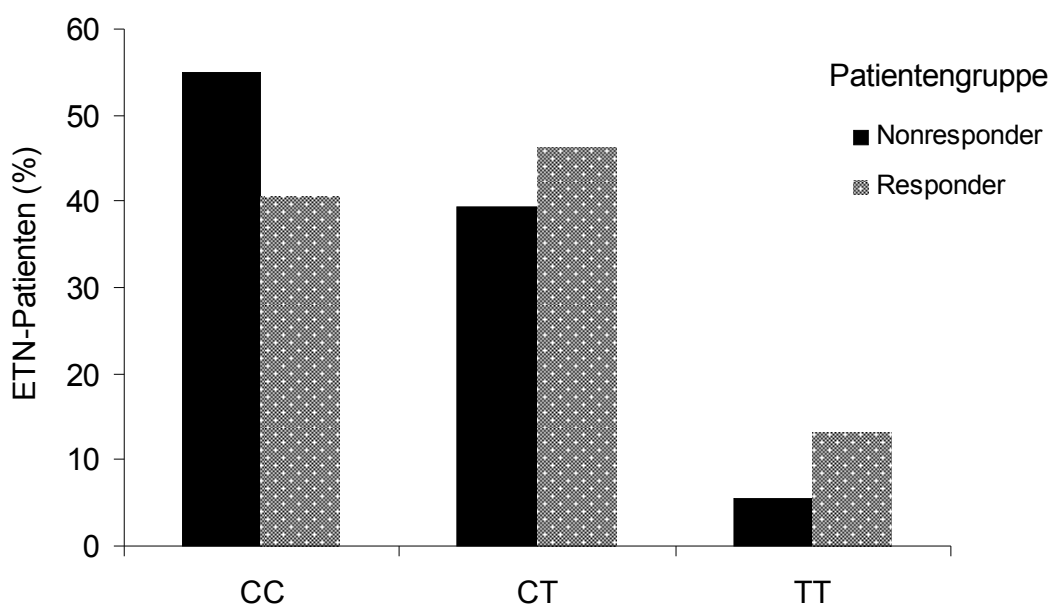
Wie in Tabelle 14 ersichtlich, zeigte sich, dass der Anteil der *MED29* CC-Träger bei den NRs größer als bei den Rs war (54,9% NRs vs 40,1% Rs). *MED29* TT-Träger waren bei den Rs anteilig häufiger vertreten (5,6% NRs vs 13,4% Rs). Abbildung 5 stellt die Genotypenverteilung im Balkendiagramm dar. Da sich eine Tendenz zur Signifikanz andeutete (p=0,061) und es sich bei den TT-Trägern um eine fallzahlmäßig sehr kleine Gruppe handelte, wurde geprüft, ob Träger des häufigeren CC-Genotyps ein höheres relatives Risiko (RR) für ein Therapieversagen gegenüber T-

Allel-Trägern haben. Die Analyse ergab, dass ein signifikanter Unterschied ( $p=0,032$ ) hinsichtlich der Genotypenverteilung bestand und Genotyp CC-Träger ein 1,5-fach (95% Konfidenzintervall (KI): 1,02-2,3) erhöhtes RR eines fehlenden Ansprechens auf die Therapie besitzen (siehe oben stehende Tabelle 13).

**Tabelle 14: Genotypenhäufigkeiten des SNP MED29 bei Respondern und Nonrespondern**

	Genotypen % (n)			$\Sigma$	FG	Test	p
	CC	CT	TT				
<b>NRs</b>	54,9 (39)	39,4 (28)	5,6 (4)	258	2	$\chi^2$ -Test	0,061
<b>Rs</b>	40,1 (75)	46,5 (87)	13,4 (25)				

FG = Freiheitsgrad; p = Ergebnis des Chi Quadrat Tests ( $\chi^2$ -Test); NRs = Nonresponder, Rs = Responder



**Abbildung 5: Genotypenverteilung des SNP MED29 bei Respondern und Nonrespondern**

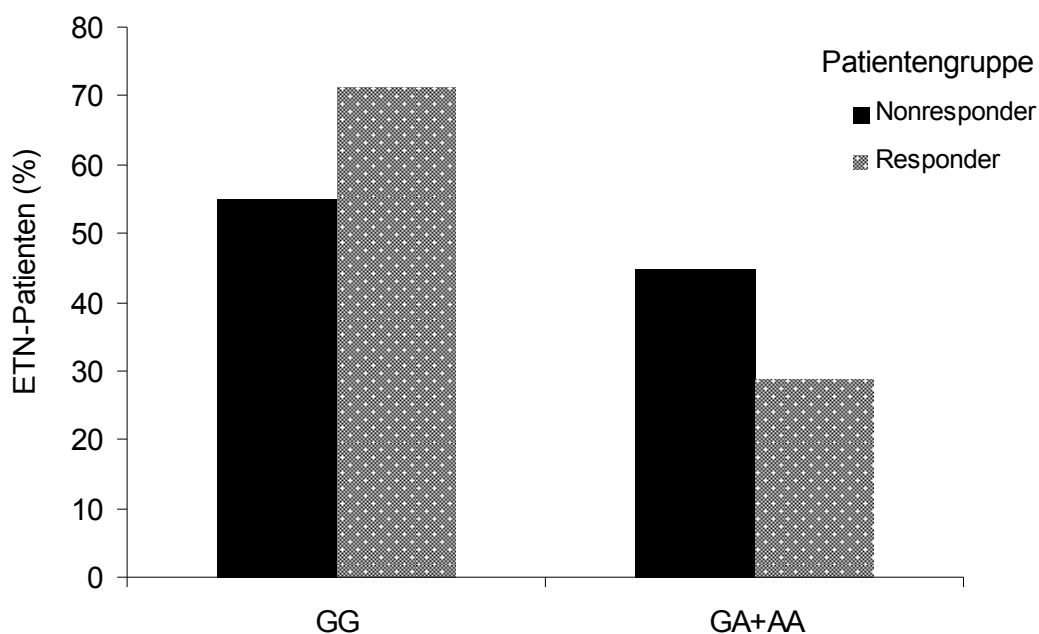
Tabelle 15 zeigt den Vergleich der Genotypenverteilung zwischen NRs und Rs hinsichtlich des SNP *PTPN22*. Daraus wird ersichtlich, dass der Genotyp GG bei den Rs signifikant häufiger auftritt (71,2% Rs vs 55,1% NRs). Der Anteil des homozygoten Genotyps AA war bei den NRs etwa doppelt so hoch (1,6% Rs vs 2,9% NRs). Da der homozygote Genotyp in der kaukasischen Population selten vorkommt und die Fallzahlen sehr gering (<5) ausfielen, wurde anschließend das Therapieergebnis des

A-Allels bezüglich des homozygoten Genotyps GG untersucht. Bei dieser Assoziationsprüfung wurden noch signifikantere Ergebnisse erzielt ( $p=0,015$ , siehe Tabelle 13 und Abbildung 6). Patienten, die das A-Allel tragen, zeigten ein 1,6-fach höheres RR für NRs gegenüber Patienten mit dem Genotyp GG (95% KI: 1,1-2,5).

**Tabelle 15: Genotypenhäufigkeiten des SNP PTPN22 bei Respondern und Nonrespondern**

	Genotypen % (n)			$\Sigma$	FG	Test	p
	GG	GA	AA				
<b>NRs</b>	55,1 (38)	42,0 (29)	2,9 (2)	253	2	$\chi^2$ -Test	0,043
<b>Rs</b>	71,2 (131)	27,2 (50)	1,6 (3)				

FG = Freiheitsgrad; p = Ergebnis des Chi Quadrat Tests ( $\chi^2$ -Test); NRs = Nonresponder; Rs = Responder

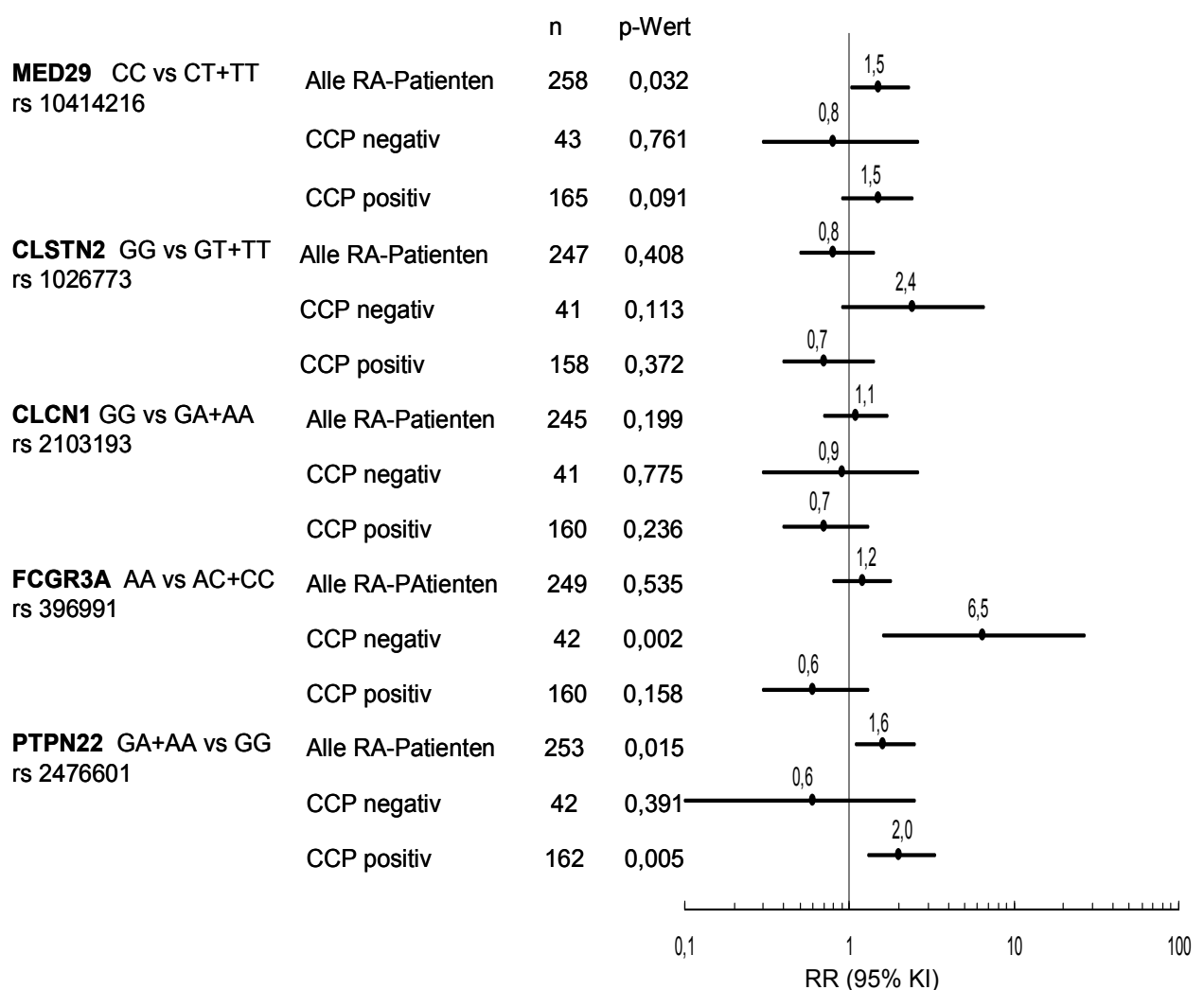


**Abbildung 6: Verteilung der A-Allel-Träger und Nicht-A-Allel-Träger des SNP PTPN22 bei Respondern und Nonrespondern**

### 3.2.3.2 Assoziationsanalysen der Single-Nukleotid-Polymorphismen mit dem Therapieerfolg bei Differenzierung zwischen dem CCP-AK-Status

Bei Betrachtung der Therapieantwort in Abhängigkeit des CCP-AK-Status zeigte sich, dass Träger des SNP *FCGR3A* Genotyps AA mit CCP-AK-negativem Status ein 6,5-fach (95% KI: 1,6-26,9) höheres RR für ein fehlendes Therapieansprechen besitzen (siehe Abbildung 7, Anhang 2). Bei den CCP-AK-positiven Patienten konnte für

diesen Polymorphismus keine Assoziation mit dem Therapieverhalten festgestellt werden. Wie ebenfalls aus Abbildung 7 ersichtlich ist, besteht für CCP-AK-positive SNP *PTPN22* A-Allel-Träger ein 2,0-fach (95% KI: 1,3-3,3) höheres RR eines Therapieversagens gegenüber den Genotyp GG-Trägern. Ein Trend zur Signifikanz deutete sich für CCP-AK-positive *MED29* CC-Träger gegenüber den T-Allel-Trägern an. Der Aussagewert war jedoch nicht durch die Differenzierung des CCP-AK-Status zu erhöhen. Für die übrigen untersuchten SNP ließ sich weder in der Gesamtheit aller RA-Patienten, noch in Abhängigkeit des CCP-AK-Status eine signifikante Assoziation mit der Therapieantwort nachweisen.



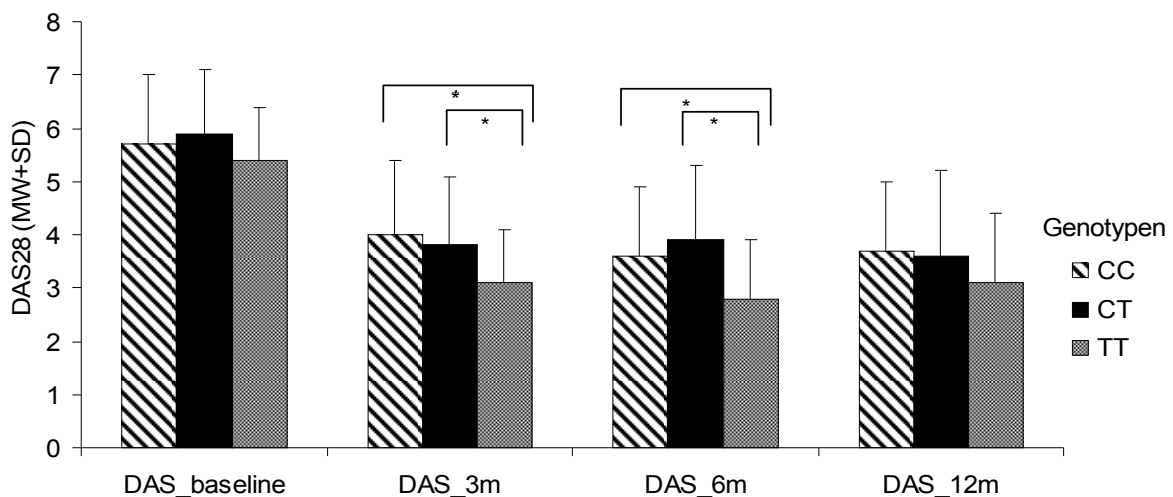
**Abbildung 7: RR, 95% KI und statistische Signifikanz (p-Wert) für das Therapieversagen der untersuchten SNP in Abhängigkeit des CCP-AK-Status**

RR = relatives Risiko; p = Ergebnis des Chi Quadrat Tests ( $\chi^2$ -Test); rs-Nummer = Referenznummer in der SNP-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Snp> [29.04.2012]); Alle RA-Patienten = ETN-Patienten ohne Differenzierung des CCP-AK-Status (hierbei wurden auch Patienten einbezogen deren CCP-AK-Status nicht dokumentiert war); Datentabelle in Anhang 2

### 3.2.3.3 Assoziationsanalysen der Single-Nukleotid-Polymorphismen mit der Krankheitsaktivität im zeitlichen Verlauf von zwölf Monaten

Für eine Subgruppe der ETN-Patienten (n=222) wurde die Krankheitsaktivität über ein Jahr dokumentiert und es konnten Zusammenhänge der SNP mit dem DAS28 im zeitlichen Verlauf geprüft werden.

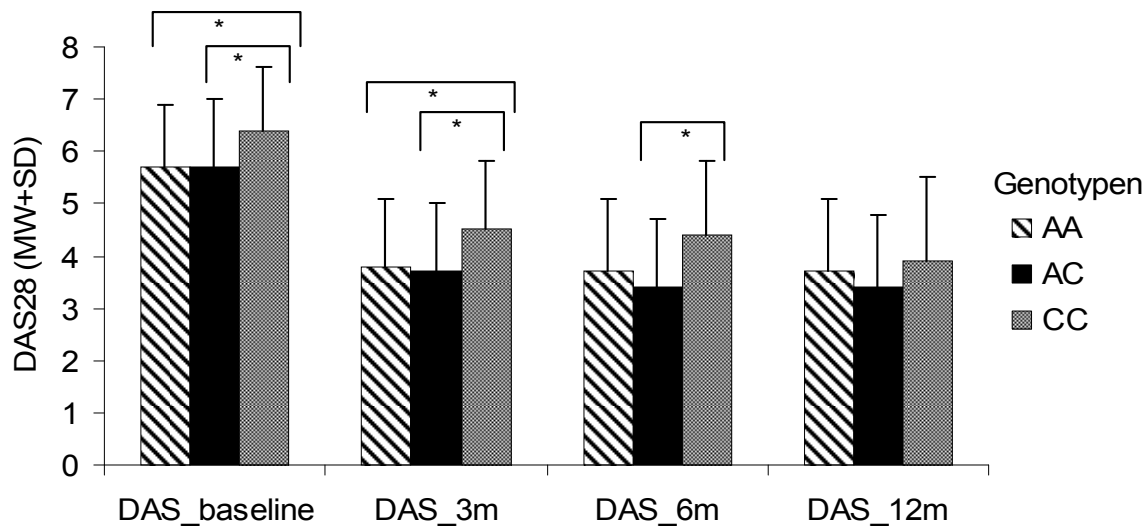
In Abbildung 8 wird deutlich, dass die Genotypen CC und CT des SNP *MED29* gegenüber dem Genotyp TT unter Therapie höhere Mittelwerte des DAS28-Wertes aufwiesen. Signifikanzen konnten für den DAS28-Wert nach drei Monaten (p=0,006) und nach sechs Monaten festgestellt werden (p=0,004). Vor Therapiebeginn unterschied sich die Krankheitsaktivität nicht signifikant zwischen den Genotypen.



**Abbildung 8: Mittelwertsvergleich des DAS28-Wertes zwischen den Genotypen des SNP *MED29* vor Therapiebeginn, nach drei, sechs und zwölf Monaten**

Testung auf Mittelwertsunterschiede des DAS28-Wertes zwischen den Genotypen des SNP *MED29* mittels einfaktorieller Varianzanalyse ANOVA; DAS\_baseline: DAS28 vor Beginn der ETN-Therapie; DAS\_3m: DAS28 nach drei Monaten ETN-Therapie, DAS\_6m: DAS28 nach sechs Monaten ETN-Therapie; DAS\_12m: DAS28 nach zwölf Monaten ETN-Therapie; \*:p<0,05; Datentabelle in Anhang 1

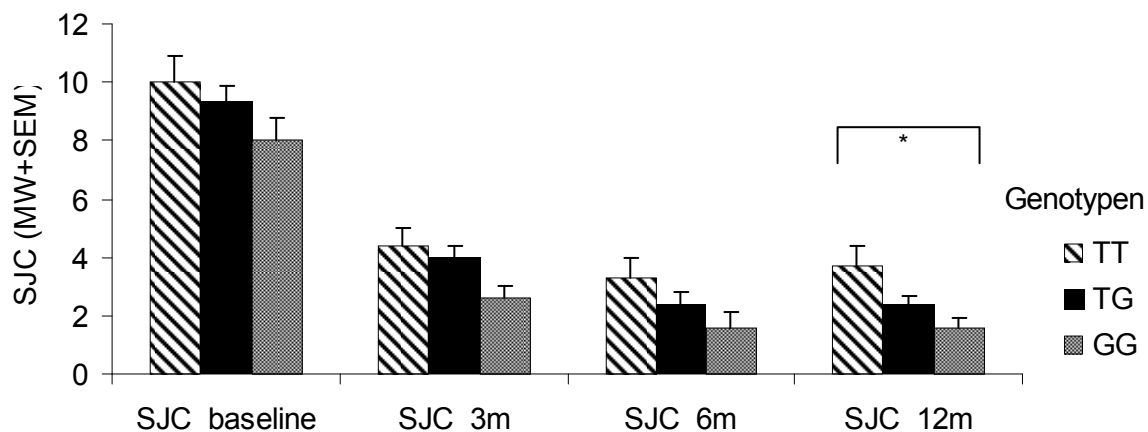
Der Genotyp CC des SNP *FCGR3A* zeigte signifikant höhere Mittelwerte der Krankheitsaktivität von Therapiebeginn bis zu sechs Monaten unter Therapie gegenüber den Genotypen AC und AA. Nach zwölf Monaten ETN-Therapie war dieser Unterschied nicht mehr signifikant (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9: Mittelwertsvergleich des DAS28-Wertes zwischen den Genotypen des SNP FCGR3A vor Therapiebeginn, nach drei, sechs und zwölf Monaten**

Testung auf Mittelwertsunterschiede des DAS28-Wertes zwischen den Genotypen des SNP FCGR3A mittels einfaktorieller Varianzanalyse ANOVA; DAS\_baseline: DAS28 vor Beginn der ETN-Therapie; DAS\_3m: DAS28 nach drei Monaten ETN-Therapie, DAS\_6m: DAS28 nach sechs Monaten ETN-Therapie; DAS\_12m: DAS28 nach zwölf Monaten ETN-Therapie; \*:p<0,05; Datentabelle in Anhang 1

Bei Betrachtung der Einzelparameter des DAS28 zeigte sich, dass der SNP *CLSTN2* Genotyp GG im zeitlichen Verlauf durchgehend niedrigere Mittelwerte gegenüber den Genotypen TT und TG hinsichtlich der Anzahl geschwollener Gelenke aufwies. Eine Signifikanz konnte nach zwölf Monaten ETN-Therapie festgestellt werden (p=0,014), (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10: Mittelwertsvergleich des SJC zwischen den Genotypen des SNP CLSTN2 vor Therapiebeginn, nach drei, sechs und zwölf Monaten**

Testung auf Mittelwertsunterschiede des SJC zwischen den Genotypen des SNP CLSTN2 mittels einfaktorieller Varianzanalyse ANOVA; SJC\_t0: SJC vor Beginn der ETN-Therapie; SJC\_3m: SJC nach drei Monaten ETN-Therapie, SJC\_6m: SJC nach sechs Monaten ETN-Therapie; SJC\_12m: SJC nach zwölf Monaten ETN-Therapie; SEM = Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*); \*:p<0,05; Datentabelle in Anhang 1

### 3.2.4 Untersuchung des Therapieerfolges unter der Kombination signifikanter Merkmale

Es wurden vier Merkmale identifiziert, die eine signifikante Assoziation mit dem Therapieerfolg von RA-Patienten auf ETN zeigten: Ausgangs-DAS28-Wert, CCP-AK-Spiegel und Allelverteilung der SNP *MED29* und *PTPN22*. Da in dieser Kohorte keine signifikante Assoziation der Merkmale untereinander vorlag, konnte geprüft werden, ob diese Parameter in Kombination einen stärkeren Effekt hinsichtlich eines Therapieversagens aufweisen.

Wie in Tabelle 16 dargestellt, ließ sich für Patienten mit dem SNP *PTPN22* Risikoallel A und hoch positiven CCP-AK-Spiegeln ein 1,7-fach (95% KI: 0,8-3,6) höheres RR für das Therapieversagen gegenüber CCP-AK-negativen *PTPN22* GG-Trägern feststellen.



**Tabelle 16: RR des Therapieversagens beim Vorliegen des Risikoallels PTPN22 A und hoch positiver CCP-AK**

Variablenkombination	NRs*	Rs*	Σ	p	RR (95% KI)
PTPN22 GA+AA	44,9 (31)	28,8 (53)	84	0,015	1,6 (1,1-2,5)
PTPN22 GA+AA + CCP <sup>hp</sup>	47,6 (10)	52,4 (11)	21	0,145	1,7 (0,8-3,6) <sup>ns</sup>
PTPN22 GG + CCP <sup>ne</sup>	27,6 (8)	72,4 (21)	29		1

ns = nicht signifikant; p = Ergebnis des Chi Quadrat Tests ( $\chi^2$ -Test); CCP<sup>hp</sup> = CCP-AK hoch positiv; CCP<sup>ne</sup> = CCP-AK-negativ; NRs = Nonresponder; Rs = Responder; \* % (n); RR = relatives Risiko

Auch Träger der Risikokombination SNP *MED29* CC und hoch positive CCP-AK-Spiegel hatten – gegenüber Patienten, die diese Risikokombination nicht besitzen – ein 2,4-fach (95% KI: 1,01-5,0) erhöhtes RR nicht auf die Therapie anzusprechen (siehe Tabelle 17).

**Tabelle 17: RR des Therapieversagens beim Vorliegen hoch positiver CCP-AK und des Genotypen MED29 CC**

Variablenkombination	NRs*	Rs*	Σ	p	RR (95% KI)
MED29 CC	54,9 (39)	40,1 (75)	114	0,032	1,5 (1,02-2,3)
MED29 CC + CCP <sup>hp</sup>	58,6 (17)	41,4 (12)	29	0,014	2,4 (1,01-5,0)
MED29 CT+TT + CCP <sup>ne</sup>	25,0 (6)	75,0 (18)	24		1

ns = nicht signifikant; p = Ergebnis des Chi Quadrat Tests ( $\chi^2$ -Test); CCP<sup>hp</sup> = CCP-AK hoch positiv; CCP<sup>ne</sup> = CCP-AK-negativ; NRs = Nonresponder; Rs = Responder; \* % (n); RR = relatives Risiko

Bei der Kombination der Risikoallele des SNP *PTPN22* und *MED29* zeigten die Risikoallelträger ein 2,5-fach (95% KI: 1,4-4,2) höheres RR für ein Therapieversagen gegenüber den Patienten, die diese Risikoallele nicht tragen. Dieses Ergebnis ist in Tabelle 18 aufgeführt.

**Tabelle 18: RR des Therapieversagens beim Vorliegen des Risikoallels PTPN22 A und des Genotypen MED29 CC**

Variablenkombination	NRs*	Rs*	Σ	p	RR (95% KI)
PTPN22 GG + MED29 CC	28,2 (20)	71,8 (51)	71	0,132	1,5 (0,9-2,7) <sup>ns</sup>
PTPN22 GA+AA + MED29 CT+TT	28,6 (12)	71,4 (30)	42	0,178	1,6 (0,8-2,9) <sup>ns</sup>
PTPN22 GA+AA + MED29 CC	45,2 (19)	54,8 (23)	42	0,010	2,5 (1,4-4,2)
PTPN22 GG + MED29 CT+TT	18,4 (18)	81,6 (80)	98		1

ns = nicht signifikant; p = Ergebnis des Chi Quadrat Tests ( $\chi^2$ -Test); NRs = Nonresponder; Rs = Responder; \* % (n); RR = relatives Risiko

### 3.2.5 Untersuchung der Merkmale in Abhängigkeit des Therapieerfolges im multivariaten Modell

Da davon ausgegangen wird, dass es sich bei der individuellen Arzneimittelwirkung von ETN um ein multifaktorielles Geschehen handelt, sollten auch die Wechselwirkungen untersuchter Merkmale berücksichtigt werden. Zu diesem Zweck wurden die Daten im multivariaten Modell mittels logistischer Regression und Diskriminanzanalyse geprüft. Wesentliches Ziel war es, herauszufinden, welche Merkmale nicht nur bei isolierter Betrachtung, sondern im Zusammenwirken mehrerer Einflussgrößen einen Beitrag zur Differenzierung in Rs und NRs leisten können. Dadurch könnte die Bedeutung einzelner Merkmale hinsichtlich ihrer praktischen Relevanz für den Einsatz im klinischen Alltag geprüft werden. Es wurden drei Modelle mit unterschiedlicher Variablenkonstellation aufgestellt, um die Merkmalsvariablen mit der maximalen Trennung in Rs und NRs ausfindig zu machen. Modell 1 bezog Variablen ein, die statistische Signifikanz in der univariaten Analyse zeigten. In Modell 2 wurden alle Merkmale berücksichtigt, die im Rahmen dieser Studie ermittelt wurden. Das Modell 3 impliziert Variablen, die in der logistischen Regression eine Bedeutung für die Trennung in Rs und NRs zeigten – CCP-AK, *PTPN22* und Ausgangs-DAS28-Wert – sowie einige andere Faktoren, die im klinischen Praxisalltag relativ einfach zu ermitteln wären. Die folgende Tabelle zeigt die Klassifizierungsergebnisse, die einen Überblick über die Güte der Diskriminanzfunktion liefern.

**Tabelle 19: Klassifizierungsergebnisse nach Diskriminanzanalyse**

	Modell 1	Modell 2	Modell 3
Richtige Klassifizierung in % (Gruppe NRs vs Rs)	75,4 (76,8 vs 74,8)	80,2 (80,0 vs 80,2)	77,2 (81,0 vs 75,5)

*Modell 1* = Einbezug der Merkmalsvariablen CCP-AK, Ausgangs-DAS28, *PTPN22*, *MED29*; *Modell 2* = Einbezug der Merkmalsvariablen CCP-AK, Ausgangs-DAS28, *PTPN22*, *MED29*, Geschlecht, Erkrankungsalter, *CLSTN2*, *CLCN1*, *FCGR3A*, Alter, RF-Spiegel; *Modell 3* = Einbezug der Merkmalsvariablen CCP-AK, Ausgangs-DAS28, *PTPN22*, Geschlecht, Erkrankungsalter, RF-Spiegel, Alter; NRs = Nonresponder; Rs = Responder

Anhand des Modells 1 wurden 75,4% der Patienten richtig als Rs oder NRs eingeordnet. 76,8% aller NRs und 74,8% der Rs wurden richtig klassifiziert. Die Fehlerquote betrug 24,6%. Beide Gruppen sind somit gut zu beurteilen. Bei Einbezug aller elf untersuchten Merkmale (Erkrankungsalter, Alter, Geschlecht, RF-Spiegel, CCP-AK-Spiegel, Ausgangs-DAS28-Wert, *CLSTN2*, *CLCN1*, *PTPN22*, *MED29*, *FCGR3A*) in die Analyse, wurden 80,2% der Patienten richtig klassifiziert (siehe Modell 2). Dies

stellt eine Erhöhung um 4,8 Prozentpunkte gegenüber dem Modell 1 dar. Da die Merkmalsbestimmung insbesondere für genetische Marker mit Aufwand und Kosten verbunden ist, muss abgewägt werden, ob ein verbessertes Klassifizierungsergebnis von 4,8 Prozentpunkten diese rechtfertigt. Eine durchgeführte logistische Regression ergab, dass die Merkmale Ausgangs-DAS28-Wert, CCP-AK und *PTPN22* geeignet sind, Patienten in Rs und NRs einzuteilen. Entsprechend Modell 3 wurden neben diesen drei Merkmalen zusätzlich noch leicht ermittelbare und kostenarme Faktoren wie das Geschlecht, das Erkrankungsalter, der RF-Spiegel bei Therapiebeginn sowie das Alter der Patienten mit einbezogen. Anhand dieses Modells ließen sich 77,2% der Patienten richtig klassifizieren.

## 4 Diskussion

Die Vielzahl der modernen Therapieansätze zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis und das Versagen der einzelnen Therapeutika bei ca. 30% der Patienten erfordert objektive Marker bei der Auswahl der optimalen Therapie für den individuellen Patienten.

Ziel der Arbeit war die Identifizierung von Biomarkern für die Prädiktion des Erfolges einer anti-TNF- $\alpha$ -Therapie bei Patienten mit rheumatoider Arthritis. Hierfür wurde im Rahmen einer retrospektiven Analyse die Assoziation klinischer, laborchemischer und genetischer Parameter zum Behandlungserfolg auf eine anti-TNF- $\alpha$ -Therapie mit Etanercept untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass zwei der geprüften genetischen Polymorphismen sowie die Präsenz von Antikörpern gegen cyclisch citrullinierte Peptide und die Krankheitsaktivität der Patienten zu Therapiebeginn mit dem Ansprechen auf eine Therapie mit dem TNF- $\alpha$ -Blocker Etanercept assoziiert sind.

### 4.1 Identifizierung genetischer Merkmale

Für zwei der fünf untersuchten genetischen Polymorphismen konnte eine Assoziation mit dem Ansprechen auf eine anti-TNF- $\alpha$ -Therapie beobachtet werden, für keinen der analysierten Polymorphismen konnte eine statistisch signifikante Assoziation mit der rheumatoiden Arthritis festgestellt werden.

#### **Der Single-Nukleotid-Polymorphismus MED29**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Träger des Genotyps CC des Polymorphismus *rs 10414216* im MED29 Gen schlechter auf die ETN-Therapie ansprechen als Träger des T-Allels in heterozygoter oder homozygoter Form. Das Risiko eines Therapieversagens ist bei diesem Genotyp 1,5-fach höher als bei den Trägern des T-Allels.

Genomweite Assoziationsstudien haben gezeigt, dass es unterschiedliche Risikoloci für die ACPA-positive und ACPA-negative RA gibt. Damit besteht die Möglichkeit, dass der unterschiedliche genetische Hintergrund beider Krankheitsentitäten für Unterschiede in den genetischen Responsemarkern verantwortlich ist. Deshalb wurde für diese Studie die Genotypenverteilung der SNP im Hinblick auf einen unterschiedlichen Therapieerfolg in Abhängigkeit des CCP-AK-Status untersucht. Die eigenen Analysen zeigten, dass die Subgruppe der CCP-AK-positiven RA-Patienten einen Unterschied in der Genotypenverteilung zwischen Therapierespondern und -versagern aufwies. Bei CCP-AK-negativen Patienten konnte kein Unterschied festgestellt werden. Das Fehlen einer statistischen Signifikanz ist auf eine zu geringe Stichprobengröße der Subgruppen bei seltenen Merkmalsausprägungen zurückzuführen.

Im Verlauf über zwölf Monate anti-TNF- $\alpha$ -Therapie zeigten die Genotypen CC und CT durchschnittlich höhere DAS28-Werte gegenüber den TT-Trägern. Diese Ergebnisse sind mit der Hypothese vereinbar, dass Patienten mit einer schweren rheumatoiden Arthritis schlechter auf die anti-TNF- $\alpha$ -Therapie ansprechen [100].

Der für die Analyse ausgewählte Polymorphismus liegt ca 6.3 Kbp vor dem Gen für Tristetraprolin (TTP). Für dieses Gen waren Unterschiede in der Genexpression in Assoziation zum Therapieerfolg beobachtet worden [95]. Der Polymorphismus liegt gleichzeitig in der 3'UTR des MED29 Gens. Die 3'UTR ist ein transkribierter aber nicht translaterter Abschnitt der DNA, der sich dem kodierenden Bereich anschließt. Hier können verschiedene regulatorische Sequenzen liegen, wie z.B. Bindungsstellen für Proteine oder microRNA (miRNA), die die Stabilität der messengerRNA (mRNA) beeinflussen. Dieser Bereich des Genoms ist somit wichtig für verschiedene Mechanismen der Genregulation und trägt zu verschiedenen biologischen Prozessen in vielen Zelltypen bei.

Med29 ist eine Untereinheit des Mediatorkomplexes, eines Proteinkomplexes der als Co-Aktivatoren für die Aktivierung der RNA-Polymerase II erforderlich ist. Der Komplex reguliert die mRNA-Synthese durch eine direkte Wechselwirkung zwischen DNA-gebundenen Transkriptionsaktivatoren und der RNA-Polymerase II sowie allgemeinen Initiationsfaktoren. Damit spielt er eine wesentliche Rolle in der Regulation der

Genexpression. Ob die Variationen der Nukleotidsequenz in diesem Bereich eine funktionelle Bedeutung hat ist unklar. Es gibt bisher keine publizierten Daten zur Bedeutung dieses Polymorphismus bei Autoimmunerkrankungen oder zu seiner biologischen Funktion.

### **Der Single-Nukleotid-Polymorphismus PTPN22**

Die Untersuchungen dieser Studie ergaben, dass Patienten mit dem *PTPN22* (*rs 2476601*) A-Allel ein schlechteres Ansprechen auf die ETN-Therapie zeigten. Träger des A-Allels hatten ein 1,6-fach höheres Risiko – gegenüber dem homozygoten GG-Genotyp – nicht auf die anti-TNF- $\alpha$ -Therapie anzusprechen.

Diese Beobachtung gilt dabei nur für die Subgruppe der CCP-AK positiven Patienten. Für CCP-AK-negative Patienten ließ sich dies nicht nachweisen. Es liegt somit ein unterschiedliches Therapieverhalten in Abhängigkeit des CCP-AK-Status vor.

Die beobachtete Assoziation des A-Allels mit einem gehäuften Therapieversagen steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Potter et al., die in ihrer Studie keine Assoziation des SNP *PTPN22* mit der Therapieantwort beobachten konnten [79]; der Anteil CCP-Antikörper positiver Patienten ist in beiden Studien vergleichbar. Die abweichenden Ergebnisse könnten in unterschiedlichen Studienbedingungen begründet sein. Im Unterschied zur Arbeit von Potter et al., in der die Veränderung der absoluten DAS28-Werte innerhalb von sechs Monaten untersucht wurde, erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Bewertung des Therapieerfolges bereits nach drei Monaten durch eine an den EULAR-Responsekriterien orientierten Klassifikation der Patienten. Weitere Unterschiede finden sich darüber hinaus in der begleitenden DMARD-Therapie und Steroidmedikation wie auch der Krankheitsaktivität zu Therapiebeginn. In der Studie von Potter et al. wies das Patientenkollektiv im Vergleich zur eigenen Studienpopulation eine längere Erkrankungsdauer (14 vs 10,5 Jahre) und eine höhere Krankheitsaktivität (Ausgangs-DAS28 6,8 vs 5,8) auf.

Der SNP *PTPN22* wird als Suszeptibilitätsgen für die RA [59;101-103] diskutiert. Bei den eigenen Analysen konnte allerdings keine signifikant unterschiedliche Allel- und Genotypenverteilung zwischen Patienten und Kontrollen festgestellt werden. Einige Studien konnten die Assoziation des SNP *PTPN22* nur für RF-positive und CCP-AK-positive RA-Patienten nachweisen [59;101;104]. Auch die eigenen Analysen zeigten tendenziell eine Assoziation des A-Allels mit dem Auftreten von CCP-Antikörpern. In der Literatur ist ein funktioneller Zusammenhang zwischen der *PTPN22* A-Allel-Variante und einer Autoantikörper-Produktion im Rahmen autoantikörperproduzierenden Autoimmunkrankheiten beschrieben [105]. Bei etlichen mit *PTPN22* assoziierten Autoimmunkrankheiten spielt die AK-Produktion eine bedeutende Rolle und es wurden Abnormalitäten in der humoralen Immunantwort bei *PTPN22*-*knockout*-Mäusen – bei diesen Mäusen wurde mittels genetischer Manipulation gezielt das Mausanalog zum menschlichen *PTPN22*-Gen deaktiviert – erkannt. Im Rahmen der Untersuchungen derart manipulierter Mäuse von Hasegawa et al. konnte – über einen verminderten hemmenden Einfluss auf die T-Zell-Signaltransduktionskaskade – eine vermehrte Proliferation und Funktion aktivierter T-Zellen festgestellt werden. Die veränderten Mäuse zeigten eine größere Anzahl prominenter, ausgebildeter Keimzellen und vermehrte B-Zell- und Ig-Titer [106]. Durch dieses funktionelle Korrelat wird der Zusammenhang zwischen der *PTPN22* A-Allel-Variante und einer ACPA-Produktion bestärkt. Auch das eigene Studienkollektiv mit langer Krankheitsdauer, DMARD-refraktärer RA und hoher Krankheitsaktivität könnte einen Einfluss auf die Diskrepanz der Ergebnisse haben, da diese Patienten möglicherweise einen gesonderten genetischen Hintergrund aufweisen. Die Tatsache, dass in der Literatur ein Zusammenhang der A-Allel Variante des SNP *PTPN22* mit der Krankheitsschwere beschrieben wird [103], stützt dieses Argument. Für die Anerkennung der polymorphen Genvariante des SNP *PTPN22* als Risikofaktor für die RA spricht sicherlich die kausale Verknüpfung zwischen dem potentiell pathogenem A-Allel und der funktionellen Auswirkung. Das *PTPN22* Gen kodiert für eine lymphozytenspezifische Phosphatase Lyp, die in hämatopoetischen Gewebe und allen monozytären Blutzellen exprimiert wird. Das Protein besteht unter anderem aus einer katalytischen Domäne mit Phosphorylaseaktivität sowie einer SH3-bindenden Domäne, die mit der Kinase Csk interagiert und in welcher der SNP *PTPN22* liegt. Über die Interaktion zwischen Lyp und Csk im Bereich des T-Zell-Rezeptors wird die T-Zell-Aktivierung vermittelt [107]. Weiterführende Studien zeigten, dass die A-Allel-

Variante eine verminderte Bindungsstärke im Vergleich zur G-Allel-Variante aufweist, was eine reduzierte Suppression der T-Zell-Aktivierung zur Folge hat. Man nimmt an, dass T-Zellen mit der A-Allel-Variante hyperreaktiv reagieren und Individuen mit diesem Allel zur Autoimmunität neigen [59].

### **Der Single-Nukleotid-Polymorphismus FCGR3A**

Keine Assoziation mit dem Erfolg einer anti-TNF- $\alpha$ -Therapie konnte für den Polymorphismus *rs 396991* im FCGR3A Gen festgestellt werden. Die bereits publizierten Daten sind sehr widersprüchlich. Die eigenen Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Kastbom et al. überein, die keinen Zusammenhang des SNP FCGR3A mit der Therapieantwort feststellen konnten [86]. Dies steht im Gegensatz zu den Analysen von Tutuncu et al. und Canete et al., die eine bessere Therapieantwort für Patienten mit dem homozygoten AA-Genotyp nachwiesen [84;85]. Ebenso konnten Tsukahara et al. eine Assoziation des FCGR3A AC-Genotyps mit der Therapieantwort zeigen [108]. Diese uneinheitliche Befundlage ist möglicherweise auf die geringe Stichprobengröße von Tutuncu et al. (n=30), Canete et al. (n=82) sowie Tsukahara et al. (n=33) zurückzuführen. Die unterschiedliche ethnische Zusammensetzung der einzelnen Studienkohorten kann darüber hinaus zu den diskrepanten Befunden führen; nur in der Analyse von Kastbom et al. wurde ein vergleichbares Studienkollektiv aus Kaukasier analysiert.

Ein möglicher funktioneller Einfluss des FC $\gamma$ RIIIa auf die Therapieantwort ist noch nicht ausreichend belegt. Bekanntlich wird der FC $\gamma$ RIIIa auf Zellen exprimiert, die an der rezeptorvermittelten Elimination von Antikörpern beteiligt sind. Dabei kommt es zur Interaktion des IgG Fc-Teiles der TNF- $\alpha$ -AK mit dem FC $\gamma$ RIIIa. Der Einfluss des SNP FCGR3A besteht in der Regulation dieser Bindungsaffinität und damit der Elimination der TNF- $\alpha$ -Blocker. Über diesen Mechanismus ist ein unterschiedliches Therapieergebnis in Abhängigkeit des SNP FCGR3A-Genotyps erklärbar.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass SNP FCGR3A AA-Genotyp Träger mit CCP-AK-negativem Status schlechter auf die ETN-Therapie ansprechen. Somit ist es den ei-



genen Ergebnissen zufolge durchaus sinnvoll, den CCP-AK-Status auch für die Bestimmung der Therapieantwort getrennt zu betrachten. Dies wird besonders deutlich, wenn die Ergebnisse von Tutuncu et al. und Canete et al. berücksichtigt werden. Diese konnten ein besseres Ansprechen auf die anti-TNF- $\alpha$ -Therapie für Träger des homozygoten SNP *FCGR3A* AA-Genotyps nachweisen [84;85]. Bei Differenzierung zwischen dem CCP-AK-Status würde dies nicht für die CCP-AK-negativen Patienten zutreffen. Aus diesem Grund sollte der CCP-AK-Status in zukünftige Analysen mit einbezogen werden. Als methodischer Nachteil der eigenen Untersuchungen ist darauf hinzuweisen, dass es teilweise zu stark limitierten Gruppengrößen kam. Diese Unausgewogenheit könnte im Rahmen größerer Studienkollektive verringert werden.

Bei Betrachtung des Therapieverlaufs über den Zeitraum von zwölf Monaten zeigte sich, dass ETN-Patienten mit dem selteneren Genotyp CC des SNP *FCGR3A* zu höheren Krankheitsaktivität neigen; denn sie wiesen gegenüber den Genotypen AA und AC signifikant höhere DAS28-Werte zu Therapiebeginn, nach drei und nach sechs Monaten auf. Auch andere Studien stellten eine positive Assoziation des SNP *FCGR3A* CC-Genotyps mit der Entwicklung von Rheumaknoten [109], radiologischen Veränderungen [110] sowie der Krankheitsaktivität bei männlichen Patienten [110] fest; diese Merkmale stellen Indikatoren für die Krankheitsschwere dar. In den eigenen Analysen konnte nach zwölf Monaten ETN-Therapie zwischen den verschiedenen Genotypen keine relevante Differenz bezüglich der Krankheitsaktivität mehr nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Feststellung ist in Erwägung zu ziehen, dass sich bei Patienten mit dem SNP *FCGR3A* Genotyp CC erst nach einer längeren Therapiedauer von mehr als sechs Monaten Erfolge abzeichnen und diese Patienten somit nach drei Monaten nicht als Responder registriert würden. Sollte sich diese Beobachtung in nachfolgenden Studien bestätigen, wäre für diese Patienten die Therapieevaluation zu einem späteren Zeitpunkt angebracht.

Bezüglich der Assoziation des Polymorphismus mit dem Auftreten einer RA konnte in dieser Arbeit kein Zusammenhang gefunden werden. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen von Micic et al. überein [111]. Nieto et al. zeigten als einzige, dass der SNP *FCGR3A* AA-Genotyp zu der Entwicklung einer RA disponiert [112]. In der Literatur wird jedoch eine Assoziation des SNP *FCGR3A* CC-Genotyps mit der RA beschrieben. So auch in der Metaanalyse von Lee et al., in der elf Studien eingeschlos-

sen wurden [113]. Kastbom et al. bestätigten dies – allerdings nur für männliche RA-Patienten [110]. Auch Robinson et al. konnten für die männliche Patientenpopulation eine stärkere Assoziation feststellen [114]. Somit könnte bei den eigenen Analysen ein Signifikanzverlust vorliegen, da hier nur eine geringe Anzahl männlicher Patienten gegeben war. Thabet et al. konnten nur für ACPA-positive Patienten einen Zusammenhang des SNP *FCGR3A* CC-Genotyps mit der RA feststellen [69]. Auch Robinson et al. bestätigten eine stärkere Assoziation für CCP-AK-positive Patienten [114]. Die eigenen Untersuchungen zeigen zwar eine differierende Genotypenverteilung für CCP-AK-positive RA-Patienten, jedoch kann kein Trend zur Signifikanz beobachtet werden. Ursächlich könnte jedoch auch bei dieser Assoziationsanalyse die geringe Stichprobengröße CCP-AK-positiver Patienten sein. Ebenfalls muss wieder berücksichtigt werden, dass ein unterschiedlicher genetischer Hintergrund der ETN-Subgruppe – die in die eigenen Analysen fallzahlstark einbezogen wurde – nicht auszuschließen ist. In dieser Hinsicht gestaltet sich der Vergleich der Studien bisweilen schwierig, da in vielen Publikationen die Patientenpopulation nur unzureichend charakterisiert ist und teilweise keine Angaben über Erkrankungsdauer, Schwere der RA und medikamentöse Therapie gemacht wurden. Der SNP *FCGR3A* ist hinsichtlich der Pathogenese der RA gut untersucht und kann kausal mit der RA in Verbindung gebracht werden. Allgemein spielen die FC $\gamma$ -Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Verknüpfung von humoraler mit zellulärer Immunantwort [115]. Man unterteilt die FC $\gamma$ -Rezeptoren in drei Klassen; der FC $\gamma$ RIII bildet eine Klasse und lässt sich in die zwei Isoformen FC $\gamma$ RIIIa und FC $\gamma$ RIIIb unterteilen. Der in dieser Arbeit untersuchte FC $\gamma$ RIIIa kodiert für ein membrandurchspannendes Molekül und wird vor allem auf natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen,  $\gamma\delta$ -T-Zellen, manchen Monozyten, dendritischen Zellen und Mastzellen exprimiert. Der FC $\gamma$ RIII ist durch die Bindung von IgG-Immunkomplexen an der Elimination dieser mit nachfolgender Stimulierung proinflammatorischer Mediatoren beteiligt [116]. Der SNP *FCGR3A*, bei dem die Aminosäure Valin durch Phenylalanin substituiert wird, führt zu einer vermehrten Affinität des FC $\gamma$ -Rezeptors für IgG1 und IgG3 [117]. Dies könnte – über die Verstärkung der pro-inflammatorischen Wirkung – die Bedeutung des SNP *FCGR3A* in der Pathogenese der RA erklären.

## **Der Single-Nukleotid-Polymorphismus CLSTN2**

Der SNP *CLSTN2* (*rs 1026773*) ergab unabhängig vom CCP-AK-Status keine Assoziation mit der Therapieantwort. Es zeigte sich jedoch unter der zwölfmonatigen anti-TNF- $\alpha$ -Therapie, dass SNP *CLSTN2* GG-Träger niedrigere Mittelwerte des SJC – als Einzelparameter des DAS28 – aufwiesen. Somit ist eine protektive Rolle des SNP *CLSTN2* GG-Genotyps hinsichtlich der Gelenkschwellung zu diskutieren. Da sich dieses Ergebnis schon vor Therapiebeginn beobachten ließ, ist hier nicht von einem Effekt der anti-TNF- $\alpha$ -Therapie auszugehen. Bisher liegen keine vergleichbaren Arbeiten vor, die die Bedeutung dieses SNP auf den individuellen Krankheitsverlauf untersuchten. Die ETN-Patienten stellen eine selektive Gruppe mit hoher Krankheitschwere, langer Krankheitsdauer und DMARD-refraktärer RA dar; aus diesem Grund dürfen die Ergebnisse nicht unkritisch von der Stichprobe auf die Gesamtpopulation (kaukasische RA-Patienten) übertragen werden. Weiterführende Analysen in einem größeren, ausgeglicheneren Patientenkollektiv wären sicherlich von Zugewinn. Es ist wünschenswert, dass das vorliegende Ergebnis – neben einer prädiktiven Aussagefähigkeit über den Krankheitsverlauf – das Potential birgt, das Wissen um die Pathogenese der RA zu bereichern. Dies wäre in Verbindung mit einer Analyse der biologischen Funktion des oben erwähnten Genlocus denkbar.

## **Der Single-Nukleotid-Polymorphismus CLCN1**

Anhand der vorliegenden Arbeit konnte keine Assoziation des SNP *CLCN1* (*rs 2103193*) mit dem Erfolg einer anti-TNF- $\alpha$ -Therapie festgestellt werden. Ebenso ergab die Differenzierung der Patienten hinsichtlich des CCP-AK-Status keine signifikant differierende Genotypenverteilung bei Rs und NRs. Die Analysen zeigten keinen Einfluss des SNP auf den Krankheitsverlauf oder die Entwicklung einer RA.

Der SNP *CLCN1* liegt in einem nicht kodierendem Genabschnitt (Intron) des Chloridkanal 1-Gens. Man nimmt an, dass diesem Abschnitt eine regulative Rolle bei der Genexpression oder dem alternativen Splicing zukommt. Über solche Mechanismen ist eine quantitative Regulation des Genproduktes sowie dessen funktionelle Eigenschaften möglich. Chloridkanäle kommen nahezu ubiquitär in Eukaryoten vor und

regeln eine Vielzahl von Funktionen, zu denen beispielsweise auch der transepitheliale Transport oder die Beteiligung an intrazellulären Signaltransduktionskaskaden gehört. Sie sind für die komplexen intrazellulären Regulationsmechanismen unerlässlich. Ein Zusammenhang mit der rheumatoiden Arthritis ist noch nicht beschrieben worden.

#### **4.1.1 Vergleich der Genotypisierungsergebnisse mit dem Referenz-Genom HapMap und veröffentlichten Studien**

Um eine zusätzliche Kontrolle über die Richtigkeit der ermittelten Genotypenverteilung zu gewinnen, wurden die Genotypisierungsergebnisse der Kontrollgruppe mit dem Referenz-Genom HapMap verglichen. Dabei handelt es sich um ein internationales Projekt, in dessen Rahmen eine Vielzahl von SNP des menschlichen Genoms genotypisiert wurden [118]. Die Daten des HapMap-Projektes sind in der *single nucleotide polymorphism database* (dbSNP) aufgeführt [119]. Es zeigte sich, dass der seltene *PTPN22* AA-Genotyp in der eigenen Kontrollgruppe auffallend stark vertreten war.

Zusätzlich konnten die Genotypisierungsergebnisse der RA-Patienten für die SNP *FCGR3A* und *PTPN22* mit den Ergebnissen veröffentlichter Studien verglichen werden. Tabelle 20 zeigt die eigenen Daten im Studienvergleich mit quantitativ starken und ausgeglichenen Fall-Kontroll-Gruppengrößen. Die Genotypenverteilung der SNP *CLSTN2*, *CLCN1* und *MED29* ist bis zum aktuellen Zeitpunkt bei RA-Patienten noch nicht beschrieben worden.

Die ermittelte Genotypenverteilung des SNP *FCGR3A* zeigte Abweichungen gegenüber anderen Studien: die eigene RA-Patientenpopulation wies eine stärkere Heterozygotie AC und einen geringeren Wildtypanteil AA auf. Die zum Vergleich herangezogenen Studien genotypisierten asiatische und nordeuropäische Patienten. Bei den nordeuropäischen Patienten handelt es sich bekanntlich um Kaukasier; jedoch sind Differenzen des genetischen Hintergrundes zu den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mitteleuropäern nicht auszuschließen. Die unterschiedliche Herkunft der untersuchten Populationen ist möglicherweise ursächlich für die Abweichungen der

Genotypenverteilung. Eine ähnliche Verteilung der Kontrollpopulation stützt dieses Argument.

Die Genotypisierungsergebnisse des SNP *PTPN22* der eigenen RA-Patienten waren nahezu deckungsgleich mit den verglichenen Studien. Die eigene Kontrollgruppe hingegen zeigte neben dem Vergleich mit dem Referenz-Genom HapMap auch im Studienvergleich einen stärkeren Homozygotenanteil AA. Diese Abweichung ist wahrscheinlich durch die geringe Populationsgröße des Kontrollkollektivs bedingt.

**Tabelle 20: Darstellung der SNP-Verteilung bei RA-Patienten anhand veröffentlichter Studienergebnisse**

SNP	Studie		Genotypen %			n	Pop.			
			AA	AC	CC					
<b>FCGR3A</b>		<i>Kastbom_2007 [86]</i>	<i>RA-Patienten</i>	43,0	43,0	14,0	282	C		
		<i>Canete_2009 [84]</i>	<i>RA-Patienten</i>	37,8	42,7	19,5	82	C		
		<i>Morgan_2003 [109]</i>	<i>RA-Patienten</i>	39,0	46,0	15,0	147	C		
			<i>Kontrollen</i>	48,0	43,0	9,0	129			
		<i>Chen_2006 [120]</i>	<i>RA-Patienten</i>	41,5	42,9	15,6	212	As		
			<i>Kontrollen</i>	41,8	45,8	12,4	371			
		<i>Eigene Daten</i>	<i>RA-Patienten</i>	30,9	55,2	13,9	424	C		
			<i>Kontrollen</i>	32,0	53,4	14,8	103			
		<b>PTPN22</b>		<i>Karlson_2008 [121]</i>	<i>RA-Patienten</i>	74,4	22,9	2,7	689	C
				<i>Wesoly_2007 [122]</i>	<i>RA-Patienten</i>	72,3	24,5	3,2	661	C
<i>Kontrollen</i>	80,6				19,4	0,0	284			
<i>Viken_2007 [123]</i>	<i>RA-Patienten</i>			69,3	28,3	2,3	520	C		
	<i>Kontrollen</i>			78,6	19,9	1,4	557			
<i>Pierer_2006 [124]</i>	<i>RA-Patienten</i>			62,4	33,0	4,6	390	C		
	<i>Kontrollen</i>			80,8	18,3	0,9	349			
<i>Begovich_2004 [59]</i>	<i>RA-Patienten</i>			73,7	25,1	1,3	475	C		
	<i>Kontrollen</i>			83,0	16,4	0,6	475			
<i>Eigene Daten</i>	<i>RA-Patienten</i>			68,2	28,9	2,9	443	C		
	<i>Kontrollen</i>	76,7	20,7	2,6	116					

Pop. = Herkunft der untersuchten Population; C = kaukasischer Herkunft; As = asiatischer Herkunft; bei fehlender Angabe der Kontrollgruppe handelt es sich nicht um Fall-Kontroll-Studien

## 4.2 Assoziation der klinischen Parameter mit dem Therapieerfolg

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Assoziation des Geschlechts mit dem Therapieerfolg festgestellt werden. Andere Studien stimmen mit diesem Ergebnis überein [71;72;74]. Mancarella et al. und Hyrich et al. zeigten jedoch, dass Männer unter einer anti-TNF- $\alpha$ -Therapie häufiger in Remission ( $\text{DAS28} < 2,6$ ) gehen [71;73]. Dies kann damit begründet werden, dass Männer unabhängig von der anti-TNF- $\alpha$ -Therapie niedrigere DAS28-Werte gegenüber Frauen aufwiesen [72].

Die eigenen Analysen konnten keine Assoziation des Alters mit der Therapieantwort feststellen. Die Studie von Hyrich et al. bestätigt dies [71], wohingegen Hetland et al. ein schlechteres Ansprechen auf die anti-TNF- $\alpha$ -Therapie bei älteren Patienten als signifikant nachwies [74]. Ursächlich für die unterschiedlichen Ergebnisse könnten die Zeitpunkte der Verlaufsuntersuchung sein: die vorliegende Arbeit und Hyrich et al. bestimmten den Therapieerfolg nach drei Monaten anti-TNF- $\alpha$ -Therapie; Hetland et al. hingegen nach sechs Monaten. Weiterhin liegen in den genannten Studien Patienten mit unterschiedlichem ethnischen Hintergrund und abweichender Begleitmedikation vor. Somit ist es möglich, dass die Diskrepanz den verschiedenen Basischarakteristika der Studienkollektive zuzuordnen ist.

Die eigenen Ergebnisse ergaben einen Zusammenhang des DAS28-Ausgangswertes mit der Therapieantwort. Bei insgesamt hoher Krankheitsaktivität der eigenen Studienpopulation (mittlerer  $\text{DAS28}=5,8$ ) zeigten NRs signifikant niedrigere Werte des Ausgangs-DAS28 als Rs. Obgleich andere Studien [71;125] diesen Sachverhalt bestätigen, ist zu diskutieren, ob der Ausgangs-DAS28-Wert als prognostischer Faktor einbezogen werden sollte. Der Grund hierfür wird im Folgenden näher erläutert: in der vorliegenden Arbeit gelten jene Patienten als Rs, welche eine Verbesserung des DAS28-Wertes von  $\geq 1,2$  erreichten. Die klinische Praxis zeigt allerdings, dass Patienten mit hoher Ausgangskrankheitsaktivität (hoher DAS28-Wert) diese Differenz von  $\geq 1,2$  leichter erreichen als Patienten mit niedrigeren DAS28-Werten. Dies bedeutet, dass Patienten mit hohen Ausgangs-DAS28-Werten durch die hier angewandte Methodik begünstigt sind, als Rs klassifiziert zu werden. Mancarella et al. konnten feststellen, dass Patienten mit weniger aggressiver RA unter der anti-TNF- $\alpha$ -Therapie nach sechs Monaten häufiger in Remission gehen [73]. Für Pa-

tienten mit hohen DAS28-Werten würde dies bedeuten, dass sie trotz guter Erfolge unter der anti-TNF- $\alpha$ -Therapie weniger häufig von einer Remission profitieren.

#### 4.3 Assoziation der laborchemischen Parameter mit dem Therapieerfolg

Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass NRs durchschnittlich höhere CCP-AK-Spiegel zu Therapiebeginn aufwiesen und unter den NRs signifikant mehr Patienten mit hoch positivem CCP-AK-Status waren als unter den Rs. Die Assoziation eines schlechten Therapieansprechens mit einem höheren CCP-AK-Spiegel zu Therapiebeginn [75-77] und einem CCP-AK-positivem Status [75;77;79] wurde in mehreren Studien bestätigt. Bezüglich des CCP-AK-Status stellten ausschließlich Potter et al. eine statistische Signifikanz fest [79], wohingegen Braun-Moscovici et al. [77] und Bobbio-Pallavicini et al. [75] lediglich einen Trend beobachteten. Ursächlich könnte eine zu geringe Patientenpopulation von Braun-Moscovici et al. (n=30) und Bobbio-Pallavicini et al. (n=132) sein. Morozzi et al. konnten dagegen keinen Zusammenhang des CCP-AK-Status mit der Therapieantwort feststellen [78]. Die Stichprobengröße dieser Studie war allerdings ebenfalls sehr klein (n=29) und es wurden ausschließlich mit ADA behandelte Patienten untersucht. Potter et al. führten die Differenzierung zwischen den TNF- $\alpha$ -Blockern nur für IFX und ETN durch, da die Gruppengröße der ADA behandelten Patienten zu klein war [79]. Andere oben genannte Studien differenzierten entweder nicht zwischen den TNF- $\alpha$ -Blockern oder untersuchten nur den TNF- $\alpha$ -Blocker IFX, so dass der Vergleich hier schwierig ist. Unterschiedliche Studienergebnisse in Abhängigkeit des TNF- $\alpha$ -Blockers sind allerdings möglich. Leider führte keine der Studien eine Beurteilung des Therapieverhaltens bezüglich sehr hoher CCP-AK-Spiegel durch. Die eigenen Analysen ergaben jedoch, dass besonders hoch positive CCP-AK-Spiegel (>1600 U/ml) mit einer schlechten Therapieantwort assoziiert sind. Dies wirft natürlich die Frage auf, ob das Therapieverhalten proportional schlechter mit der Konzentration der CCP-AK wird oder die CCP-AK hoch positiven Patienten eine separate Gruppe mit gesonderten Eigenschaften bildet. Ungeachtet dessen scheint es sehr wahrscheinlich, dass die RA durch den CCP-AK-Status in unterschiedliche Entitäten mit verschiedenen Krankheitsmechanismen untergliedert werden kann [126]; dies würde ebenfalls eine differierende Therapieantwort erklären. Oben erwähnte Studien untersuchten Patienten mit DMARD-

refraktärer RA, langer Krankheitsdauer und hoher Krankheitsaktivität. Daher ist es notwendig, die Ergebnisse in einem geeigneten Patientengut zu reevaluieren, falls es sich in Zukunft durchsetzen sollte, die anti-TNF- $\alpha$ -Therapie in früheren Krankheitsstadien einzusetzen.

#### 4.4 Diskussion des prädiktiven Aussagewerts unter der Kombination signifikanter Merkmale

In der univariaten Analyse wurde festgestellt, dass die Merkmale Ausgangs-DAS28-Wert, *PTPN22* A-Allel, *MED29* CC-Genotyp und der hoch positive CCP-AK-Spiegel mit einem schlechten Ansprechen auf die anti-TNF- $\alpha$ -Therapie assoziiert waren. Dies warf die Frage auf, ob Patienten in Besitz mehrerer dieser Merkmale ein höheres Risiko eines Therapieversagens haben (siehe Kapitel 3.2.4). Diesen Untersuchungen zufolge zeigten jene Patienten ein erhöhtes Risiko nicht auf die ETN-Therapie anzusprechen, die zusätzlich zu einem hoch positiven CCP-AK den *MED29* CC-Genotyp oder – neben dem *MED29* CC-Genotyp – das *PTPN22* A-Allel besitzen. Als problematisch erwies sich die Tatsache, dass einige dieser Merkmale eher selten vorlagen und durch die Subgruppenbildung die Stichprobengrößen bisweilen sehr klein waren. Um die Evidenz der Ergebnisse dieser Arbeit zu prüfen, ist es wünschenswert, dass diese als Ansatz für weiterführende Untersuchungen in einem größeren Studienkollektiv herangezogen werden.

#### 4.5 Diskussion der Ergebnisse im multivariaten Modell

Die Analysen wurden dahingehend vertieft ein mathematisches Berechnungsverfahren zu etablieren, das über die Zuordnung von Punktwerten zu den Biomarkern Aussagen über die Wahrscheinlichkeit eines Therapieerfolges ableiten lässt. Dies wäre ein Modell, das im klinischen Alltag den Arzt bei der Therapieentscheidung für den einzelnen Patienten unterstützen könnte. Mittels der Diskriminanzanalyse sowie der logistischen Regression wurde unter Berücksichtigung der Wirkung zwischen den einbezogenen Einflussgrößen geprüft, welche Merkmale geeignet seien, die Therapieantwort zu erklären. Diese Untersuchung sollte ergänzend zur univariaten Analyse, in der die Merkmale isoliert betrachtet werden, weiterführende Informationen liefern, und die Gewichtung der praktischen Bedeutung evaluieren. In der logistischen Regression verlor sich der univariate Hinweis des SNP *MED29* und es ergab sich



durch diesen Parameter kein diskriminatorischer Zusatzgewinn, um die Patienten in Rs und NRs zu klassifizieren. Sicherlich lässt sich ein SNP als qualitatives Merkmal nur bedingt in die Modellvorstellungen der logistischen Regression einordnen. Jedoch ist anzunehmen, dass der SNP *MED29* – würde anhand der Daten der durchgeführten logistischen Regression ein Score auf mathematischer Grundlage mit Praxisrelevanz bei der Therapieentscheidung entwickelt – keinen zusätzlichen Informationsgewinn liefere. Aufgrund der vermehrt anfallenden Kosten und des gesteigerten Arbeitsaufwandes wäre es aus wirtschaftlicher Sicht nicht sinnvoll den SNP *MED29* einzubeziehen. Die drei verschiedenen Ansätze der Diskriminanzanalyse ergaben vergleichbare Klassifizierungsergebnisse mit einer guten Prognosegüte von 70-80% (siehe Tabelle 19, Kapitel 3.2.5). Von statistischer Seite sei darauf hingewiesen, dass das erzielte Ergebnis gegebenenfalls etwas zu optimistisch ausfällt. Denn für die Analyse der Klassifikation wurden dieselben Fälle verwendet, aus denen bereits die Klassifikationsfunktion berechnet wurde. Erstrebenswert ist deshalb die Prüfung der Klassifikationsfunktion an einer neuen Teststichprobe.

#### 4.6 Beurteilung des Studiendesigns und der Auswahl des Studienkollektivs

Das untersuchte Patientenkollektiv repräsentiert eine große Stichprobe von RA-Patienten kaukasischer Herkunft. Da die Patienten bis auf ein paar Ausnahmen im selben Zentrum behandelt wurden, kann von einer vergleichsweise einheitlichen Datenerhebung ausgegangen werden. Die Schwankung der absoluten Zahlen ist darauf zurückzuführen, dass es sich um eine retrospektive Datenanalyse mit Patientendaten aus dem klinischen Alltag handelt, in der nicht alle Zeitpunkte und auch nicht immer alle Werte erfasst werden konnten. Schwerpunkt der Untersuchungen war die Identifikation geeigneter Therapieresponseprädiktoren anhand des Patientengutes der 304 ETN-Patienten. Darüber hinaus wurden Analysen mit dem Gesamtkollektiv der 519 RA-Patienten durchgeführt, das die mengenmäßig starke Subgruppe der ETN-Patienten einschließt. Die Gesamtstudienpopulation zeichnet sich durch eine starke Krankheitsaktivität, eine lange Krankheitsdauer und ein schlechtes Ansprechen auf DMARD aus. In der Regel misslingen bereits mehr als zwei DMARD-Therapien. Demnach ist es möglich, dass die eigenen Patienten bestimmte genetische Besonderheiten aufweisen, die eine Übertragung dieser Ergebnisse auf die Gesamtpopula-

tion aller RA-Patienten stören könnte. Bei der Bewertung der ermittelten Untersuchungsergebnisse ist auch zu beachten, dass die Komedikation außer Acht gelassen wurde. Ansonsten würden durch die Bildung von Untergruppen die Fallzahlen zu klein. Eine klinische Heterogenität innerhalb der untersuchten Population konnte nicht vollständig aufgehoben werden. Es ergeben sich beispielsweise Differenzen von bis zu 26 Jahren bei der Erkrankungsdauer, 19,7% der Patienten sind CCP-AK-negativ, 24,8% der Patienten hatten bei Therapiebeginn einen negativen RF-Spiegel. Außerdem unterschied sich die Begleitmedikation der Patienten in Dosis und Art. Es besteht somit die Möglichkeit, dass die ermittelten Resultate nur für Patientenuntergruppen zutreffen. In einigen Fällen, besonders bei seltenen Merkmalsausprägungen und der Bildung von Subgruppen, mussten kleine Fallzahlen in die Analysen einbezogen werden. Für zukünftige Studien wäre es daher sinnvoll, das Patientenkollektiv zu vergrößern, um auch in solchen Fällen angemessene Stichprobengrößen zu erhalten.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit sind mit Vorsicht auf andere TNF- $\alpha$ -Blocker wie ADA und IFX zu übertragen, da die unterschiedlichen TNF- $\alpha$ -AK abweichende Ergebnisse hinsichtlich der Therapieantwort beim gleichen Patienten zeigen können [127;128].

Der Zeitpunkt der Responseevaluation wurde nach drei Monaten gewählt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich noch im späteren Verlauf entscheidende Änderungen im Therapieverhalten ergeben. Um dieser Frage nachzugehen, wurde in der vorliegenden Arbeit der DAS28 im zeitlichen Verlauf von zwölf Monaten ermittelt: es zeigte sich für den SNP *FCGR3A*, dass Patienten mit dem Genotyp CC – welcher bei CCP-AK negativen Patienten mit einer fehlenden Therapieantwort assoziiert ist – unter der ETN-Therapie nach mehr als sechs Monaten einen Abfall der Krankheitsaktivität verzeichnen. Die Beurteilung des Therapieerfolges nach drei Monaten erscheint dennoch geeignet, da für übrige SNP keine zusätzlichen Ergebnisse im Verlauf von zwölf Monaten festgestellt werden konnten und frühstmöglich bei fehlendem Ansprechen das Therapeutikum gewechselt werden sollte, um irreversible Destruktionen zu verhindern. Es ist jedoch sinnvoll die Wirkung der Biomarker auch im Langzeitverlauf zu verfolgen, um spezifische Besonderheiten herauszuarbeiten.

Als problematisch im Vergleich mit anderen publizierten Studien erwies sich die Heterogenität der Beurteilung des Therapieansprechens. Zum aktuellen Zeitpunkt werden in wissenschaftlichen Studien mehrere verschiedene Verfahren genutzt. Hier wäre zum besseren Studienvergleich die Etablierung einer einheitlichen Methode hilfreich.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die TNF- $\alpha$ -Blocker werden seit mehr als zwölf Jahren erfolgreich in der Behandlung der RA eingesetzt. Besonders in Kombination mit MTX beeinflussen alle derzeit eingesetzten TNF- $\alpha$ -Blocker die Krankheitsaktivität, die funktionelle Beeinträchtigung sowie die Gelenkerosion im positiven Sinne und verbessern somit langfristig die Lebensqualität der Patienten [129]. Jedoch ist die Tatsache, dass bei etwa 25-30% der Patienten der Therapieerfolg ausbleibt bis heute ein ungeklärter Sachverhalt. Die Problematik dieses relativ hohen Therapieversageranteils ist mit dem Wissen um die hohen Therapiekosten dieser Medikation verständlich. Die Identifikation eines Markers, der die Therapieantwort vorhersagen könnte, wäre ein Gewinn im Sinne einer individualisierten Arzneitherapie. Den Patienten, die keinen Nutzen aus der Therapie ziehen könnten, blieben somit etwaige unerwünschte Wirkungen erspart, und in Hinblick auf bestehende Therapieoptionen aus der Biologikagruppe könnten sie früher auf eine effektive Therapie eingestellt werden. In ökonomischer Hinsicht würden überflüssige Kosten im Falle einer erfolglosen anti-TNF- $\alpha$ -Therapie vermieden. Zusätzlich wäre ein solcher Therapieresponsemarker in schwierigen Entscheidungssituationen des klinischen Alltags angesichts des heterogenen Therapieverlaufes sehr hilfreich.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in einer retrospektiven Studie ein mit ETN behandeltes Patientenkollektiv daraufhin untersucht, ob sich klinische, laborchemische oder genetische Eigenschaften ausmachen lassen, die mit dem therapeutischen Ansprechen auf die ETN-Therapie korrelieren. Daneben sollte durch die Analyse ausgewählter Polymorphismen ein Beitrag zum besseren Verständnis der Krankheitsdisposition zur RA geleistet werden.

Es wurde ein Gesamtkollektiv von 519 RA-Patienten und 145 Kontrollen hinsichtlich der Krankheitsdisposition zur RA untersucht. Unter den 519 RA-Patienten befand sich eine Subgruppe von 304 Patienten, die im Zeitraum von 1999 bis 2008 mit ETN behandelt und deren klinischer Verlauf unter dieser Therapie bis zu zwölf Monate dokumentiert wurde. Anhand dieser Studienpopulation sollten Biomarker identifiziert werden, die zur Vorhersage des Ansprechens auf die ETN-Therapie geeignet seien.

Die univariaten Analysen erbrachten folgende relevante Ergebnisse: Träger des *MED29* Genotyps CC haben ein 1,5-fach (95% KI: 1,02-2,3) erhöhtes RR nicht auf die ETN-Therapie anzusprechen. Patienten mit dem SNP *PTPN22* A-Allel zeigen ein 1,6-fach (95% KI: 1,1-2,5) höheres RR für fehlenden therapeutischen Erfolg gegenüber Patienten mit dem Genotyp GG. Des Weiteren wurde festgestellt, dass Patienten mit einem höheren CCP-AK-Spiegel zu Therapiebeginn und besonders beim Vorliegen eines hoch positiven CCP-AK-Spiegels schlechter auf die ETN-Therapie ansprechen. Zudem zeigen niedrigere Ausgangs-DAS28-Werte eine Korrelation mit dem Therapieversagen. Träger hoch positiver CCP-AK-Spiegel und des *MED29* CC-Genotyps haben ein 2,4-fach (95% KI: 1,01-5,0) erhöhtes RR eines Therapieversagens gegenüber Patienten mit negativen CCP-AK und dem *MED29* T-Allel. Patienten, die gleichzeitig Träger des *MED29* CC-Genotyps und des *PTPN22* A-Allels sind, haben ein 2,5-faches (95% KI: 1,4-4,2) RR des fehlenden Ansprechens auf die Therapie gegenüber Patienten, die das *MED29* T-Allel und den *PTPN22* GG-Genotyp tragen. Eine Subgruppenanalyse hinsichtlich des CCP-AK-Status positiv und negativ der ETN-Patienten konnte für den SNP *PTPN22* und den SNP *FCGR3A* zusätzliche Erkenntnisse liefern: das Vorkommen des SNP *FCGR3A* AA-Genotyps bei CCP-AK-negativen Patienten führt zu einem 6,5-fachem (95% KI: 1,6-26,9) und des SNP *PTPN22* A-Allels bei CCP-AK-positiven Patienten zu einem 2,0-fachem (95% KI: 1,3-3,3) erhöhtem RR für mangelnde Therapieantwort. Einen deutlichen Trend zur Signifikanz für ein schlechteres Therapieansprechen zeigten CCP-AK-positive *MED29* CC-Träger. Es konnte außerdem festgestellt werden, dass ETN-Patienten mit dem SNP *MED29* CC und CT und dem SNP *FCGR3A* CC zur höheren Krankheitsaktivität neigen und sich der SNP *CLSTN2* GG-Genotyp protektiv hinsichtlich der Gelenkschwellung auswirkt.

Diese Arbeit trägt dazu bei, potentielle Therapieresponseprädiktoren zu identifizieren. Deutlich macht sie auch, dass es sinnvoll ist, auf der Suche nach Markern des Therapieerfolges die Patienten in Subgruppen hinsichtlich des CCP-AK-Status zu unterteilen. Im Rahmen der Studie konnten darüber hinaus genetische Merkmale festgestellt werden, die mit dem Krankheitsverlauf der RA assoziiert sind. Vor diesem Hintergrund wäre es wünschenswert, wenn erbrachte Resultate für weiterführende Analysen neue Ansätze lieferten, die zum besseren Verständnis der Wirkungsweise der TNF- $\alpha$ -Blocker und der Pathogenese der RA beitragen.

Die praktische Verwendung der ermittelten Ergebnisse im klinischen Alltag ist im Rahmen einer individualisierten Arzneitherapie vorstellbar. Denkbar ist die Entwicklung eines mathematischen Berechnungsverfahrens, das alle bekannten Marker in geeigneter Gewichtung einbezieht und Rückschlüsse über das Therapieverhalten zulässt. Da neben ETN auch andere TNF- $\alpha$ -Blocker klinische Verwendung finden, ist es sinnvoll die prädiktive Aussagefähigkeit der gefundenen Marker auch für diese zu untersuchen. Unweigerlich müssen die ermittelten Responseprädiktoren in weiteren Studien geprüft und deren Effektivität und Effizienz im klinischen Alltag abgesichert werden. Entsprechend den vielfältigen biologischen Mechanismen der TNF- $\alpha$ -Blocker und der komplexen genetischen Regulationsmechanismen, ist es durchaus möglich, dass sich noch eine Vielzahl von Markern findet, die ebenfalls oder sogar besser als Prädiktoren der Therapieantwort geeignet wären.

## Literaturverzeichnis

1. Spector TD. Rheumatoid arthritis. *Rheum.Dis.Clin.North Am.* 1990; **16**:513-537.
2. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988; **31**:315-324.
3. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010; **62**:2569-2581.
4. Schmitt R, Lanz U. Bildgebende Diagnostik der Hand. 2. überarb. u. erw. Aufl. Thieme Verlag. Stuttgart 2004; 408-420.
5. Dihlmann W, Bandick J. Die Gelenksilhouette. Das Informationspotential der Röntgenstrahlen. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York *u.a.* 1995; 119-121.
6. Loreck D. Röntgendiagnostik der entzündlichen rheumatischen Gelenkerkrankungen. *Z.Arztl.Fortbild.(Jena)* 1987; **81**:417-427.
7. Schneider M, Lelgemann M, Abholz HH *u.a.* Interdisziplinäre Leitlinie: Management der frühen rheumatoiden Arthritis. DGRh-Leitlinie. 2. überarb. Aufl. Steinkopff Verlag. Darmstadt 2007; 5-8.
8. Tighe H, Carson DA. Rheumatoid Factor. In: *Kelley's textbook of rheumatology.* Ruddy S, Harris ED, Sledge CB (Eds). W. B. Saunders Co. Philadelphia 2001; 151-158.
9. Smolen JS. Rheumatoid arthritis. In: *Manual of Biological Markers of Disease.* Maini RN, van Venrooij WJ (Eds). Kluwer Academic Publishers. Amsterdam 1996; 1-18.
10. Saraux A, Berthelot JM, Chales G *et al.* Value of laboratory tests in early prediction of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002; **47**:155-165.
11. Halldorsdottir HD, Jonsson T, Thorsteinsson J, Valdimarsson H. A prospective study on the incidence of rheumatoid arthritis among people with persistent increase of rheumatoid factor. *Ann.Rheum.Dis.* 2000; **59**:149-151.

12. Cabral D, Katz JN, Weinblatt ME, Ting G, Avorn J, Solomon DH. Development and assessment of indicators of rheumatoid arthritis severity: results of a Delphi panel. *Arthritis Rheum.* 2005; **53**:61-66.
13. Vencovsky J, Machacek S, Sedova L *et al.* Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 2003; **62**:427-430.
14. Nienhuis RL, Mandema E. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis: the antiperinuclear factor. *Ann.Rheum.Dis.* 1964; **23**:302-305.
15. Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, Clark CJ, Hamblin TJ. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br.Med.J.* 1979; **2**:97-99.
16. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J.Clin.Invest* 1998; **101**:273-281.
17. Nielen MM, van der Horst AR, van Schaardenburg D *et al.* Antibodies to citrullinated human fibrinogen (ACF) have diagnostic and prognostic value in early arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 2005; **64**:1199-1204.
18. Sebbag M, Moinard N, Auger I *et al.* Epitopes of human fibrin recognized by the rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins. *Eur.J.Immunol.* 2006; **36**:2250-2263.
19. Kinloch A, Tatzer V, Wait R *et al.* Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.Ther.* 2005; **7**:R1421-R1429.
20. Bang H, Egerer K, Gaudiard A *et al.* Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007; **56**:2503-2511.
21. Mathsson L, Mullazehi M, Wick MC *et al.* Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Rheum.* 2008; **58**:36-45.
22. Meyer O, Labarre C, Dougados M *et al.* Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann.Rheum.Dis.* 2003; **62**:120-126.
23. Imboden JB. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annu.Rev.Pathol.* 2009; **4**:417-434.



24. Young A, Dixey J, Cox N *et al.* How does functional disability in early rheumatoid arthritis (RA) affect patients and their lives? Results of 5 years of follow-up in 732 patients from the Early RA Study (ERAS). *Rheumatology.(Oxford)* 2000; **39**:603-611.
25. Nyhall-Wahlin BM, Jacobsson LT, Petersson IF, Turesson C. Smoking is a strong risk factor for rheumatoid nodules in early rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 2006; **65**:601-606.
26. Symmons DP. Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best.Pract.Res.Clin.Rheumatol.* 2002; **16**:707-722.
27. Wolfe F, Zwiilich SH. The long-term outcomes of rheumatoid arthritis: a 23-year prospective, longitudinal study of total joint replacement and its predictors in 1,600 patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1998; **41**:1072-1082.
28. Jansen LM, van der Horst-Bruinsma IE, van Schaardenburg D, Bezemer PD, Dijkmans BA. Predictors of radiographic joint damage in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 2001; **60**:924-927.
29. Kastbom A, Strandberg G, Lindroos A, Skogh T. Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). *Ann.Rheum.Dis.* 2004; **63**:1085-1089.
30. Hopkins SJ, Humphreys M, Jayson MI. Cytokines in synovial fluid. I. The presence of biologically active and immunoreactive IL-1. *Clin.Exp.Immunol.* 1988; **72**:422-427.
31. Saxne T, Palladino MA, Heinegard D, Talal N, Wollheim FA. Detection of tumor necrosis factor alpha but not tumor necrosis factor beta in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis Rheum.* 1988; **31**:1041-1045.
32. Tetta C, Camussi G, Modena V, Di Vittorio C, Baglioni C. Tumour necrosis factor in serum and synovial fluid of patients with active and severe rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 1990; **49**:665-667.
33. Kay J, Calabrese L. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology.(Oxford)* 2004; **43 Suppl 3**:iii2-iii9.
34. Nishimoto N. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Curr.Opin.Rheumatol.* 2006; **18**:277-281.
35. Rannou F, Francois M, Corvol MT, Berenbaum F. Cartilage breakdown in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2006; **73**:29-36.

36. Zhang HG, Hyde K, Page GP *et al.* Novel tumor necrosis factor alpha-regulated genes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; **50**:420-431.
37. Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N.Engl.J.Med.* 2001; **344**:907-916.
38. Pap T, Muller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000; **2**:361-367.
39. Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW *et al.* Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N.Engl.J.Med.* 2000; **343**:1594-1602.
40. Smolen JS, Breedveld FC, Burmester GR *et al.* Consensus statement on the initiation and continuation of tumour necrosis factor blocking therapies in rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 2000; **59**:504-505.
41. Kavanaugh A, St Clair EW, McCune WJ, Braakman T, Lipsky P. Chimeric anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody treatment of patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate therapy. *J.Rheumatol.* 2000; **27**:841-850.
42. Keystone EC, Schiff MH, Kremer JM *et al.* Once-weekly administration of 50 mg etanercept in patients with active rheumatoid arthritis: results of a multi-center, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2004; **50**:353-363.
43. Klareskog L, van der HD, de Jager JP *et al.* Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 2004; **363**:675-681.
44. Maini R, St Clair EW, Breedveld F *et al.* Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet* 1999; **354**:1932-1939.
45. Goekoop-Ruiterman YP, Vries-Bouwstra JK, Allaart CF *et al.* Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid arthritis (the BeSt study): a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2005; **52**:3381-3390.
46. Landewe RB, Boers M, Verhoeven AC *et al.* COBRA combination therapy in patients with early rheumatoid arthritis: long-term structural benefits of a brief intervention. *Arthritis Rheum.* 2002; **46**:347-356.

47. Mottonen T, Hannonen P, Leirisalo-Repo M *et al.* Comparison of combination therapy with single-drug therapy in early rheumatoid arthritis: a randomised trial. FIN-RACo trial group. *Lancet* 1999; **353**:1568-1573.
48. Merkesdal S, Ruof J. [Current aspects of cost effectiveness of TNF-alpha blocking agents in patients with rheumatoid arthritis]. *Z.Rheumatol.* 2002; **61 Suppl 2**:II29-II32.
49. Listing J, Strangfeld A, Kary S *et al.* Infections in patients with rheumatoid arthritis treated with biologic agents. *Arthritis Rheum.* 2005; **52**:3403-3412.
50. Keystone EC, Kavanaugh AF, Sharp JT *et al.* Radiographic, clinical, and functional outcomes of treatment with adalimumab (a human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody) in patients with active rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate therapy: a randomized, placebo-controlled, 52-week trial. *Arthritis Rheum.* 2004; **50**:1400-1411.
51. St Clair EW, van der Heijde DM, Smolen JS *et al.* Combination of infliximab and methotrexate therapy for early rheumatoid arthritis: a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2004; **50**:3432-3443.
52. Catrina AI, Trollmo C, af Klint E *et al.* Evidence that anti-tumor necrosis factor therapy with both etanercept and infliximab induces apoptosis in macrophages, but not lymphocytes, in rheumatoid arthritis joints: extended report. *Arthritis Rheum.* 2005; **52**:61-72.
53. Agnholt J, Dahlerup JF, Kaltoft K. The effect of etanercept and infliximab on the production of tumour necrosis factor alpha, interferon-gamma and GM-CSF in in vivo activated intestinal T lymphocyte cultures. *Cytokine* 2003; **23**:76-85.
54. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS *et al.* Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* 2000; **43**:30-37.
55. Deighton CM, Walker DJ, Griffiths ID, Roberts DF. The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. *Clin.Genet.* 1989; **36**:178-182.
56. Bowes J, Barton A. Recent advances in the genetics of RA susceptibility. *Rheumatology.(Oxford)* 2008; **47**:399-402.
57. Barton A, Thomson W, Ke X *et al.* Rheumatoid arthritis susceptibility loci at chromosomes 10p15, 12q13 and 22q13. *Nat.Genet.* 2008; **40**:1156-1159.

58. Barton A, Eyre S, Ke X *et al.* Identification of AF4/FMR2 family, member 3 (AFF3) as a novel rheumatoid arthritis susceptibility locus and confirmation of two further pan-autoimmune susceptibility genes. *Hum.Mol.Genet.* 2009; **18**:2518-2522.
59. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA *et al.* A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am.J.Hum.Genet.* 2004; **75**:330-337.
60. Gregersen PK, Amos CI, Lee AT *et al.* REL, encoding a member of the NF-kappaB family of transcription factors, is a newly defined risk locus for rheumatoid arthritis. *Nat.Genet.* 2009; **41**:820-823.
61. Ikari K, Kuwahara M, Nakamura T *et al.* Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: a replication study. *Arthritis Rheum.* 2005; **52**:3054-3057.
62. Kurreeman FA, Padyukov L, Marques RB *et al.* A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *PLoS.Med.* 2007; **4**:e278.
63. Plenge RM, Cotsapas C, Davies L *et al.* Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat.Genet.* 2007; **39**:1477-1482.
64. Raychaudhuri S, Remmers EF, Lee AT *et al.* Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. *Nat.Genet.* 2008; **40**:1216-1223.
65. Raychaudhuri S, Thomson BP, Remmers EF *et al.* Genetic variants at CD28, PRDM1 and CD2/CD58 are associated with rheumatoid arthritis risk. *Nat.Genet.* 2009; **41**:1313-1318.
66. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT *et al.* STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N.Engl.J.Med.* 2007; **357**:977-986.
67. Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF *et al.* Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat.Genet.* 2010; **42**:508-514.
68. Ding B, Padyukov L, Lundstrom E *et al.* Different patterns of associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in the extended major histocompatibility complex region. *Arthritis Rheum.* 2009; **60**:30-38.
69. Thabet MM, Huizinga TW, Marques RB *et al.* Contribution of Fc gamma receptor IIIA gene 158V/F polymorphism and copy number variation to the risk of ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 2009; **68**:1775-1780.

70. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin.Pharmacol.Ther.* 2001; **69**:89-95.
71. Hyrich KL, Watson KD, Silman AJ, Symmons DP. Predictors of response to anti-TNF-alpha therapy among patients with rheumatoid arthritis: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Rheumatology.(Oxford)* 2006; **45**:1558-1565.
72. Kristensen LE, Kapetanovic MC, Gulfe A, Soderlin M, Saxne T, Geborek P. Predictors of response to anti-TNF therapy according to ACR and EULAR criteria in patients with established RA: results from the South Swedish Arthritis Treatment Group Register. *Rheumatology.(Oxford)* 2008; **47**:495-499.
73. Mancarella L, Bobbio-Pallavicini F, Ceccarelli F *et al.* Good clinical response, remission, and predictors of remission in rheumatoid arthritis patients treated with tumor necrosis factor-alpha blockers: the GISEA study. *J.Rheumatol.* 2007; **34**:1670-1673.
74. Hetland ML, Christensen IJ, Tarp U *et al.* Direct comparison of treatment responses, remission rates, and drug adherence in patients with rheumatoid arthritis treated with adalimumab, etanercept, or infliximab: results from eight years of surveillance of clinical practice in the nationwide Danish DANBIO registry. *Arthritis Rheum.* 2010; **62**:22-32.
75. Bobbio-Pallavicini F, Caporali R, Alpini C *et al.* High IgA rheumatoid factor levels are associated with poor clinical response to tumour necrosis factor alpha inhibitors in rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 2007; **66**:302-307.
76. Alessandri C, Bombardieri M, Papa N *et al.* Decrease of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor following anti-TNFalpha therapy (infliximab) in rheumatoid arthritis is associated with clinical improvement. *Ann.Rheum.Dis.* 2004; **63**:1218-1221.
77. Braun-Moscovici Y, Markovits D, Zinder O *et al.* Anti-cyclic citrullinated protein antibodies as a predictor of response to anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in patients with rheumatoid arthritis. *J.Rheumatol.* 2006; **33**:497-500.
78. Morozzi G, Fabbroni M, Bellisai F, Cucini S, Simpatico A, Galeazzi M. Low serum level of COMP, a cartilage turnover marker, predicts rapid and high ACR70 response to adalimumab therapy in rheumatoid arthritis. *Clin.Rheumatol.* 2007; **26**:1335-1338.
79. Potter C, Hyrich KL, Tracey A *et al.* Association of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide positivity, but not carriage of shared epitope or PTPN22 susceptibility variants, with anti-tumour necrosis factor response in rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 2009; **68**:69-74.

80. Mugnier B, Balandraud N, Darque A, Roudier C, Roudier J, Reviron D. Polymorphism at position -308 of the tumor necrosis factor alpha gene influences outcome of infliximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003; **48**:1849-1852.
81. Guis S, Balandraud N, Bouvenot J *et al.* Influence of -308 A/G polymorphism in the tumor necrosis factor alpha gene on etanercept treatment in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007; **57**:1426-1430.
82. Marotte H, Pallot-Prades B, Grange L *et al.* The shared epitope is a marker of severity associated with selection for, but not with response to, infliximab in a large rheumatoid arthritis population. *Ann.Rheum.Dis.* 2006; **65**:342-347.
83. Padyukov L, Lampa J, Heimbürger M *et al.* Genetic markers for the efficacy of tumour necrosis factor blocking therapy in rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 2003; **62**:526-529.
84. Canete JD, Suarez B, Hernandez MV *et al.* Influence of variants of Fc gamma receptors IIA and IIIA on the American College of Rheumatology and European League Against Rheumatism responses to anti-tumour necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 2009; **68**:1547-1552.
85. Tutuncu Z, Kavanaugh A, Zvaifler N, Corr M, Deutsch R, Boyle D. Fc gamma receptor type IIIA polymorphisms influence treatment outcomes in patients with inflammatory arthritis treated with tumor necrosis factor alpha-blocking agents. *Arthritis Rheum.* 2005; **52**:2693-2696.
86. Kastbom A, Bratt J, Ernestam S *et al.* Fc gamma receptor type IIIA genotype and response to tumor necrosis factor alpha-blocking agents in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007; **56**:448-452.
87. Criswell LA, Lum RF, Turner KN *et al.* The influence of genetic variation in the HLA-DRB1 and LTA-TNF regions on the response to treatment of early rheumatoid arthritis with methotrexate or etanercept. *Arthritis Rheum.* 2004; **50**:2750-2756.
88. Miceli-Richard C, Comets E, Verstuyft C *et al.* A single tumour necrosis factor haplotype influences the response to adalimumab in rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 2008; **67**:478-484.
89. Liu C, Batliwalla F, Li W *et al.* Genome-wide association scan identifies candidate polymorphisms associated with differential response to anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis. *Mol.Med.* 2008; **14**:575-581.
90. Suarez-Gestal M, Perez-Pampin E, Calaza M, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Lack of replication of genetic predictors for the rheumatoid arthritis response to anti-TNF treatments: a prospective case-only study. *Arthritis Res.Ther.* 2010; **12**:R72.

91. Prevoo ML, 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995; **38**:44-48.
92. Fuchs HA, Brooks RH, Callahan LF, Pincus T. A simplified twenty-eight-joint quantitative articular index in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1989; **32**:531-537.
93. Smolen JS, Breedveld FC, Eberl G *et al.* Validity and reliability of the twenty-eight-joint count for the assessment of rheumatoid arthritis activity. *Arthritis Rheum.* 1995; **38**:38-43.
94. van Riel PL, van Gestel AM. Clinical outcome measures in rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 2000; **59 Suppl 1**:i28-i31.
95. Koczan D, Drynda S, Hecker M *et al.* Molecular discrimination of responders and nonresponders to anti-TNF alpha therapy in rheumatoid arthritis by etanercept. *Arthritis Res.Ther.* 2008; **10**:R50.
96. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987; **155**:335-350.
97. Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 1993; **21**:3761-3766.
98. Kutuyavin IV, Afonina IA, Mills A *et al.* 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.* 2000; **28**:655-661.
99. Knapp M. Re: "Biased tests of association: comparisons of allele frequencies when departing from Hardy-Weinberg proportions". *Am.J.Epidemiol.* 2001; **154**:287-288.
100. Marotte H, Miossec P. Biomarkers for prediction of TNFalpha blockers response in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2010; **77**:297-305.
101. Lee AT, Li W, Liew A *et al.* The PTPN22 R620W polymorphism associates with RF positive rheumatoid arthritis in a dose-dependent manner but not with HLA-SE status. *Genes Immun.* 2005; **6**:129-133.
102. Orozco G, Sanchez E, Gonzalez-Gay MA *et al.* Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2005; **52**:219-224.

103. Steer S, Lad B, Grumley JA, Kingsley GH, Fisher SA. Association of R602W in a protein tyrosine phosphatase gene with a high risk of rheumatoid arthritis in a British population: evidence for an early onset/disease severity effect. *Arthritis Rheum.* 2005; **52**:358-360.
104. Wesoly J, van der Helm-van Mil AH, Toes RE *et al.* Association of the PTPN22 C1858T single-nucleotide polymorphism with rheumatoid arthritis phenotypes in an inception cohort. *Arthritis Rheum.* 2005; **52**:2948-2950.
105. Lee YH, Rho YH, Choi SJ *et al.* The PTPN22 C1858T functional polymorphism and autoimmune diseases – a meta-analysis. *Rheumatology.(Oxford)* 2007; **46**:49-56.
106. Hasegawa K, Martin F, Huang G, Tumas D, Diehl L, Chan AC. PEST domain-enriched tyrosine phosphatase (PEP) regulation of effector/memory T cells. *Science* 2004; **303**:685-689.
107. Cohen S, Dadi H, Shaoul E, Sharfe N, Roifman CM. Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp. *Blood* 1999; **93**:2013-2024.
108. Tsukahara S, Ikari K, Sato E *et al.* A polymorphism in the gene encoding the FcγIIIa receptor is a possible genetic marker to predict the primary response to infliximab in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 2008; **67**:1791-1792.
109. Morgan AW, Keyte VH, Babbage SJ *et al.* FcγRIIIA-158V and rheumatoid arthritis: a confirmation study. *Rheumatology.(Oxford)* 2003; **42**:528-533.
110. Kastbom A, Ahmadi A, Soderkvist P, Skogh T. The 158V polymorphism of Fcγ receptor type IIIA in early rheumatoid arthritis: increased susceptibility and severity in male patients (the Swedish TIRA project). *Rheumatology.(Oxford)* 2005; **44**:1294-1298.
111. Milicic A, Misra R, Agrawal S, Aggarwal A, Brown MA, Wordsworth BP. The F158V polymorphism in FcγRIIIA shows disparate associations with rheumatoid arthritis in two genetically distinct populations. *Ann.Rheum.Dis.* 2002; **61**:1021-1023.
112. Nieto A, Caliz R, Pascual M, Mataran L, Garcia S, Martin J. Involvement of Fcγ receptor IIIA genotypes in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000; **43**:735-739.
113. Lee YH, Ji JD, Song GG. Associations between FCGR3A polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a metaanalysis. *J.Rheumatol.* 2008; **35**:2129-2135.



114. Robinson JI, Barrett JH, Taylor JC *et al.* Dissection of the FCGR3A association with RA: increased association in men and with autoantibody positive disease. *Ann.Rheum.Dis.* 2010; **69**:1054-1057.
115. Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 2001; **19**:275-290.
116. Abrahams VM, Cambridge G, Lydyard PM, Edwards JC. Induction of tumor necrosis factor alpha production by adhered human monocytes: a key role for Fc gamma receptor type IIIa in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000; **43**:608-616.
117. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, de Borne AE, de Haas M. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* 1997; **90**:1109-1114.
118. Thorisson GA, Smith AV, Krishnan L, Stein LD. The International HapMap Project Web site. *Genome Res.* 2005; **15**:1592-1593.
119. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M *et al.* dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001; **29**:308-311.
120. Chen JY, Wang CM, Wu JM, Ho HH, Luo SF. Association of rheumatoid factor production with Fc gammaRIIIa polymorphism in Taiwanese rheumatoid arthritis. *Clin.Exp.Immunol.* 2006; **144**:10-16.
121. Karlson EW, Chibnik LB, Cui J *et al.* Associations between human leukocyte antigen, PTPN22, CTLA4 genotypes and rheumatoid arthritis phenotypes of autoantibody status, age at diagnosis and erosions in a large cohort study. *Ann.Rheum.Dis.* 2008; **67**:358-363.
122. Wesoly J, Hu X, Thabet MM *et al.* The 620W allele is the PTPN22 genetic variant conferring susceptibility to RA in a Dutch population. *Rheumatology.(Oxford)* 2007; **46**:617-621.
123. Viken MK, Olsson M, Flam ST *et al.* The PTPN22 promoter polymorphism -1123G>C association cannot be distinguished from the 1858C>T association in a Norwegian rheumatoid arthritis material. *Tissue Antigens* 2007; **70**:190-197.
124. Pierer M, Kaltenhauser S, Arnold S *et al.* Association of PTPN22 1858 single-nucleotide polymorphism with rheumatoid arthritis in a German cohort: higher frequency of the risk allele in male compared to female patients. *Arthritis Res.Ther.* 2006; **8**:R75.

125. Weaver AL, Lautzenheiser RL, Schiff MH *et al.* Real-world effectiveness of select biologic and DMARD monotherapy and combination therapy in the treatment of rheumatoid arthritis: results from the RADIUS observational registry. *Curr.Med.Res.Opin.* 2006; **22**:185-198.
126. Morgan AW, Thomson W, Martin SG *et al.* Reevaluation of the interaction between HLA-DRB1 shared epitope alleles, PTPN22, and smoking in determining susceptibility to autoantibody-positive and autoantibody-negative rheumatoid arthritis in a large UK Caucasian population. *Arthritis Rheum.* 2009; **60**:2565-2576.
127. Sandborn WJ, Hanauer S, Loftus EV, Jr. *et al.* An open-label study of the human anti-TNF monoclonal antibody adalimumab in subjects with prior loss of response or intolerance to infliximab for Crohn's disease. *Am.J.Gastroenterol.* 2004; **99**:1984-1989.
128. Wick MC, Ernestam S, Lindblad S, Bratt J, Klareskog L, van Vollenhoven RF. Adalimumab (Humira) restores clinical response in patients with secondary loss of efficacy from infliximab (Remicade) or etanercept (Enbrel): results from the STURE registry at Karolinska University Hospital. *Scand.J.Rheumatol.* 2005; **34**:353-358.
129. Taylor PC. Anti-TNFalpha therapy for rheumatoid arthritis: an update. *Intern.Med.* 2003; **42**:15-20.

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	ACR-Kriterien zur Klassifikation der RA von 1987 .....	2
Tabelle 2:	Beschreibung der Patienten .....	15
Tabelle 3:	Hauptcharakteristika der ETN-Patienten .....	16
Tabelle 4:	Einteilung des DAS28 .....	17
Tabelle 5:	EULAR-Response-Kriterien .....	18
Tabelle 6:	Definition der Responder und Nonresponder .....	19
Tabelle 7:	Übersicht über die Charakteristika der SNP für die Allel-spezifische TaqMan <sup>®</sup> PCR.....	21
Tabelle 8:	Reaktionsansatz für einen TaqMan <sup>®</sup> PCR Assay mit Allel-Diskriminierung .....	26
Tabelle 9:	Thermoprofil des TaqMan <sup>®</sup> PCR Assays .....	27
Tabelle 10:	Genotypenverteilung und Allelhäufigkeiten bei RA-Patienten und Kontrollen .....	30
Tabelle 11:	Ergebnisse der univariaten Analyse klinischer Parameter mittels Chi-Quadrat-Test bzw. Mittelwertsvergleich .....	33
Tabelle 12:	Ergebnisse der univariaten Analyse laborchemischer Parameter mittels Chi-Quadrat-Test bzw. Mittelwertsvergleich.....	34
Tabelle 13:	Ergebnisse der univariaten Analyse genetischer Parameter mittels Chi-Quadrat-Test.....	35
Tabelle 14:	Genotypenhäufigkeiten des SNP MED29 bei Respondern und Nonrespondern .....	36
Tabelle 15:	Genotypenhäufigkeiten des SNP PTPN22 bei Respondern und Nonrespondern .....	37
Tabelle 16:	RR des Therapieversagens beim Vorliegen des Risikoallels PTPN22 A und hoch positiver CCP-AK.....	42
Tabelle 17:	RR des Therapieversagens beim Vorliegen hoch positiver CCP-AK und des Genotypen MED29 CC.....	42
Tabelle 18:	RR des Therapieversagens beim Vorliegen des Risikoallels PTPN22 A und des Genotypen MED29 CC.....	42
Tabelle 19:	Klassifizierungsergebnisse nach Diskriminanzanalyse .....	43
Tabelle 20:	Darstellung der SNP-Verteilung bei RA-Patienten anhand veröffentlichter Studienergebnisse .....	54

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der untersuchten Kollektive .....	14
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der TaqMan® PCR.....	25
Abbildung 3:	Darstellung der Allel-Diskriminierung mittels SDS Software 2.1 .....	28
Abbildung 4:	Verteilung der CCP-AK bei Respondern und Nonrespondern .....	34
Abbildung 5:	Genotypenverteilung des SNP MED29 bei Respondern und Nonrespondern .....	36
Abbildung 6:	Verteilung der A-Allel-Träger und Nicht-A-Allel-Träger des SNP PTPN22 bei Respondern und Nonrespondern .....	37
Abbildung 7:	RR, 95% KI und statistische Signifikanz (p-Wert) für das Therapieversagen der untersuchten SNP in Abhängigkeit des CCP-AK-Status .....	38
Abbildung 8:	Mittelwertsvergleich des DAS28-Wertes zwischen den Genotypen des SNP MED29 vor Therapiebeginn, nach drei, sechs und zwölf Monaten .....	39
Abbildung 9:	Mittelwertsvergleich des DAS28-Wertes zwischen den Genotypen des SNP FCGR3A vor Therapiebeginn, nach drei, sechs und zwölf Monaten.....	40
Abbildung 10:	Mittelwertsvergleich des SJC zwischen den Genotypen des SNP CLSTN2 vor Therapiebeginn, nach drei, sechs und zwölf Monaten ..	41

## Formelverzeichnis

Formel 1:	Berechnung des DAS28 .....	17
Formel 2:	Berechnung der Extinktion $E_{\lambda}$ .....	22
Formel 3:	Berechnung der DNA-Konzentration .....	23

## Anhang

**Anhang 1 : Assoziationsanalysen der SNP mit der Krankheitsaktivität im zeitlichen Verlauf von 12 Monaten im ETN-Patientenkollektiv, Mittelwertsvergleich durch einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA, ergänzende Angaben zu Abb. 8, Abb. 9, Abb. 10**

	MED29			CLSTN2			CLCN1			FCGR3A			PTPN22		
Merkmal		n	MW±SD		n	(MW±SD)		n	(MW±SD)		n	(MW±SD)		n	(MW±SD)
DAS28_t0	CC	122	5,7±1,3	TT	71	5,7±1,1	CC	90	5,8±1,2	AA	83	5,7±1,2	GG	176	5,8±1,2
	CT	119	5,9±1,2	TG	128	5,8±1,3	CT	125	5,8±1,3	AC	146	5,7±1,3	GA	84	5,7±1,2
	TT	30	5,4±1,0	GG	60	5,8±1,2	TT	42	5,7±1,4	CC	32	6,4±1,2	AA	6	6,4±1,1
	Gesamt	271	5,8±1,2	Gesamt	259	5,8±1,3	Gesamt	257	5,8±1,3	Gesamt	261	5,8±1,2	Gesamt	266	5,8±1,2
BSG_t0	CC	123	45,8±29,2	TT	71	42,8±28,2	CC	91	46,4±27,2	AA	84	40,6±27,3	GG	176	43,7±28,4
	CT	122	45,2±30,0	TG	129	45,8±28,8	CT	128	43,5±27,6	AC	148	45,2±28,9	GA	88	46,8±28,5
	TT	30	38,1±21,4	GG	63	45,7±27,9	TT	42	45,1±33,5	CC	33	51,3±28,2	AA	6	38,3±29,5
	Gesamt	275	44,7±28,8	Gesamt	263	45,0±28,3	Gesamt	261	44,7±28,4	Gesamt	265	44,5±28,4	Gesamt	270	44,6±28,4
VAS_t0	CC	123	64,0±22,2	TT	71	62,3±21,4	CC	92	63,9±23,6	AA	83	62,8±21,8	GG	177	63,4±21,9
	CT	122	65,8±20,4	TG	129	65,6±21,5	CT	127	66,0±19,7	AC	149	62,8±20,1	GA	87	65,8±19,6
	TT	30	60,4±20,6	GG	63	63,4±21,1	TT	42	60,5±21,3	CC	33	74,7±21,7	AA	6	71,2±22,7
	Gesamt	275	64,4±21,2	Gesamt	263	64,2±21,4	Gesamt	261	64,4±21,4	Gesamt	265	64,3±21,1	Gesamt	270	64,3±21,2
TJC_t0	CC	122	9,2±6,6	TT	71	9,5±6,7	CC	91	9,2±7,0	AA	84	9,1±6,7	GG	177	10,1±7,1
	CT	121	10,6±7,2	TG	128	9,6±7,1	CT	126	9,8±6,8	AC	147	9,4±6,9	GA	85	8,1±6,4

	TT	30	7,3±6,7	GG	62	9,9±7,2	TT	42	9,6±7,9	CC	32	12,2±7,6	AA	6	14,3±7,0
	Gesamt	273	9,6±6,9	Gesamt	261	9,6±7,0	Gesamt	259	9,6±7,0	Gesamt	263	9,6±7,0	Gesamt	268	9,6±7,0
SJC_t0	CC	123	9,2±6,5	TT	71	10,0±6,7	CC	92	8,6±6,1	AA	84	9,5±6,6	GG	177	9,6±6,5
	CT	123	9,4±6,6	TG	129	9,3±6,4	CT	128	9,4±6,7	AC	149	8,7±6,2	GA	88	7,9±5,9
	TT	30	7,3±5,7	GG	64	8,0±6,3	TT	42	9,5±6,8	CC	33	10,5±7,5	AA	6	13,3±9,5
	Gesamt	276	9,1±6,4	Gesamt	264	9,2±6,5	Gesamt	262	9,1±6,5	Gesamt	266	9,2±6,5	Gesamt	271	9,1±6,5
DAS28_3m	CC	113	4,0±1,4	TT	65	3,9±1,3	CC	86	3,9±1,3	AA	75	3,8±1,3	GG	170	3,8±1,3
	CT	117	3,8±1,3	TG	122	3,8±1,4	CT	121	3,9±1,3	AC	146	3,7±1,3	GA	78	4,0±1,3
	TT	28	3,1±1,0	GG	60	3,7±1,2	TT	38	3,6±1,3	CC	28	4,5±1,3	AA	5	4,6±1,0
	Gesamt	258	3,8±1,3	Gesamt	247	3,8±1,3	Gesamt	245	3,8±1,3	Gesamt	249	3,8±1,3	Gesamt	253	3,8±1,3
BSG_3m	CC	117	33,9±26,4	TT	67	30,5±24,5	CC	88	26,4±19,6	AA	78	29,2±25,4	GG	171	28,1±23,6
	CT	117	28,1±23,6	TG	124	29,0±23,7	CT	123	30,4±23,5	AC	146	28,6±24,1	GA	81	32,8±26,9
	TT	29	20,5±17,6	GG	61	29,4±23,6	TT	39	33,3±27,7	CC	30	35,6±26,1	AA	6	33,7±21,8
	Gesamt	263	29,8±24,7	Gesamt	252	29,5±23,8	Gesamt	250	29,4±23,0	Gesamt	254	29,6±24,8	Gesamt	258	29,7±24,6
VAS_3m	CC	116	40,3±21,6	TT	67	40,8±22,4	CC	87	41,6±21,8	AA	77	40,7±20,8	GG	171	40,7±21,7
	CT	117	42,0±23,1	TG	122	40,0±21,4	CT	122	41,7±21,9	AC	146	38,6±21,5	GA	79	40,1±21,9
	TT	28	34,3±18,2	GG	61	39,5±22,3	TT	39	34,0±21,4	CC	29	50,0±24,0	AA	6	34,3±21,4
	Gesamt	261	40,4±22,0	Gesamt	250	40,1±21,8	Gesamt	248	40,4±21,8	Gesamt	252	40,6±21,8	Gesamt	256	40,4±21,7
TJC_3m	CC	113	3,6±4,9	TT	65	3,9±7,6	CC	86	3,6±5,0	AA	75	3,3±4,2	GG	170	3,1±4,8
	CT	117	3,6±6,0	TG	122	3,3±4,4	CT	121	3,5±6,1	AC	146	3,2±5,9	GA	78	3,9±6,6
	TT	28	2,1±4,6	GG	60	2,9±4,4	TT	38	2,2±3,7	CC	28	4,6±5,6	AA	5	4,8±3,7
	Gesamt	258	3,4±5,4	Gesamt	247	3,4±5,4	Gesamt	245	3,3±5,4	Gesamt	249	3,4±5,4	Gesamt	253	3,4±5,4
SJC_3m	CC	113	4,1±4,6	TT	65	4,4±4,6	CC	86	3,7±4,8	AA	75	4,1±5,1	GG	170	3,5±4,4
	CT	117	3,7±4,4	TG	122	4,0±4,9	CT	121	3,9±4,3	AC	146	3,4±4,0	GA	78	3,9±4,4
	TT	28	2,2±2,7	GG	60	2,6±2,9	TT	38	2,8±3,8	CC	28	4,1±4,6	AA	5	6,6±4,5
	Gesamt	258	3,7±4,4	Gesamt	247	3,7±4,4	Gesamt	245	3,7±4,4	Gesamt	249	3,7±4,4	Gesamt	253	3,7±4,4
DAS28_6m	CC	70	3,6±1,3	TT	39	3,8±1,4	CC	59	3,6±1,3	AA	46	3,7±1,4	GG	111	3,6±1,5

	CT	82	3,9±1,4	TG	89	3,6±1,3	CT	83	3,7±1,4	AC	101	3,4±1,3	GA	55	3,7±1,2
	TT	20	2,8±1,1	GG	37	3,4±1,3	TT	24	3,6±1,1	CC	20	4,4±1,4	AA	2	3,9±0,3
	Gesamt	172	3,7±1,4	Gesamt	165	3,6±1,3	Gesamt	166	3,6±1,3	Gesamt	167	3,6±1,4	Gesamt	168	3,6±1,4
BSG_6m	CC	73	31,3±26,2	TT	41	32,8±25,7	CC	62	29,3±25,8	AA	50	31,8±25,6	GG	116	29,9±27,4
	CT	83	31,5±26,0	TG	91	27,3±23,1	CT	83	29,5±23,2	AC	102	27,1±24,7	GA	56	29,2±20,5
	TT	22	18,8±15,6	GG	39	29,6±24,3	TT	27	30,5±22,5	CC	20	37,4±26,4	AA	2	48,5±0,7
	Gesamt	178	29,8±25,3	Gesamt	171	29,2±24,0	Gesamt	172	29,6±24,0	Gesamt	172	29,7±25,3	Gesamt	174	29,9±25,3
VAS_6m	CC	74	41,9±21,5	TT	41	43,2±22,2	CC	61	45,1±24,4	AA	48	47,2±24,2	GG	116	44,3±22,7
	CT	84	47,9±23,4	TG	91	43,3±22,9	CT	86	42,8±21,2	AC	105	40,5±20,9	GA	57	44,0±21,3
	TT	21	36,8±18,0	GG	38	46,7±22,5	TT	25	47,2±20,4	CC	20	53,2±19,3	AA	2	30,0±0,0
	Gesamt	179	44,2±22,3	Gesamt	170	44,0±22,6	Gesamt	172	44,3±22,2	Gesamt	173	43,9±22,0	Gesamt	175	44,0±22,1
TJC_6m	CC	71	2,4±3,9	TT	40	3,6±11,2	CC	59	2,4±3,3	AA	46	2,4±3,2	GG	113	3,0±7,3
	CT	84	3,4±8,1	TG	89	2,1±2,6	CT	85	3,0±8,1	AC	104	2,6±7,5	GA	56	2,0±2,9
	TT	20	0,9±1,4	GG	37	2,2±3,7	TT	24	1,9±2,6	CC	20	3,8±3,4	AA	2	1,5±2,1
	Gesamt	175	2,7±6,2	Gesamt	166	2,5±6,0	Gesamt	168	2,6±6,1	Gesamt	170	2,7±6,2	Gesamt	171	2,7±6,2
SJC_6m	CC	71	2,5±3,9	TT	40	3,3±4,2	CC	59	2,4±3,6	AA	46	2,1±3,2	GG	113	2,7±4,2
	CT	84	2,7±3,8	TG	89	2,4±3,6	CT	85	2,6±3,9	AC	104	2,4±3,7	GA	56	2,2±2,7
	TT	20	1,8±3,1	GG	37	1,6±2,8	TT	24	1,8±1,8	CC	20	3,7±5,0	AA	2	2,0±2,8
	Gesamt	175	2,5±3,8	Gesamt	166	2,5±3,6	Gesamt	168	2,4±3,6	Gesamt	170	2,5±3,7	Gesamt	171	2,5±3,7
DAS28_12m	CC	98	3,7±1,3	TT	56	4,0±1,5	CC	70	3,5±1,5	AA	65	3,7±1,4	GG	145	3,6±1,5
	CT	101	3,6±1,6	TG	101	3,5±1,3	CT	104	3,6±1,4	AC	119	3,4±1,4	GA	66	3,5±1,3
	TT	21	3,1±1,3	GG	52	3,3±1,4	TT	32	3,6±1,5	CC	27	3,9±1,6	AA	5	4,3±0,4
	Gesamt	220	3,6±1,4	Gesamt	209	3,6±1,4	Gesamt	206	3,6±1,4	Gesamt	211	3,6±1,4	Gesamt	216	3,6±1,4
BSG_12m	CC	98	30,6±28,5	TT	55	30,9±25,6	CC	70	27,6±26,2	AA	67	29,3±28,1	GG	145	28,4±26,9
	CT	101	26,8±22,6	TG	102	26,7±24,2	CT	105	26,5±20,6	AC	118	27,8±24,9	GA	67	27,8±23,6
	TT	22	24,6±24,1	GG	53	28,2±25,6	TT	32	32,3±28,7	CC	27	28,6±25,0	AA	5	32,8±15,7
	Gesamt	221	28,2±25,5	Gesamt	210	28,2±24,9	Gesamt	207	27,8±23,9	Gesamt	212	28,4±25,8	Gesamt	217	28,3±25,7

VAS_12m	CC	98	39,6±21,5	TT	55	41,3±23,8	CC	70	44,2±24,4	AA	66	43,1±23,7	GG	146	41,3±23,3
	CT	100	42,2±25,0	TG	102	42,3±22,3	CT	105	41,5±23,2	AC	119	38,8±22,2	GA	66	40,8±22,7
	TT	23	39,8±21,9	GG	53	38,3±25,5	TT	32	34,0±20,8	CC	27	45,6±24,7	AA	5	30,0±18,7
	Gesamt	221	40,8±23,1	Gesamt	210	41,0±23,5	Gesamt	207	41,2±23,4	Gesamt	212	41,0±23,0	Gesamt	217	40,9±23,0
TJC_12m	CC	98	2,9±3,9	TT	55	3,0±4,8	CC	70	2,2±3,7	AA	66	3,1±3,9	GG	145	2,3±4,0
	CT	101	2,4±4,1	TG	101	2,3±3,4	CT	105	2,5±3,9	AC	119	2,0±3,7	GA	67	2,6±3,8
	TT	22	1,1±2,8	GG	54	2,2±3,3	TT	32	2,9±4,7	CC	27	3,6±4,9	AA	5	5,4±2,1
	Gesamt	221	2,5±3,9	Gesamt	210	2,4±3,8	Gesamt	207	2,5±4,0	Gesamt	212	2,5±4,0	Gesamt	217	2,5±3,9
SJC_12m	CC	98	2,2±3,1	TT	55	3,7±5,3	CC	70	2,6±4,3	AA	67	2,8±3,7	GG	146	2,6±4,1
	CT	101	2,7±4,5	TG	102	2,4±3,3	CT	106	2,3±3,7	AC	119	2,1±3,6	GA	67	2,0±2,9
	TT	23	2,2±3,5	GG	54	1,6±2,7	TT	32	2,6±3,6	CC	27	3,0±4,3	AA	5	1,8±4,0
	Gesamt	222	2,4±3,8	Gesamt	211	2,5±3,9	Gesamt	208	2,5±3,9	Gesamt	213	2,4±3,8	Gesamt	218	2,4±3,8



**Anhang 2: RR, 95% KI und statistische Signifikanz (p-Wert) für das Therapieversagen der untersuchten SNP in Abhängigkeit des CCP-AK-Status, ergänzende Angaben zu Abb. 7**

		NRs n (%)	Rs n (%)	Σ	p	RR für NRs (95%KI)
MED29 (CC vs CT+TT) rs 10414216	Alle RA-Patienten	71 (27,5)	187 (72,5)	258	0,032	1,5 (1,02-2,3)
	CCPnegativ	10 (23,3)	33 (76,7)	43	0,761	0,8 (0,3-2,6)
	CCPpositiv	49 (29,7)	116 (70,3)	165	0,091	1,5 (0,9-2,4)
CLSTN2 (GG vs GT+TT) rs 1026773	Alle RA-Patienten	66 (26,6)	182 (73,4)	248	0,408	0,8 (0,5-1,4)
	CCPnegativ	10 (24,4)	31 (75,6)	41	0,113	2,4 (0,9-6,6)
	CCPpositiv	43 (27,2)	115 (72,8)	158	0,327	0,7 (0,4-1,4)
CLCN1 (GG vs GA+AA) rs 2103193	Alle RA-Patienten	64 (26,1)	181 (73,9)	245	0,199	1,1 (0,7-1,7)
	CCPnegativ	10 (24,4)	31 (75,6)	41	0,775	0,9 (0,3-2,6)
	CCPpositiv	45 (28,1)	115 (71,9)	160	0,236	0,7 (0,4-1,3)
FCGR3A (AA vs AC+CC) rs 396991	Alle RA-Patienten	67 (26,9)	182 (73,1)	249	0,535	1,2 (0,8-1,8)
	CCPnegativ	10 (23,8)	32 (76,2)	42	0,002	6,5 (1,6-26,9)
	CCPpositiv	46 (28,8)	114 (71,3)	160	0,158	0,6 (0,3-1,3)
PTPN22 (GA+AA vs GG) rs 2476601	Alle RA-Patienten	69 (27,3)	184 (72,7)	253	0,015	1,6 (1,1-2,5)
	CCPnegativ	10 (23,8)	32 (76,2)	42	0,391	0,6 (0,1-2,5)
	CCPpositiv	47 (29,0)	115 (71,0)	162	0,005	2,0 (1,3-3,3)

### Anhang 3: Übersicht über die verwendeten Materialien

<b>Chemikalien</b>		
<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller (Bestellnummer)</b>	<b>Sitz der Niederlassung</b>
Agarose	Sigma-Aldrich Co. (A - 9539)	Taufkirchen, Deutschland
Ethanol entwässert	Hauseigene Herstellung	Magdeburg, Deutschland
Aqua bidest., DNase frei, Rnase frei	Sigma-Aldrich Co. (W - 4502)	Taufkirchen, Deutschland

<b>Enzyme</b>		
<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller (Bestellnummer)</b>	<b>Sitz der Niederlassung</b>
Protease	Qiagen (130172309)	Hilden, Deutschland

<b>Puffer und Lösungen</b>		
<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller (Bestellnummer)</b>	<b>Sitz der Niederlassung</b>
Waschpuffer AW <sub>1</sub>	Qiagen (1014795)	Hilden, Deutschland
Waschpuffer AW <sub>2</sub>	Qiagen (1014575)	Hilden, Deutschland
Elutionspuffer AE	Qiagen (1017780)	Hilden, Deutschland
Lysepuffer AL	Qiagen (1017784)	Hilden, Deutschland
TBE-Puffer 10-fach konzentriert	Sigma-Aldrich Co. (T - 4415)	Taufkirchen, Deutschland

<b>Kits oder Kitsysteme</b>		
<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller (Bestellnummer)</b>	<b>Sitz der Niederlassung</b>
QIAamp® Blood Midi Kits	Quiagen (130173649)	Hilden, Deutschland

<b>Geräte</b>	
<b>Bezeichnung</b>	<b>Herrsteller</b>
Biofuge® Pico	Kendro, Osterode, Deutschland
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schüttler, Vortex VF 2	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UV Spectrophotometer, Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Taqman®, ABI PRISM™ 7900HT Sequence Detector System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Wasserbad E 18	Dinkelberg- Labortechnik GmbH, Neu-Ulm, Deutschland
Pipettierhilfe	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einkanal Pipetten ( <i>research</i> )	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

<b>Gebrauchswaren</b>	
<b>Gebrauchsware</b>	<b>Hersteller</b>
Sterile Pipettenspitzen (Einwegmaterial)	Molecular Bio Products, Inc., San Diego, CA, USA
Mikrotiterplatten, 384-Well Clear Optical Reaction Plate (Einwegmaterial)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Abdeckfolie, Optical Adhesive Film (Einwegmaterial)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

## Publikationen

Drynda S, **Glötzner M**, Kekow J. Verbesserung der Prädiktion des Therapieerfolg einer anti-TNF $\alpha$ -Therapie bei Patienten mit rheumatoider Arthritis durch Kombination verschiedener Biomarker. 38th Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh), September 2010, Hamburg. Abstract in *Z.Rheumatol* 2010; 69 Suppl 1:34.

Drynda S, Dube H, Wollenberg H, **Glötzner M**, Kekow J. Prediction of therapy response in anti-TNF $\alpha$  treated RA patients based on pre-treatment anti-CCP antibody levels. 6th Annual Conference of the German Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine ( DGKL), Oktober 2009, Leipzig. Abstract in *Clin Chem Lab Med* 2009; 47 No. 9:A65.

Drynda S, **Glötzner M**, Kekow J. Association of PTPN22 1858 C/T polymorphism and CCP antibodies with therapy outcome of patients treated with etanercept. *Annual European Congress of Rheumatology (EULAR)*, Juni 2008, Paris. Abstract in *Ann Rheum Dis* 2008; 67 Suppl 2:178.

Drynda S, Polter J, **Glötzner M**, Kekow J. Identification of biomarkers for the prediction of therapy response in anti-TNF  $\alpha$  treated RA patients. 36. Kongress der Deutschen Gesellschaft der Rheumatologie (DGRh), September 2008, Berlin. Abstract in *Z.Rheumatol* 2008; 67 Suppl 1:12.

Drynda S, **Glötzner M**, Polter J, Kekow J. Prediction of therapy response in anti-TNF  $\alpha$  treated RA patients based on the identification of biomarkers. Kongress des American College of Rheumatology (ACR), Oktober 2008, San Francisco, USA. Abstract in *Arthritis Rheum* 2008; 58 Suppl 9:S211.

## Darstellung des Bildungsweges

**Name:** Marietta Glötzner  
**Geburtsdatum:** 28.06.1983  
**Geburtsort:** Neumarkt i.d.OPf, Deutschland  
**Staatsbürgerschaft:** deutsch  
**Familienstatus:** ledig

**Schulen:**  
1989 - 1993: Grundschule Schwarzenbruck  
1993 - 2002: Leibniz-Gymnasium Altdorf  
2002: Allgemeine Hochschulreife

**Universitäten:**  
2003 - 2004: Studium der Humanmedizin an der Universität Louis Pasteur in Straßburg  
2004 - 2005: Studium der Humanmedizin an der Universität von Luxemburg  
2005 - 2010: Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
2010: Abschluss des Studiums der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg und Approbation als Ärztin

**Berufstätigkeit:**  
seit 2011 Weiterbildung zur Fachärztin in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde im AMEOS Klinikum St.Salvator Halberstadt

**Promotion:**  
seit 2007: Promotion in der Klinik für Rheumatologie im Fachkrankenhaus für Rheumatologie und Orthopädie GmbH Vogelsang-Gommern  
Einleitung des Promotionsverfahrens: September 2012  
Promotionsthema: „Biomarker basierte Vorhersage eines Therapieerfolges einer anti-TNF-alpha-Therapie bei Patienten mit rheumatoider Arthritis“

Magdeburg, 10.09.2012

(Marietta Glötzner)

## Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. habil. J. Kekow für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und die hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Dissertation danken.

Weiterhin danke ich Frau Dr. rer. nat. S. Drynda, rheumatologisches Forschungslabor an der Universität Magdeburg, für die zahlreichen Anregungen und Hilfestellungen sowie die Unterstützung bei den serologischen Untersuchungen.

Ich danke dem Institut für Biometrie und Medizinische Informatik der Universität Magdeburg, insbesondere Herrn Dr. rer. nat. F. W. Röhl, für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, Charlotte Glötzner, Ulrike Kern, Juliane Glötzner und Christoph Köhler für die Unterstützung und Hilfe.

Zudem danke ich allen Probanden und Patienten, ohne die keine Forschungsarbeit möglich gewesen wäre.

Abschließend ist es mir ein Anliegen allen meinen Dank auszusprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit sowohl direkt, als auch indirekt beigetragen haben – auch wenn sie hier nicht namentlich genannt sein sollten.

## Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Biomarker basierte Vorhersage eines Therapieerfolges  
einer anti-TNF-alpha-Therapie  
bei Patienten mit rheumatoider Arthritis**

in der Klinik für Rheumatologie im Fachkrankenhaus für Rheumatologie und Orthopädie GmbH Vogelsang-Gommern mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. med. habil. J. Kekow ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, 10.09.2012

Unterschrift

(Marietta Glötzner)