

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg  
(Professor Dr. med. Dieter Körholz)

**Single Nucleotid Polymorphismen im Promotor 1 des  
Interleukin-18-Gens und deren Bedeutung für die  
Autoimmunerkrankungen Juvenile idiopathische Arthritis  
und Systemischer Lupus erythematoses.**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Christina Krug

geboren am 20.09.1981 in Leipzig

Betreuer: Professor Dr. med. Gerd Horneff

Gutachter: Prof. Dr. Keyßer

Prof. Dr. Baerwald (Leipzig)

Verteidigungsdatum: 18.11.2008

Für Hilda

## Referat

Die Autoimmunerkrankungen Juvenile idiopathische Arthritis (JIA) und Systemischer Lupus erythematoses (SLE) werden durch verschiedene, bisher unbekannte Mechanismen ausgelöst. So könnte eine Dysregulation der Zytokinproduktion durch aktivierte T-Zellen eine Rolle in der Pathogenese dieser Autoimmunerkrankungen spielen. Ein Zytokin, welches die T-Helferzell 1 und -2-Immunantworten reguliert und somit am Ungleichgewicht der einzelnen Zytokine beteiligt sein kann, ist Interleukin-18 (IL-18). Untersuchungen zeigten eine positive Korrelation des IL-18-Serumspiegels mit der Krankheitsschwere des systemischen Typs der JIA und des SLE. Ebenso konnten Assoziationen verschiedener IL-18 Single Nucleotid Polymorphismen (SNP) mit den Erkrankungen Adult Onset Still Disease (AOSD), Rheumatoide Arthritis (RA) und JIA bei japanischen Patienten nachgewiesen werden.

Gegenstand der vorgelegten Arbeit ist es den möglichen Zusammenhang zwischen den SNP im Promotor 1 des IL-18-Gens und der Krankheitsmanifestation der JIA sowie des SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen innerhalb der kaukasischen Bevölkerung zu ermitteln. Die IL-18 SNP -137, -607 und -656 wurden in 226 JIA Patienten, 17 SLE-Patienten und 202 Kontrollpersonen bestimmt. Für die Genotypisierung wurde die sequenzspezifische Polymerasekettenreaktion (PCR) und Sequenzierung genutzt.

Die Allelkombination -137CG-607AA-656TT fand sich signifikant häufiger bei JIA-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollpersonen (11,5% vs 4,5%;  $p < 0,05$ ). Interessanterweise zeigt sich diese Allelkombination bei Kindern mit erosiven Gelenkveränderungen seltener (35,7% vs 63,6%,  $p = 0,07$ ). Die -137C-Allelfrequenz zeigt sich niedriger bei Patienten mit Rheumafaktor (RF) positiver Polyarthritiden im Vergleich zur Kontrollpopulation (14,3% vs 27,5%;  $p = 0,10$ ). Bei Kindern mit einer Polyarthritiden tritt das Allel -137C seltener als bei Kindern mit einer Oligoarthritiden auf ( $p = 0,05$ ). Der SNP -607A-656T findet sich bei der RF positiven Polyarthritiden seltener (32,1%;  $p = 0,20$ ) und bei der erweiterten Oligoarthritiden häufiger (50,9%;  $p = 0,30$ ) im Vergleich zur Kontrollpopulation (41,3%). Patienten mit diesem Allel erlangten häufiger die vollständige Remission ( $p = 0,10$ ). Für SLE-Patienten konnte für alle untersuchten SNP kein Zusammenhang zur Krankheitsmanifestation hergestellt werden.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass IL-18 eine Rolle in der Pathogenese der Autoimmunerkrankung JIA, aber nicht des SLE spielt. Vor allem aber scheint die Kombination mehrerer verschiedener Allele die Krankheitsentstehung oder den Verlauf zu beeinflussen.

Krug, Christina: Single Nucleotid Polymorphismen im Promotor 1 des Interleukin-18-Gens und deren Bedeutung für die Autoimmunerkrankungen Juvenile idiopathische Arthritis und Systemischer Lupus erythematoses. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 69 Seiten, 2008

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Juvenile idiopathische Arthritis (JIA) .....	1
1.2	Systemischer Lupus erythematoses (SLE) .....	4
1.3	Genetische und disponierende Faktoren .....	6
1.4	Bedeutung von Interleukin-18 (IL-18).....	9
1.5	IL-18-Rezeptor (IL-18R).....	13
1.6	Polymorphismen im IL-18-Gen .....	14
1.7	Ziel der Arbeit .....	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
2.1	Material .....	16
2.1.1	Geräte .....	16
2.1.2	Chemikalien und Substanzen .....	17
2.2	Patienten und Kontrollen.....	18
2.3	DNS-Isolierung .....	19
2.4	Nachweis der SNP im Promotor 1 des IL-18-Gens .....	19
2.4.1	DNS-Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	19
2.4.2	Sequenzspezifische PCR für IL-18-137 .....	22
2.4.3	Sequenzspezifische PCR für IL-18-607 .....	23
2.4.4	Sequenzspezifische PCR für IL-18-656 .....	24
2.4.5	Qualitativer Nachweis der SNP.....	25
2.5	Sequenzierung .....	26
2.5.1	Spezifische PCR für die Sequenzierung.....	26
2.5.2	Gel-Extraktion.....	27
2.5.3	Sequenzier-PCR .....	27
2.5.4	Fällung der Sequenzier-PCR.....	29
2.5.5	Sequenzierung .....	29
2.6	Statistik.....	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>
3.1	Kontrollpopulation .....	31
3.2	Patientenpopulation JIA .....	31
3.3	Der SNP IL-18-137 innerhalb der JIA-Population.....	33
3.4	Der SNP IL-18-607-656 innerhalb der JIA-Population .....	35

## Inhaltsverzeichnis

3.5	Patientenpopulation SLE.....	36
3.6	Die SNP -137 und -607-656 innerhalb der SLE-Population.....	37
3.7	Allelkombinationen der SNP -137-607-656 innerhalb der JIA- und SLE-Population .....	38
3.7.1	JIA-Population .....	39
3.7.2	SLE-Population .....	40
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>41</b>
4.1	JIA .....	41
4.1.1	Der SNP IL-18-137 innerhalb der JIA-Population .....	43
4.1.2	Der SNP IL-18-607-656 innerhalb der JIA-Population.....	45
4.1.3	Allelkombinationen der SNP -137-607-656 innerhalb der JIA-Population.....	45
4.2	SLE.....	47
4.3	Weitere Autoimmunerkrankungen und deren Zusammenhang zu den SNP im IL-18-Gen.....	49
4.3.1	Rheumatoide Arthritis (RA).....	49
4.3.2	Sarkoidose .....	50
4.3.3	Diabetes mellitus Typ1.....	50
4.3.4	Multiple Sklerose (MS).....	51
4.4	Fazit.....	52
<b>5</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>Thesen .....</b>	<b>68</b>

## Symbole und Abkürzungen

## Symbole und Abkürzungen

A	Adenin
AK	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
AOSD	Adult onset Still's disease
bp	Basenpaare
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
C	Cytosin
cAMP	Cyclisches Adenosin 3', 5' Monophosphat
CREB	cAMP-responsive element-binding protein
CRP	C-reaktives Protein
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ds-DNS-AK	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure-Antikörper
G	Guanin
GAG	Glykosaminoglykan
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
HLA	Histokompatibilitätsantigene
H4TF-1	Histon H4 Gen spezifischer Transkriptionsfaktor 1
ICAM-1	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1
ICE, Caspase 1	Interleukin-1 beta converting enzyme
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IKK	Inhibitorische $\kappa$ B-Kinasen
IL	Interleukin
IL-18R	Interleukin-18-Rezeptor
ILAR	International League of Association for Rheumatology
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor-Aktivierungskinasen
JIA	Juvenile idiopathische Arthritis
kD	Kilodalton
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
min	Minute(n)
MMP	Matrix-Metalloproteinasen

## Symbole und Abkürzungen

µm	Mikromolar
NFκB	Nuklearfaktor κB
NIK	Nuklearfaktor-induzierende Kinase
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
PCR	Polymerasekettenreaktion
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SLEDAI	systemic lupus erythematosus disease activity
Sm-AK	Smith-Antikörper
SNP	Single Nucleotid Polymorphismus/men
T	Thymin
Th0-Zelle	T-Helferzelle 0
Th1-Zelle	T-Helferzelle 1
Th2-Zelle	T-Helferzelle 2
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
TRAF-6	Tumornekrosefaktor-Rezeptor gebundener Faktor 6
VCAM-1	Gefäßzell Adhäsionsmolekül 1
VR	vollständige Remission
ZNS	Zentralnervensystem

## Abbildungen

### Abbildungen

Abbildung 1.1: Spaltung von proIL-18 durch Caspase 1 und 3.....	10
Abbildung 1.2: IL-18 und seine Wirkung auf Th1- (blau) und Th2-Zellen (rot).....	11
Abbildung 1.3: Pleiotrope Funktion von IL-18 in der entzündlichen Arthritis .....	12
Abbildung 1.4: Model für die IL-18-Signaltransduktion .....	14
Abbildung 2.1: Aufbau der DNS-Doppelhelix .....	20
Abbildung 2.2: Der zyklische Temperaturverlauf der PCR .....	21
Abbildung 2.3: Angabe über Fragment-Größen der Markerbanden .....	25
Abbildung 2.4: Fotografie des Gels IL-18-656.....	26
Abbildung 2.5: Kettenabbruch durch fehlendes 3'-OH Ende des ddNTP .....	28
Abbildung 2.6: Aufbau des Detektionssystem des ABI PRISM 310.....	29
Abbildung 2.7: Sequenzierausdruck für eine heterozygote DNS-Probe.....	30

## 1 Einleitung

### 1.1 Juvenile idiopathische Arthritis (JIA)

Die JIA ist mit einer Inzidenz von 10-20/100000 die häufigste chronische systemische Autoimmunerkrankung im Kindesalter. Nach der International League of Association for Rheumatology (ILAR) ist sie definiert als Arthritis unbekannter Ätiologie mit einem Krankheitsbeginn vor dem vollendeten 16. Lebensjahr und einer Mindestdauer von sechs Wochen (Petty et al., 2004). Die Klassifikation erfolgt nach klinischen und serologischen Merkmalen in sieben Unterformen, wobei für die Einordnung die Anzahl der entzündeten Gelenke und die extraartikulären Manifestationen während der ersten sechs Erkrankungsmonate entscheidend sind. Das Komplikationsrisiko und die Prognose sind für jeden Subtyp unterschiedlich.

#### 1. Systemische Arthritis (JIA 1)

Diese Form ist gekennzeichnet durch eine Arthritis in einem oder mehreren Gelenken, begleitet von ein bis zwei Fieberspitzen täglich über zwei Wochen und mindestens einem der folgenden Manifestationen: makulopapulöses Exanthem, Lymphadenopathie, Hepato- und/oder Splenomegalie oder Serositis.

#### 2. Seronegative Polyarthritits (JIA 2)

Die seronegative Polyarthritits ist definiert als Arthritis in fünf oder mehr Gelenken in den ersten sechs Erkrankungsmonaten ohne Nachweis von Rheumafaktoren (RF).

#### 3. Seropositive Polyarthritits (JIA 3)

Merkmale dieses Subtyps sind eine Arthritis in mindestens fünf Gelenken und ein positiver RF. Dieser muss zweimalig im Abstand von zumindest drei Erkrankungsmonaten positiv getestet werden.

#### 4. Oligoarthritis (JIA 4a und 4b)

Bei der Oligoarthritis sind in den ersten sechs Erkrankungsmonaten ein bis maximal vier Gelenke betroffen. Es werden zwei Subtypen unterschieden:

- a) Die persistierende Oligoarthritis, die auch nach den ersten sechs Erkrankungsmonaten durch einen Befall in maximal vier Gelenken gekennzeichnet ist.
- b) Die erweiterte Oligoarthritis, die sich nach den ersten sechs Erkrankungsmonaten auf mindestens fünf Gelenke ausbreitet.

#### 5. Enthesitis assoziierte Arthritis (JIA 5)

Sie ist definiert als eine Arthritis und eine Enthesitis oder eine Arthritis oder Enthesitis mit mindestens zwei der folgenden Manifestationen:

- Schmerzen im Iliosakralgelenk und/oder in der Lumbosakralregion
- HLA-B27 positiv
- Jungen mit Erkrankungsbeginn ab dem vollendeten sechsten Lebensjahr
- Akute (symptomatische) Uveitis anterior mit Schmerzen, Rötung und Lichtscheueheit
- Auftreten einer ankylosierenden Spondylitis, einer Enthesitis assoziierten Arthritis, einer Sakroiliitis bei entzündlicher Darmerkrankung (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa), eines Morbus Reiter oder einer akuten Uveitis anterior bei Verwandten ersten Grades

#### 6. Psoriasisarthritis (JIA 6)

Bei diesem Subtyp besteht neben der Arthritis eine Psoriasis oder es besteht eine Arthritis bei der mindestens zwei der folgenden Merkmale, Daktylitis, Nageltüpfelung und/oder Onycholysis, psoriasisähnliche Hautveränderungen und Auftreten einer Psoriasis bei Verwandten ersten Grades, manifest sind.

#### 7. Nicht klassifizierte Arthritiden (JIA 7)

In diese Gruppe gehören Arthritiden, die entweder die Kriterien für die Subtypen eins bis sechs nicht erfüllen, oder mehreren Kategorien zuzuordnen sind.

%	JIA-Subtypen	♀ : ♂	Extraartikuläre Manifestation
10	Systemische Arthritis	♀ = ♂	Fieber, Exanthem, Hepatosplenomegalie, Perikarditis, Pleuritis, Lymphadenopathie, Vaskulitis, Minderwuchs, Dystrophie, Makrophagen-Aktivierungs-Syndrom
20-30	Seronegative Polyarthritis	♀ >> ♂	Subfebrile Temperaturen, Tenosynovitis, Uveitis, Vaskulitis
5-10	Seropositive Polyarthritis	♀ >>> ♂	Subfebrile Temperaturen, Tenosynovitis, Uveitis, Rheumaknoten, Vaskulitis
30-40	Persistierende Oligoarthritis Erweiterte Oligoarthritis	♀ >> ♂	Chronische Uveitis Chronische Uveitis
15-20	Arthritis und Enthesitis	♀ << ♂	Enthesitis, akute Uveitis
5-10	Arthritis und Psoriasis	♀ > ♂	Psoriasis, Uveitis
5	Nicht klassifizierbare Arthritis		

Tabelle 1.1: Klassifikation der JIA

Angaben von Häufigkeiten schwanken in verschiedenen Literaturangaben.

Charakterisiert ist die JIA durch eine massive Infiltration der Synovia durch in Lymphfollikeln organisierten und proliferierenden Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen, die durch verschiedene proinflammatorische Zytokine, wie Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-18 (IL-18), Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) bewirkt wird (Kawashima et al., 2001; Maeno et al., 2002). Gattorno und Mitarbeiter untersuchten bei 44 Patienten aus Synovialflüssigkeit gewonnene T-Zellklone. Sie ermittelten bei 27 Patienten ein T-Helfer 1 (Th1)-Zell-Phänotyp, bei 17 ein T-Helfer 0 (Th0)-Zell-Phänotyp, aber bei keiner Person einen T-Helfer 2 (Th2)-Zell-Phänotyp (Gattorno et al., 1997). Auch andere Arbeitsgruppen zeigten, dass die Th1-Zelle vorherrschend in der Synovia bei Patienten mit einer JIA und einer Rheumatoiden Arthritis (RA) ist (Kjeldsen-Kragh et al., 1990; Miltenburg et al., 1992; Dolhain et al., 1996).

Die destruktiven Gelenkveränderungen bei der JIA werden u. a. durch IFN $\gamma$  ausgelöst. Dieses aktiviert Makrophagen und führt zur Synthese weiterer Zytokine (IL-1, TNF $\alpha$ ), welche wiederum T-Zellen aktivieren sowie Fibroblasten und Chondrozyten zur Sekretion gelenkdestruktiver Proteasen, wie Metalloproteinasen anregen (Arend et Dayer, 1990).

## 1.2 Systemischer Lupus erythematoses (SLE)

Der SLE ist eine multisystemische Autoimmunerkrankung unbekannter Ätiologie, innerhalb dessen Verlauf verschiedene Organe und Gewebe durch pathologische Autoantikörper und Immunkomplexe zerstört werden. Mit einer Inzidenz im Kindesalter von 1/100000 tritt der juvenile SLE deutlich seltener als die JIA auf. Etwa 15-20% der SLE-Erkrankungen manifestieren sich in der Kindheit und Jugend. Manifestiert sich der SLE vor dem fünften Lebensjahr, ist er mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Brunner et al., 2002). Mädchen erkranken bis zu neunmal häufiger als Jungen (Dubois et Tufanelli, 1964). Zwischen dem 5. und 10. Lebensjahr sind Jungen und Mädchen in etwa gleich häufig betroffen. Erst mit dem Eintritt in die Pubertät erkranken Mädchen häufiger, was vermutlich auf hormonelle Veränderungen zurückzuführen ist (Cervera et al., 1993; McMurray et May, 2003). Bei Manifestation vor dem 14. Lebensjahr finden sich häufiger Nephritiden, Lymphadenopathien und Exantheme (Font et al., 1998). Bei Patienten mit einem späten Krankheitsbeginn (über dem 50. Lebensjahr) nimmt die Krankheitsschwere ab und die Geschlechterverteilung gleicht sich wieder etwas an ( $\text{♀}:\text{♂} = 6:1$  für Patienten mit einer Erstmanifestation über dem 50. Lebensjahr) (Ho et al., 1998; Mok et al., 2005). Klassifikationskriterien der American College of Rheumatology (ACR) werden häufig auch zur Diagnosestellung genutzt (Tabelle 1.2) und beschreiben die klinische Vielfalt der Erkrankung recht eindrucksvoll. Zur sicheren Diagnose sollten sich mindesten vier der elf Kriterien entweder gleichzeitig oder im Verlauf der Erkrankung manifestieren (Tan et al., 1982).

Befund/Organ	Manifestation
Haut	1. Schmetterlingserythem 2. Diskoider Lupus 3. Photosensibilität
Schleimhaut	4. Orale oder nasale Ulzerationen (meist schmerzlos)
Gelenke	5. Nicht-erosive Arthritis
Seröse Häute	6. Pleuritis, Perikarditis
Niere	7. Nephritis mit Proteinurie >0,5g/d und/oder zellulären Zylindern
ZNS	8. Krampfanfälle, Psychosen
Hämatopoese	9. Coombs-Test-positive hämolytische Anämie, Leukopenie <4000/mm <sup>3</sup> , Lymphopenie <1500/mm <sup>3</sup> , Thrombozytopenie <100 000/mm <sup>3</sup>
Autoimmunphänomene	10. Antikörper gegen native Doppelstrang-DNS und/oder Sm-Antigen und/oder Phospholipide
Antinukleäre Antikörper	11. Antinukleäre Antikörper (ANA), meist mit Antigen homogenen oder peripherem Fluoreszenzmuster

Tabelle 1.2: Klassifikationskriterien des SLE (ACR 1982)

Vom schleichenden Verlauf mit Arthralgien sowie verschiedenen Hauterscheinungen über mehrere Jahre bis hin zu hoch akut auftretendem Fieber oder schwerer Nephritis ist das Krankheitsbild des SLE und damit auch die Prognose sehr variabel. Arthralgien sind das häufigste Symptom. Beim Auftreten von Arthritiden treten selten erosive oder deformierende Gelenkveränderungen auf. Das Leitsymptom an der Haut ist das Schmetterlingserythem, welches sich teilweise erst nach mehreren Jahren ausbildet. Es ist im Kindesalter initial bei 30-50% der Patienten vorhanden. Eine weitere häufige Manifestation ist die Lupusnephritis (chronische Glomerulonephritis), die mit Mikrohämaturie, Proteinurie sowie arterieller Hypertonie einhergeht und bis zur Niereninsuffizienz oder zum plötzlichen Nierenversagen führen kann. Auch Symptome des Zentralen Nervensystems (ZNS) wie Kopfschmerz, Krampfanfälle und neuropsychiatrische Manifestationen werden im Kindesalter bei circa 20-40% der Patienten beobachtet. Weitere bevorzugt befallene Organe sind Herz, Lunge und Atemwege, Augen, endokrine Organe und der Gastrointestinaltrakt. Als krankheitsspezifisch gilt der Nachweis von Antikörpern gegen native Doppelstrang-Desoxyribonucleinsäure (ds-DNS-AK). Im Verlauf der Erkrankung können weitere Autoantikörper, so z.B. Smith-Antikörper (Sm-AK), hinzukommen.

Charakterisiert ist der SLE durch eine polyklonale und antigenspezifische Stimulation der T- und B-Lymphozyten (Amital et Schoenfeld, 1999). Die Ursache ist noch unklar. Aktuelle Studien zeigen, dass die Dysregulation der Zytokinproduktion durch aktivierte T-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des SLE spielt (Horwitz et al., 1997). Auch konnte ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Serumkonzentration der Interleukine (IL)-6, -10, -12, -18 sowie TNF $\alpha$  bei SLE-Patienten und der Krankheitsaktivität hergestellt werden (Spronk et al., 1992; al-Janadi et al., 1993; Lee et al., 1998; Park et al., 1998; Tokano et al., 1999; Davas et al., 1999). Dieses Ungleichgewicht zwischen den Th1-Zytokinen, welche die zellvermittelte Immunantwort induzieren, und den Th2-Zytokinen, welche die Antikörperproduktion stimulieren, trägt höchstwahrscheinlich zur Krankheitsentstehung des SLE bei (Mosmann et Coffman, 1989; Horneff, 2006).

### 1.3 Genetische und disponierende Faktoren

Die Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises JIA und SLE gehören zu den multifaktoriell bedingten Erkrankungen, bei denen sich kein Mendelscher Erbgang nachweisen lässt. Aufgrund der vielfältigen Unterformen und Ausprägungsgrade scheint das Zusammenspiel mehrerer Gene (Epistasis) von Bedeutung für die Krankheitsmanifestation zu sein. Auch der polygene Vererbungsmechanismus und die variable Kombination verschiedener disponierender Gene sind am Krankheitsausbruch beteiligt. Die unterschiedlichen Varianten innerhalb einer Autoimmunerkrankung werden u. a. durch unvollständige Penetranz geprägt. In den letzten Jahren versuchten mehrere Arbeitsgruppen die Ursachen der JIA und des SLE zu erforschen und damit auch deren Behandlungsmöglichkeiten zu verbessern. Dabei stehen vor allem verschiedene Polymorphismen auf den unterschiedlichsten Genen wie Histokompatibilitätsantigene (HLA), Zytokine und Metalloproteinasen im Mittelpunkt vieler Untersuchungen.

Die erste HLA-Assoziation bezüglich der JIA wurde zwischen oligoarthritischen, älteren Jungen und HLA-B27 gefunden (Rachelefsky et al., 1974). Weitere Zusammenhänge konnten zwischen HLA-A2 und oligoarthritischen Mädchen aufgedeckt werden (Oen et al., 1982). Die am weitesten ausgeprägte Assoziation innerhalb der HLA-Klasse II wurde zwischen den DRB1\*08, DQA1\*04 und DQB1\*04 Allelen und der Rheumafaktor negativen Polyarthritiden sowie der juvenilen ankylosierenden Spondylitis beobachtet (Fernandez-Vina et al., 1990; Ploski et al., 1993; Ploski et al., 1995; Ploski, 1997; Albert et Scholz, 1998).

JIA-Subtyp	HLA-Klasse II Assoziationen		
	Allele treten gehäuft auf	Allele treten vermindert auf	Literatur
systemische Arthritis	DR4		Miller et al., 1985; Date et al., 1999
seronegative Polyarthritits	DR8, DQ4, DP3		Ploski et al., 1993; Paul et al., 1995
seropositive Polyarthritits	DR4		Forre et al., 1983; Clemens et al., 1983)
Oligoarthritits	DR5, DR6, DR8, DQ4, DQ5, DQ6	DR4, DR7	Fernandez-Vina et al., 1990; Ploski et al., 1993; Haas et al., 1994

Tabelle 1.3: Assoziationen zwischen JIA und HLA-Klasse II

Alsaeid und Mitarbeiter untersuchten 64 Kinder mit Polyarthritits oder Oligoarthritits und 64 gesunde Kontrollpersonen hinsichtlich der HLA-DR3 Allele. Bei Kindern mit Oligoarthritits traten diese vermehrt auf (Alsaeid et al., 2003). Auch können spezielle Krankheitsmanifestationen durch HLA-Gene beeinflusst werden. So findet sich das DRB1\*1101 Allel vor allem bei Augenerkrankung bei an JIA erkrankten Patienten (Forre et al., 1983; van Kerckhove et al., 1991; Ploski et al., 1993). Weitere immunologische Untersuchungen ergaben, dass auch HLA unabhängige Vorgänge an der Pathogenese der JIA beteiligt sind. In einer norwegischen Population konnte der Polymorphismus im Promotor des IL-1 $\alpha$ -Gens mit der frühkindlichen Oligoarthritits, vor allem bei Manifestation einer Iridozyklitis, assoziiert werden (McDowell et al., 1995). Auf dem CTLA4-Gen wurde der Single Nucleotid Polymorphismus (SNP) -318 mit der RA und der JIA in Verbindung gebracht (Milterski et al., 2004). De Benedetti und Mitarbeiter zeigten, dass der SNP an Position -173 auf dem Gen des macrophage migration inhibitory factor (MIF) mit der JIA im Zusammenhang steht. Patienten, die ein C-Allel trugen, besaßen im Vergleich zu Patienten mit einem G-Allel einen signifikant erhöhten MIF-Serumspiegel (De Benedetti et al., 2003).

Der erste Zusammenhang zwischen den HLA und dem SLE wurde 1971 durch Grumet und Mitarbeiter beschrieben. Individuen mit HLA-B8 entwickelten signifikant häufiger einen SLE (Grumet et al., 1971). Später zeigten sich weitere Assoziation zu den HLA-Klasse II DR2 und DR3 Molekülen. Interessanterweise ergab sich zu HLA-B8 ein Kopplungsgleichgewicht (Gibofsky et al., 1978; Reinertsen et al., 1978; Schur et al., 1982).

Einfluss auf den SLE hat auch der angeborene Mangel der Komplementfaktoren C1q, C2 und C4 (Pickering et Walport, 2000). So tritt der homozygote C1q Mangel sehr selten auf, doch entwickeln über 90% der betroffenen Personen einen SLE (Botto et al., 1998; Mitchell et al., 2002). Der Komplementfaktor C1q ist mitverantwortlich für die Beseitigung der apoptotischen Zellen und spielt somit eine wichtige Rolle für die Immuntoleranz. Auch bei einem Mangel der Komplementfaktoren C2 oder C4 entwickelt sich bei circa 33-75% der Individuen ein SLE (Pickering et Walport, 2000). Neben den Komplementfaktoren spielen auch die Fc-Rezeptoren eine Rolle bei der Entstehung des SLE. Sie beeinflussen die Immunglobulin G (IgG)-Bindungsaffinität und sind wichtig für die Beseitigung von Immunkomplexen. Der Polymorphismus FcγRIIIa-158V/F konnte als ein Risikofaktor des SLE ermittelt werden. FcγRIIIa-158F wurde signifikant häufiger bei SLE-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollpopulation gefunden werden ( $p=0,003$ ). Dies weist daraufhin, dass Makrophagen, die diese Isoform exprimieren, an der fehlerhaften Beseitigung der Immunkomplexe bei SLE-Patienten mitbeteiligt sind (Koene et al., 1998). Andere Studiengruppen konnten weitere genetische Faktoren, wie das Mannose-bindende Protein (Davies et al., 1995), die Poly-ADP-Ribose-Polymerase (Tsao et al., 1999), das IL-10 (Eskdale et al., 1997) oder den TNF $\alpha$  (Tsao et al., 2002) mit dem SLE in Verbindung bringen.

Weiterhin werden auch Geschlecht, Erkrankungsalter, familiäre Häufung und auch Umwelteinflüsse für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen diskutiert (Tabelle 1.4).

Disponierende Faktoren	JIA	SLE
Verstärkte Sexualsteroid	In vielen Subtypen sind Mädchen häufiger betroffen (siehe Tabelle 1.1)	Frauen zwischen Menarche und Menopause bis zu neunmal häufiger betroffen als Männer (Dubois et Tufanelli, 1964)
Erhöhtes Risiko bei bereits erkrankten Geschwistern	Für die Oligoarthritis nachgewiesen (Moroldo et al., 2004)	Konkordanzrate für eineiige Zwillinge 24-57%, für zweieiige Zwillinge 2-5% und für die Durchschnittsbevölkerung 0,05-1% (Block et al., 1975; Deapen et al., 1992)
Klinische Merkmale mit familiärer Häufung	Leukozytose, Tenosynovitis, positiver Rheumafaktor, Anämie und positive ANAs (Moroldo et al., 2004)	Thrombozytopenie, diskoides Exanthem, neurologische Veränderungen und hämolytische Anämie (Tsao et al., 2002)
Ethnische Zugehörigkeit	Systemischer Typ in Europa bei 10%, in Japan bei 50% anzutreffen (Fujikawa et Okuni, 1997)	Tritt bei Nicht-Kauasiern dreimal so häufig auf wie bei Kauasiern (Font et al., 1998; Hess, 1999)

Tabelle 1.4: Verschiedene disponierende Faktoren

#### 1.4 Bedeutung von Interleukin-18 (IL-18)

Humanes IL-18, ursprünglich beschrieben als Interferon- $\gamma$ - inducing factor (IGIF), ist ein 18 Kilodalton (kD) schweres Glykoprotein, welches vorwiegend von Makrophagen und Kupfferschen Zellen gebildet wird. Es wurde erstmals 1989 durch Nakamura und Mitarbeitern beschrieben (Nakamura et al. 1989) und gehört zur IL-1-Superfamilie. Ähnlich wie IL-1 $\beta$ , wird IL-18 als eine inaktive Vorstufe synthetisiert. Diese wird durch das IL-1 $\beta$  converting enzyme (ICE, Caspase 1), eine intrazelluläre Protease, zwischen der Aminosäure Asp35 und Asn36 gespalten. Dadurch entsteht die biologisch aktive Form (Gu et al., 1997). Auch die Caspase 3 kann proIL-18 spalten, wobei meist nur inaktive Fragmente entstehen (Akita et al., 1997). (Abbildung 1.1)

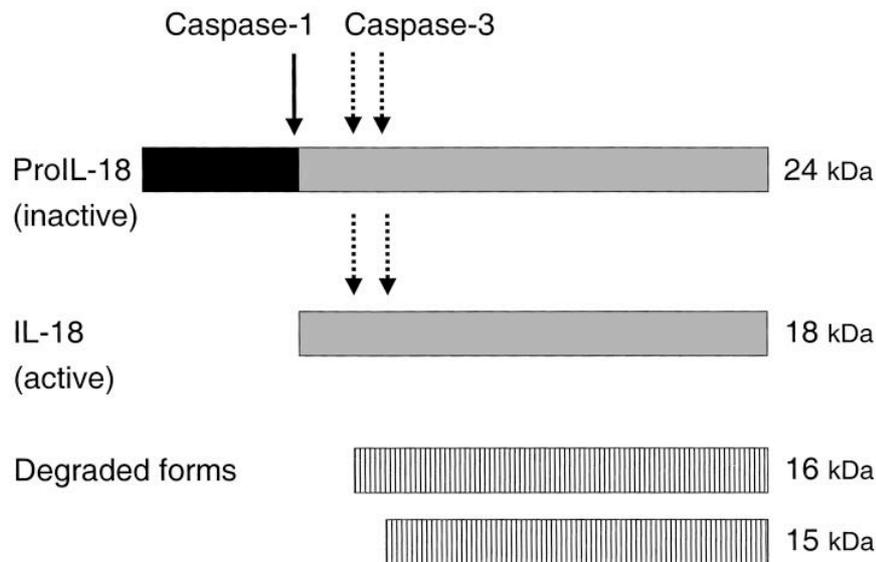


Abbildung 1.1: Spaltung von proIL-18 durch Caspase 1 und 3 (Pirhonen, 2001)

IL-18, ein proinflammatorisches Zytokin, ist Bindeglied zwischen der angeborenen und erworbenen Immunität. Es verstärkt, zusammen mit IL-12, die Reifung von Th1-Zellen aus nativen Th0-Zellen und induziert in der Th1-Antwort die Produktion von Interferon- $\gamma$  (INF $\gamma$ ) (Yoshimoto et al., 1998; Tominaga et al., 2000). In Abwesenheit von IL-12 bewirkt IL-18 die Stimulation von Th2-Zytokinen, z.B. bei allergischen Reaktionen und dem SLE (Nakanishi et al., 2001; Esfandiari et al., 2001). Es ist somit ein Zytokin, welches abhängig vom immunologischen Status (Zytokinmilieu) Th1- und Th2-Zellen induzieren kann (Abbildung 1.2).

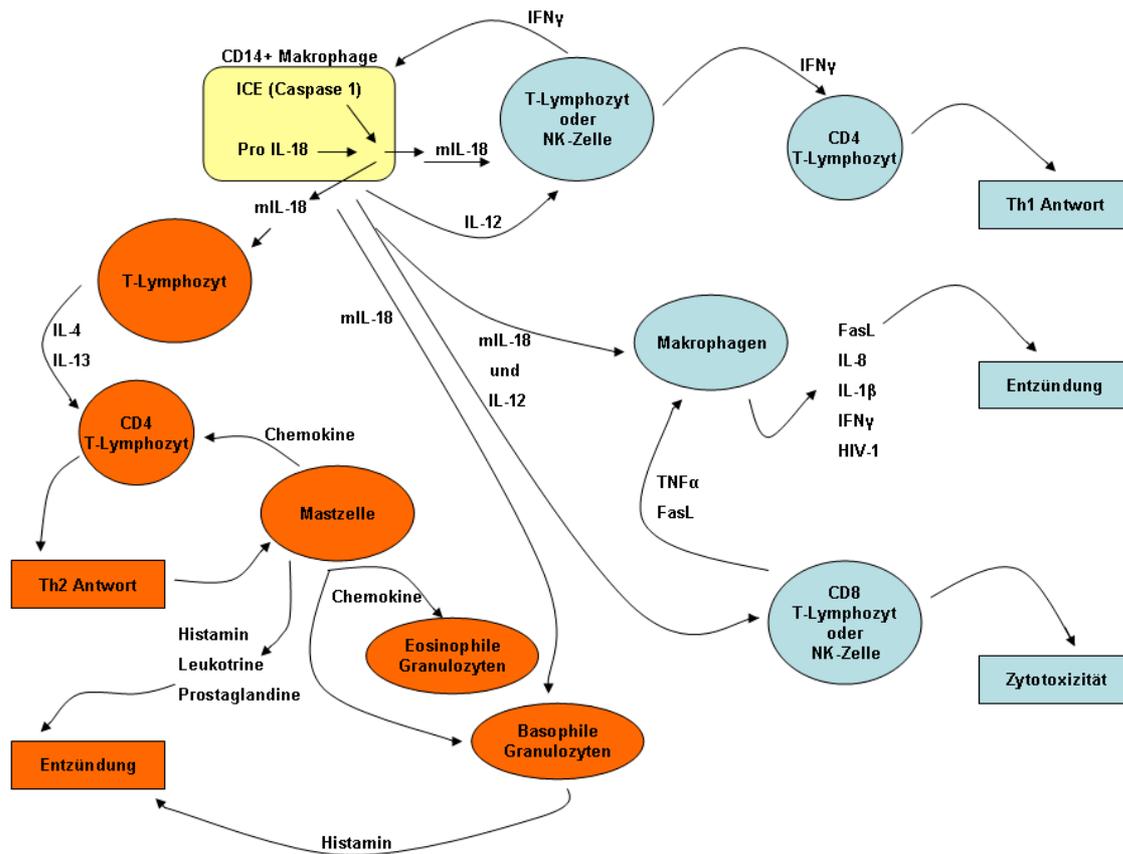


Abbildung 1.2: IL-18 und seine Wirkung auf Th1- (blau) und Th2-Zellen (rot) (modifiziert nach Dinarello, 1999; Nakanishi et al., 2001)

IL-18, welches mit IL-12 und IL-15 synergistische Funktionen ausübt, führt zu vermehrter Zytokinfreisetzung, neben IFN $\gamma$  vor allem von TNF $\alpha$ , Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierendem Faktor (GM-CSF) und IL-1 $\beta$  (Gracie et al., 2003; Dinarello et Moldawer, 2002). Weiterhin ist IL-18 an degenerativen Effekten innerhalb des Gelenkknorpels beteiligt:

- Reduzierung der Chondrozytenproliferation,
- Hochregulation der inducible nitric oxide synthase (iNOS)
- Hochregulation der Stromelysin und Cyclooxygenase 2 Expression und
- Verstärkung der Glykosaminoglykan (GAG) Freisetzung.

IL-18 verstärkt die Neutrophilenaktivierung und die dort stattfindende Zytokinfreisetzung und Degranulation (Leung et al., 2001). Weiterhin induziert es die synoviale Chemokinsynthese und Angiogenese, sowie auch die Hochregulation der intrazellulären Adhäsionsmoleküle 1 (ICAM-1) und der vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), welche durch Endothelzellen und Synovialfibroblasten exprimiert werden (Morel et al. 2002). Neben diesen

vielfältigen Effekten, die vor allem bei der entzündlichen Arthritis (Abbildung 1.3) eine Rolle spielen, scheint IL-18 an weiteren Erkrankungen mitbeteiligt zu sein:

- Autoimmunerkrankungen, wie dem Insulinabhängigen Diabetes mellitus (Ide et al., 2004), der RA (Gracie et al., 1999) und dem SLE (Wong et al., 2000; Esfandiari et al., 2001)
- Entzündlichen Darmerkrankungen, z.B. Morbus Crohn (Monteleone et al., 1999)
- Systemisch entzündlichen Erkrankungen, wie der Sepsis (Netea et al., 2000) und dem Asthma bronchiale (Heinzmann et al., 2004).

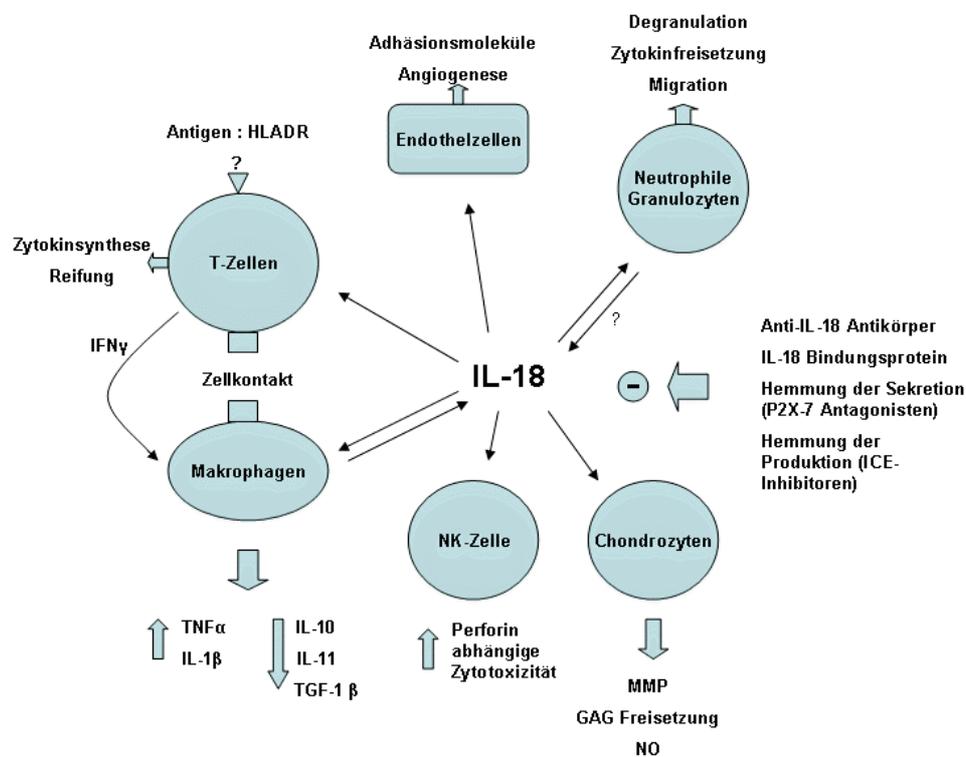


Abbildung 1.3: Pleiotrope Funktion von IL-18 in der entzündlichen Arthritis (modifiziert nach Hyodo et al., 1999 und Gracie, 2004)

## 1.5 IL-18-Rezeptor (IL-18R)

Der IL-18-Rezeptorkomplex wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert, dazu gehören B- und T-Lymphozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Endothelzellen und glatte Muskelzellen (Hyodo et al., 1999; Leung et al., 2001; Afkarian et al., 2002; Gerdes et al., 2002). Durch IL-12 kann der Rezeptor auf nativen T-Zellen, Th1- und B-Zellen hochreguliert werden (Yoshimoto et al., 1998; Hoshino et al., 1999). Im Gegensatz dazu wird er durch IL-4 auf T-Zellen herunterreguliert (Smeltz et al., 2001). Der IL-18R ist Mitglied der IL-1-Rezeptorfamilie. Er besteht aus einer gebundenen  $\alpha$ -Kette (IL-1R-related protein) und einer nicht gebundenen  $\beta$ -Kette (IL-1R-accessory protein). Die  $\alpha$ -Kette ist ein stabiler Marker für reife Th1-Zellen (Xu et al., 1998). IL-18 bindet an die IL-18R $\alpha$ -Kette und rekrutiert die  $\beta$ -Kette, welche nicht an den Liganden IL-18 bindet, aber die Affinität des nun heterodimeren Komplexes erhöht (Born et al., 1998). Durch Bindung von MyD88 an den IL-18R-Komplex wird die IL-1-Rezeptor-Aktivierungskinasen (IRAK) phosphoryliert (Croston et al., 1995). Diese dissoziiert vom Rezeptorkomplex und bindet an den TNF-Rezeptor-gebundenen Faktor 6 (TRAF-6) (Cao et al., 1996). Dieser phosphoryliert die Nuklearfaktor-induzierende Kinase (NIK) (Malinin et al., 1997), die dann die inhibitorischen  $\kappa$ B-Kinasen (IKK-1 und IKK-2) phosphoryliert (DiDonato et al., 1997). Einmal phosphoryliert, zerfällt I $\kappa$ B rasch und setzt den Nuklearfaktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) frei, welcher im Nukleus zur Transkription bestimmter Genabschnitte führt.

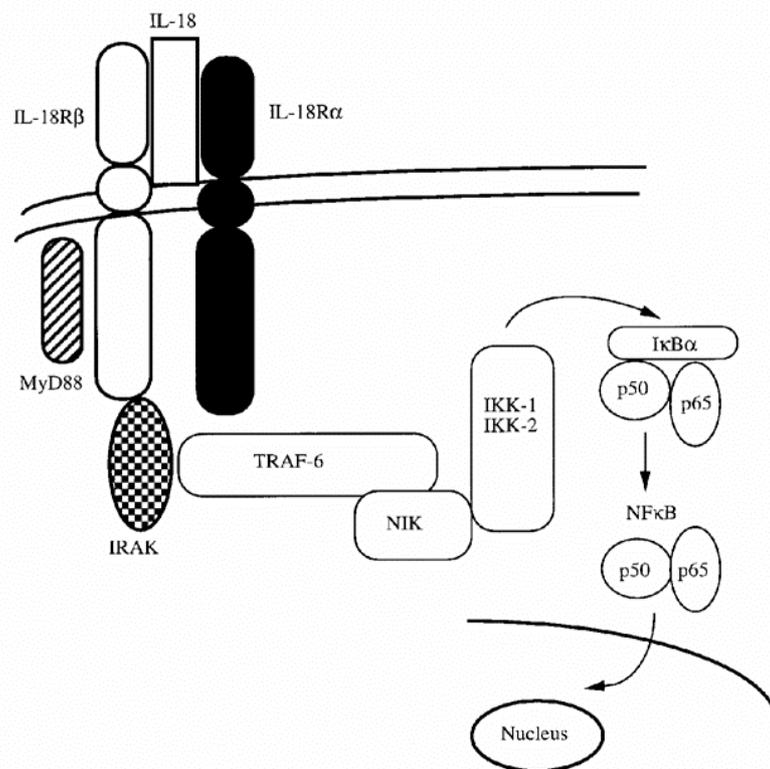


Abbildung 1.4: Model für die IL-18 Signaltransduktion (Dinarello, 1999)

## 1.6 Polymorphismen im IL-18-Gen

Das Gen für humanes IL-18 liegt auf dem Chromosom 11q22.2-22.3 und besitzt sechs Exons und zwei Promotoren. Aufgrund dieses Aufbaus ist die Genexpression von IL-18 sehr komplex (Seya et al., 2001). Es sind bereits mehrere SNP beschrieben worden. Die bekanntesten sind -137, -607 sowie -656 im Promotor 1 und -132, -133 sowie -920 im Promotor 2 und 113, 127 im Exon 1 (Kruse et al., 2003). Ein wichtiger Polymorphismus im Promotor 1 ist -137 (G/C). Er besitzt eine GATA3 Bindungsstelle. Es wird diskutiert, dass GATA3 mitverantwortlich für die Induzierung des Th2-Phänotypes ist (Kuo et Leiden, 1999; Ray et Cohn, 1999). So konnte der SNP -137C mit einem atopischen Phänotyp und einem erhöhten IgE-Serumspiegel assoziiert werden (Kruse et al., 2003). Für die zwei SNP -137 und -607 im Promotor 1 ermittelten verschiedene Forschungsgruppen Zusammenhänge zu den Erkrankungen Diabetes mellitus Typ1 (Kretowski et al., 2002), nekrotisierende Enterokolitis (Heninger et al., 2002) und Sarkoidose (Takada et al., 2002). Diese Promotorregion besitzt Bindungsstellen für das cyclic adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP)- responsive element-

binding protein (CREB) (Haus-Seuffert et Meisterernst, 2000) und für den menschlichen Histon H4 Gen spezifische Transkriptionsfaktor 1 (H4TF-1) (Giedraitis et al., 2001). An Position -607 wird durch den Wechsel der Base von Cytosin (C) zu Adenin (A) die CREB-Bindungsstelle unterbrochen und an Position -137 führt der Basentausch von Guanin (G) zu Cytosin zu einer veränderten H4TF-1-Bindungsstelle. Bei der Messung der IL-18-Genpromotoraktivität, wurde für -137C und -607A eine erniedrigte Promotoraktivität beobachtet. Für die Allele -137G und -607C konnte eine höhere Aktivität festgestellt werden (Giedraitis et al., 2001).

### 1.7 Ziel der Arbeit

IL-18 spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Th1 und Th2 Immunantwort und somit bei der Entstehung verschiedener Autoimmunerkrankungen. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht IL-18 und dessen Einfluss auf die Pathogenese, Krankheitsmanifestationen und den Krankheitsverlauf bei Patienten mit JIA und SLE. Mit dieser Kenntnis ergeben sich möglicherweise neue Therapiemöglichkeiten

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Biofuge pico	Heraeus instruments
Collection Tubes 2 ml	Qiagen
DU 640 Spectrophotometer	Beckmann
Dye Exe 2,0 QIAmp Spin Column	Qiagen
EBA 12 Zentrifuge	Hettich Zentrifugen
Einweg-Skalpell	Swann-Morton
Elektrophorese Stromversorgungsgerät	BIO-RAD (Power Pac 200)
Gefriertruhe Premium	Liebherr
Löffelspatel	Haldenwanger
Mastercycler personal	Eppendorf
PCR-Tube 0,5 ml, 1,5 ml	Eppendorf
PCR-Tube FC PP 0,2 ml	Treff Lab
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf
Power Mcintosh G3	Mcintosh
Thermomixer 5436	Eppendorf
UV-Lampe TFX 20M	Schütt Labortechnik
UV-Polaroid-Fotogerät MP4+	KemaEur
Vortex-2 Genie	Scientific Industries

## 2.1.2 Chemikalien und Substanzen

Chemikalie	Hersteller
Big-Dye-Mix	Applied Biosystems
Big Dye v.1.1 Cycle Sequenzierungs Kit	Applied Biosystems
dNTP-Mix 10mM, 1 ml	Applied Biosystems
EDTA	Merck
Essigsolution	Merck
Ethanol 100%	Merck
Ethidiumbromid	Merck
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas
HPLC-H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH
Isopropanol	Fluka Chemie GmbH
MgCl <sub>2</sub> Solution 25 mM, 1,5 ml	Roche
MinElute™ Gel Extraction Kit	Qiagen
Natriumacetat, pH 4,6	Applied Biosystems
Primer (siehe 2.3 und 2.4)	MWG Biotech AG
POP 6 without TSR-Buffer	Applied Biosystems
QIAmp® DNA Blood Mini Kit	Qiagen
Sea Kem® LE Agarose	Fermentas
Taq DNA Polymerase 5 Units/μl	Qiagen
Tris-Puffer	Merck
6*Loading Dye Solution	Fermentas
10*Genetic Analyzer Buffer with EDTA	Applied Biosystems
10*PCR Buffer 1,5 ml	Roche

## 2.2 Patienten und Kontrollen

Untersucht wurden 226 JIA-Patienten, 17 an im Kindes- und Adoleszenzalter erkrankten SLE-Patienten und 202 gesunde Kontrollpersonen aus der kaukasischen Bevölkerungsgruppe. Die 226 JIA-Patienten setzten sich aus 23 Patienten mit systemischer Arthritis, 61 mit seronegativer, 14 mit seropositiver Polyarthritits, 37 Individuen mit persistierender und 28 mit erweiterter Oligoarthritits, 36 mit Enthesitis assoziierte Arthritis, 14 mit Psoriasisarthritits und 13 nicht klassifizierbare Arthritispatienten zusammen. Alle JIA-Patienten erfüllten die Kriterien einer JIA nach der Klassifikation der ILAR (Petty et al., 2004). Die SLE-Patienten wurden durch die Kriterien eines SLE nach dem ACR klassifiziert (Tan et al., 1982). Bei allen Patienten und Kontrollpersonen wurden die SNP -137, -607 und -656 im Promotor 1 des IL-18-Gens bestimmt. Die klinischen Daten wurden retrospektiv, ohne Kenntnis der SNP, aus den Krankenakten der Patienten erfasst. Für die JIA wurden die Patientencharakteristika Geschlecht, Erkrankungsalter, Rheumafaktoren, HLA-B27-, DR4- und ANA-Status, sowie die Erkrankung an einer Uveitits, radiologische Veränderung und das Erlangen der Remission im Krankheitsverlauf zur Beurteilung herangezogen. Ebenso wurden die Entzündungszeichen Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSR) und C-reaktives Protein (CRP) berücksichtigt. ANA wurden ab einem Titer von 1:80 positiv gewertet. Bezügliche der radiologischen Veränderungen wurden die Patienten in drei Gruppen unterteilt: Patienten ohne radiologische Veränderungen, Patienten mit leichten Veränderungen (sichtbare Kalksalzverminderung, Gelenkspaltverschmälerung und Sklerosierung im Röntgenbild) und Patienten mit schwerem radiologischen Nachweis (Erosionen). Als klinische Remission wurde für Patienten definiert, bei denen über sechs Monate keine Morgensteifigkeit, keine schmerzhaften, geschwollenen oder bewegungseingeschränkten Gelenke mehr manifest waren. Zu unterscheiden ist die vollständige Remission (VR) von der Remission unter weitergeführter Medikamentengabe. Charakteristisch für die VR ist die nicht mehr notwendige Medikamenteneinnahme nach Erlangen der Remission. Für die SLE-Patienten wurden die Patientencharakteristika: Geschlecht, Proteinurie, Vorliegen einer Lupusnephritits, eine Beteiligung der Lunge, des Herzens, des ZNS, der Haut, der Gelenke sowie der ANA-Status und die Höhe der Komplementfaktoren C3 und C4 zur Beurteilung herangezogen. Referenzbereiche der Komplementfaktoren liegen für C3 zwischen 0,75 und 1,35 g/l sowie für C4 zwischen 0,09 und 0,36 g/l. Eine signifikante Proteinurie bestand ab einer Proteinausscheidung von 150 mg im 24 Stunden Sammelurin.

Vor der Blutentnahme wurde die Zustimmung der Patienten und Kontrollpersonen eingeholt. Bei minderjährigen Patienten wurde zusätzlich die Zustimmung der Erziehungsberechtigten eingeholt. Ein der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg positives Votum zu diesen Untersuchungen liegt vor.

### 2.3 DNS-Isolierung

Den Patienten und Kontrollpersonen wurde venöses Blut entnommen. Die genomische DNS wurde mittels QIAmp® DNS Blood Mini Kit nach Herstellervorschrift gewonnen. Die DNS-Lösung wurde bei -80°C aufbewahrt.

### 2.4 Nachweis der SNP im Promotor 1 des IL-18-Gens

#### 2.4.1 DNS-Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Methode wurde 1985 von Kary Mullis entwickelt. Er beschrieb seine Entdeckung 1990 in der Zeitschrift *Scientific American*, für die er 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt. Die Methode beruht auf dem Aufbau der Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Doppelhelix. Diese besteht aus zwei zueinander antiparallelen Strängen, die durch die jeweils komplementären Basen Adenosin (A) und Thymin (T), sowie Cytosin (C) und Guanin (G), welche über Wasserstoffbrücken nichtkovalent miteinander verbunden sind, gebildet werden. Die einzelnen Basen eines Stranges sind mit einer Desoxyribose verknüpft. Diese sind wiederum durch Phosphatgruppen miteinander verbunden (Abbildung 2.1). Zur Vervielfältigung der DNS mit Hilfe der PCR werden zum Start Oligonukleotidprimer benötigt. Das sind einzelsträngige DNS-Moleküle, die meist zwischen 18 und 24 Nucleotide lang sind. Sie bilden die Ergänzung zu einem bestimmten Abschnitt der DNS-Matrize. Durch eine DNS-Polymerase werden diese mittels Hilfe von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP s) entlang der einzelsträngigen, vorher denaturierten DNS-Matrize verlängert. So entstehen neue, zur DNS-Matrize komplementäre Einzelstränge, die am Ende der PCR zu Doppelsträngen zusammengesetzt werden.

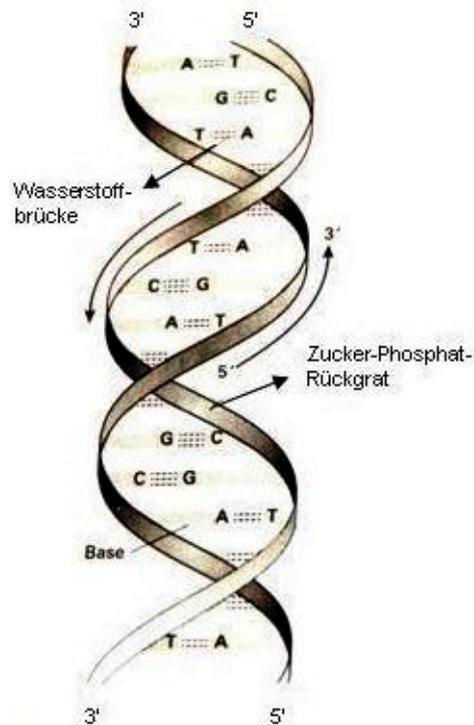


Abbildung 2.1: Aufbau der DNS-Doppelhelix (modifiziert nach Williams et al., 1993)

Um eine PCR durchzuführen wird ein Thermocycler benötigt. Dieser ermöglicht eine exakt reproduzierbare Temperaturregelung für alle Proben. Zu Beginn der PCR werden die DNS-Matrizen auf 93-100°C erhitzt, um die DNS-Stränge in Einzelstränge aufzutrennen. Anschließend bilden drei Reaktionsschritte die Grundlage der PCR (Abbildung 2.2):

- Aufspaltung der Doppelhelix in Einzelstränge (Denaturierungstemperatur, meist zwischen 93-100°C)
- Anlagerung der spezifischen Primer, bestimmt durch die Bindungs-Temperatur, diese ist 5-10°C niedriger als die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des jeweiligen Primers ( $T_m = 2^\circ\text{C} \cdot \text{Anzahl der A- und T-Basen} + 4^\circ\text{C} \cdot \text{Anzahl der C- und G-Basen}$ )
- Verlängerung der Primer durch die Taq DNS Polymerase (spezifische Temperatur von 72°).

Diese drei Reaktionsschritte bilden einen Zyklus, der normalerweise zwischen 25- und 35-mal wiederholt wird. Je mehr Zyklen eine PCR beinhaltet, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit das unerwünschte nicht-spezifische Nebenprodukte, ohne dass mehr Ziel-DNS entsteht, gebildet werden. Abgeschlossen wird mit einem zehnminütigen Reaktionsschritt bei 72 °C, der der vollständigen Synthese aller Stränge durch die Polymerase dient.

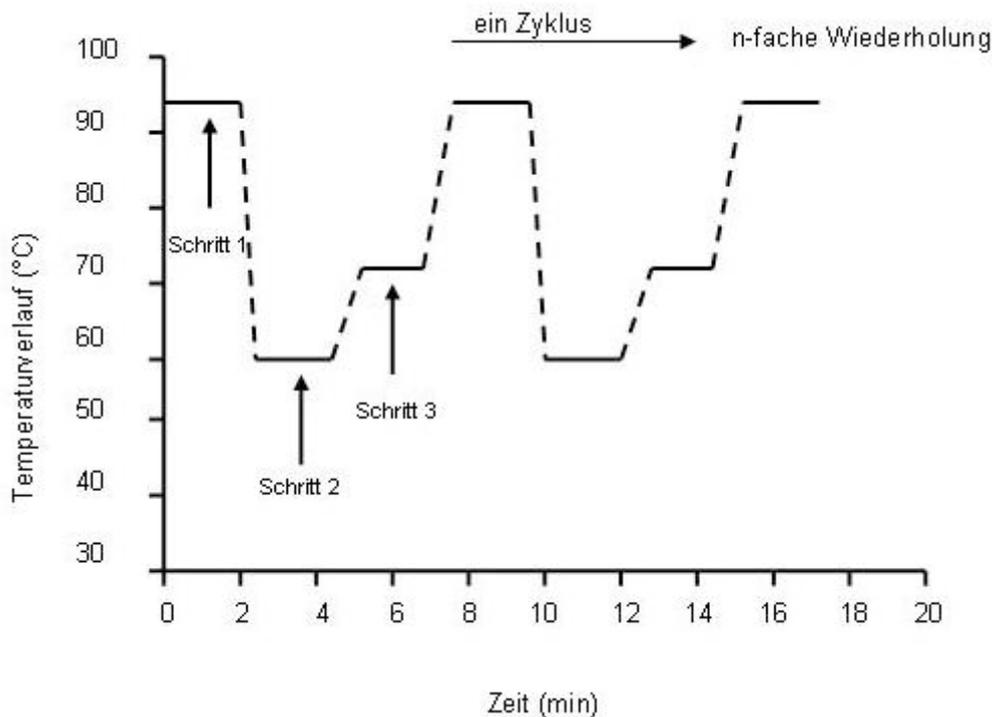


Abbildung 2.2: Der zyklische Temperaturverlauf der PCR (modifiziert nach Newton et Graham, 1994)

Schritt 1: Denaturierung der doppelsträngigen DNS

Schritt 2: Bindung der Primer an die DNS-Matrize

Schritt 3: Verlängerung der Primer durch eine DNS-Polymerase

## 2.4.2 Sequenzspezifische PCR für IL-18-137

Rückwärts-Primer	5'-AGG AGG GCA AAA TGC ACT GG-3'
spezifischer Vorwärts-Primer	5'-CCC CAA CTT TTA CGG AAG AAA AC/G-3'
Vorwärts-Kontroll-Primer	5'- CCA ATA GGA CTG ATT ATT CCG CA-3'

Tabelle 2.1: Primer für die PCR des SNP -137

Konzentration der Primerlösungen beträgt 10 Mikromolar ( $\mu\text{M}$ )

Durch den Rückwärts- und den spezifischen Vorwärts-Primer wurde ein 261 bp großes DNS-Fragment definiert. Der Vorwärts-Kontroll-Primer wurde zur Vervielfältigung eines 446 bp großen DNS-Fragmentes genutzt, welches als Kontrolle der korrekt durchgeführten PCR diente. Je Probe wurden zwei Ansätze mit 10  $\mu\text{l}$  benötigt.

Zusammensetzung:	Aqua destillata	5,77 $\mu\text{l}$
	buffer	1,0 $\mu\text{l}$
	MgCl <sub>2</sub>	0,8 $\mu\text{l}$
	dNTPs	0,25 $\mu\text{l}$
	Rückwärts-Primer	0,5 $\mu\text{l}$
	spezifischer Vorwärts-Primer C oder G	0,5 $\mu\text{l}$
	Vorwärts-Kontroll-Primer	0,13 $\mu\text{l}$
	Taq DNS Polymerase	0,05 $\mu\text{l}$
	DNS-Proben	1,0 $\mu\text{l}$

PCR-Ablauf:	95°C	5 min	
	95°C	1 min	} 34 Zyklen
	61°C	2 min	
	72°C	2 min	
	72°C	10 min	

Bis zur Entnahme wurde die DNS bei 4°C im Thermocycler aufbewahrt.

## 2.4.3 Sequenzspezifische PCR für IL-18-607

Rückwärts-Primer	5'-TAA CCT CAT TCA GGA CTT CC-3'
spezifischer Vorwärts-Primer	5'-GTT GCA GAA AGT GTA AAA ATT ATT AA/C-3'
Vorwärts-Kontroll-Primer	5'-CTT TGC TAT CAT TCC AGG AA-3'

Tabelle 2.2: Primer für die PCR des SNP -607  
Konzentration der Primerlösungen beträgt 10  $\mu$ M

Der hier genutzte Rückwärts-Primer und die spezifischen Vorwärtsprimer ergaben ein 196 bp DNS-Fragment. Der Kontroll-Vorwärts-Primer wurde für die Amplifizierung eines 301 bp großen Fragmentes genutzt. Je Probe wurden zwei Ansätze mit 10  $\mu$ l benötigt.

Zusammensetzung:	Aqua destillta	5,97 $\mu$ l
	buffer	1,0 $\mu$ l
	MgCl <sub>2</sub>	0,8 $\mu$ l
	dNTPs	0,25 $\mu$ l
	Rückwärts-Primer	0,4 $\mu$ l
	spezifischer Vorwärts-Primer C oder G	0,4 $\mu$ l
	Vorwärts-Kontroll-Primer	0,13 $\mu$ l
	Taq DNS Polymerase	0,05 $\mu$ l
	DNS-Proben	1,0 $\mu$ l

PCR-Ablauf:	94°C	5 min	
	94°C	1 min	} 32 Zyklen
	62°C	2 min	
	72°C	2 min	
	72°C	10 min	

Bis zur Entnahme wurde die DNS bei 4°C im Thermocycler aufbewahrt.

## 2.4.4 Sequenzspezifische PCR für IL-18-656

Rückwärts-Primer	5'-CCT CCT CCC AAG CTC AAT ATG-3'
spezifischer Vorwärts-Primer	5'-GCC CTC TTA CCT GAA TTT TGG TAG/T-3'
Vorwärts-Kontroll-Primer	5'-TAC ACT CTG CTC TTC AAA CGT TAC-3'

Tabelle 2.3: Primer für die PCR des SNP -656  
Konzentration der Primerlösungen beträgt 10  $\mu$ M

Das spezifische DNS-Fragment hatte eine Größe von 222 bp und das Kontroll-Fragment von 390 bp. Je Probe wurden zwei Ansätze mit 10  $\mu$ l benötigt.

Zusammensetzung:	Aqua destillata	6,12 $\mu$ l
	buffer	1,0 $\mu$ l
	MgCl <sub>2</sub>	0,5 $\mu$ l
	dNTPs	0,3 $\mu$ l
	Rückwärts-Primer	0,4 $\mu$ l
	spezifischer Vorwärts-Primer C oder G	0,4 $\mu$ l
	Vorwärts-Kontroll-Primer	0,13 $\mu$ l
	Taq DNS Polymerase	0,05 $\mu$ l
	DNS-Probe	1,0 $\mu$ l

PCR-Ablauf:	94°C	5 min	
	94°C	1 min	} 32 Zyklen
	66°C	2 min	
	72°C	2 min	
	72°C	10 min	

Bis zur Entnahme wurde die DNS bei 4°C im Thermocycler aufbewahrt.

### 2.4.5 Qualitativer Nachweis der SNP

Die amplifizierten DNS-Abschnitte wurden durch eine Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Bei dieser Methode werden die Amplikons auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und die Banden mit Ethidiumbromid unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht.

Zusammensetzung des Gels

- 100 ml TAE-Lösung
- 2 g Agarose
- 2 µl Ethidiumbromid

10 µl des PCR-Produktes wurden mit 2 µl der sechsfachen Loading Dye Solution vermischt und in eine Geltasche pipettiert. Die DNS-Fragmente wurden bei 80 V für circa 45 Minuten aufgetrennt. Zur Größenbestimmung der DNS-Abschnitte wurden ein Größenmarker (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus) aufgetragen (Abbildung 2.3). Das Ergebnis wurde durch eine Fotografie dokumentiert (Abbildung 2.4).

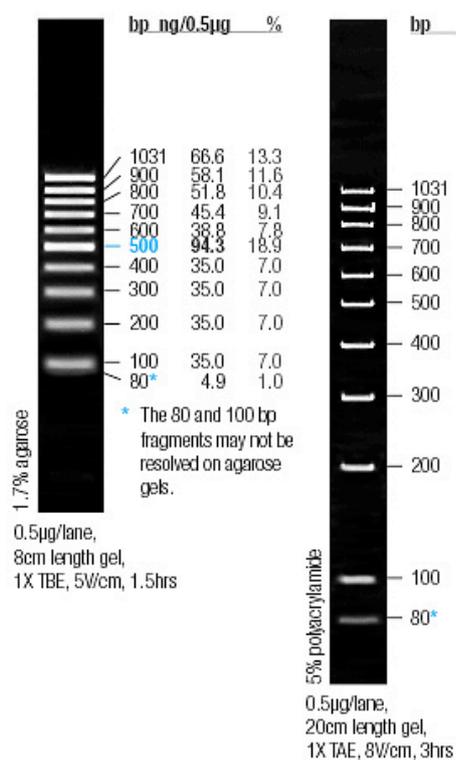


Abbildung 2.3: Angabe über Fragment-Größen der Markerbanden (Herstellerangabe, Fermentas)

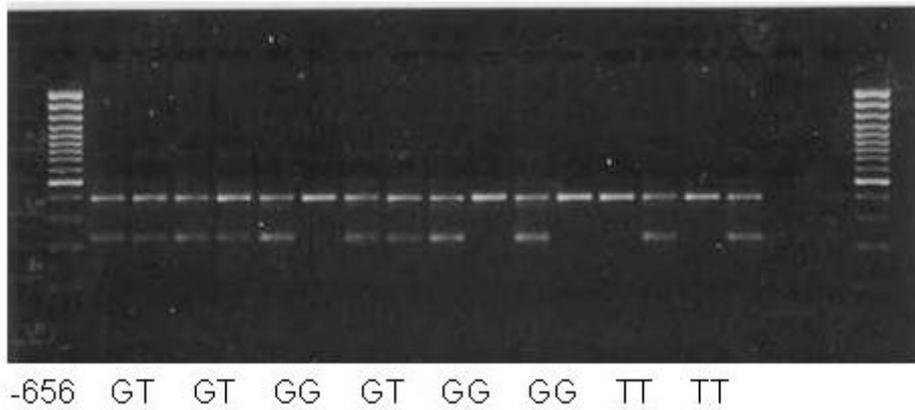


Abbildung 2.4: Fotografie des Gels IL-18-656

Die obere Bande ist das 390 bp große Kontrollfragment, die untere Bande das 222 bp große spezifische Fragment. Die beiden äußeren Spuren wurden mit einem Größenmarker beladen. Jeweils zwei benachbarte Spuren gehören zu einer DNS-Probe. Die jeweils erste Spur ist das spezifische G-Fragment und die Zweite das T-Fragment. Die beiden leeren Spuren sind Kontrollen, bei diesen wurde im Ansatz statt der DNS Aqua destillata zugegeben.

## 2.5 Sequenzierung

Sequenziert wurde für alle beobachteten Varianten der SNPs -137 für CC, CG und GG, -607 für AA, CA und CC und der Stelle -656 für GG, GT und TT. Unklare Ergebnisse bei der spezifischen PCR wurden sequenziert.

### 2.5.1 Spezifische PCR für die Sequenzierung

Für alle drei SNP konnte der gleiche Ansatz verwendet werden. Je Probe wurde ein 10 µl Ansatz benötigt.

SNP -137	Vorwärts-Primer	5'- GTG CTG AAG TGT GAC CAG GAA G-3'
	Rückwärts-Primer	5'-GAA GCG ATC TGG AAG GTC TGA G-3'
SNP -607 und -656	Vorwärts-Primer	5'-GGT CAG TCT TTG CTA TCA TTC CAG-3'
	Rückwärts-Primer	5'-CTT CCT GGT CAC ACT TCA GCA C-3'

Tabelle 2.4: Primer der SNP

Konzentration der Primerlösungen beträgt 10pM

Zusammensetzung:	Aqua destillata	6,05 $\mu$ l
	buffer	1,0 $\mu$ l
	MgCl <sub>2</sub>	0,8 $\mu$ l
	dNTPs	0,25 $\mu$ l
	Rückwärts-Primer	0,4 $\mu$ l
	Vorwärts-Primer	0,4 $\mu$ l
	Taq DNS Polymerase	0,1 $\mu$ l
	DNS-Probe	1,0 $\mu$ l

PCR-Ablauf:	94°C	5 min	
	94°C	1 min	} 32 Zyklen
	60°C	2 min	
	72°C	2 min	
	72°C	10 min	

Bis zur Entnahme wurde die DNS bei 4°C im Thermocycler aufbewahrt. Anschließend wird das PCR-Produkt durch die Gel-Elektrophorese aufgetrennt (siehe 2.3.5).

### 2.5.2 Gel-Extraktion

Dieser Arbeitsschritt wurde mit Hilfe des MinElute™ Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, D) nach Herstellervorschrift durchgeführt.

### 2.5.3 Sequenzier-PCR

Die Sequenzier-PCR dient zur Vervielfältigung einer einzelsträngigen DNS-Matrize mit eingebauten Fluoreszenzfarbstoffen. Für jede Probe wurde ein 10  $\mu$ l Ansatz verwendet. Dieser setzte sich aus 4,75  $\mu$ l HLPC-H<sub>2</sub>O; 4  $\mu$ l Big-Dye-Mix (=AmpliTaq®, FS Big-Dye Terminator Premix); 0,5  $\mu$ l des jeweiligen Vorwärts-Primers (Tabelle 2.4) für den SNP -137 oder -607/ -656 und 0,75  $\mu$ l DNA nach Gel-Extraktion zusammen. Der Big-Dye-Mix besteht aus dNTPs, ddNTPs, Puffer, MgCl<sub>2</sub> und der AmpliTaq-Polymerase FS (Fluoreszenz-Sequenzierung). Dies ist ein hitzestabiles Enzym aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* mit

einer Doppelmutation. Durch die erste Mutation verliert das Enzym seine 5'-3' Nuklease-Aktivität, durch die zweite Mutation, die im aktiven Zentrum liegt, verändert es seine Akzeptanz gegenüber Didesoxynukleotiden, die dadurch leichter eingebaut werden. Nach dem Einbau eines ddNTP wird die Verlängerung der DNS-Kette abgebrochen, da ihr 3'-H Ende im Gegensatz zu dem 3'-OH Ende der dNTPs keine Phosphodiesterbrücken bilden kann, welche essentiell für die Polymerisation sind (Abbildung 2.5). Die entsprechende Base wird durch den eingebauten Fluoreszenzfarbstoff markiert, wobei jedes der vier ddNTPs mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff der Big-Dye Gruppe markiert ist. Für alle SNP galten die gleichen PCR-Konditionen. Die PCR setzte sich aus 30 Zyklen zu je zehn Sekunden bei 96°C und vier Minuten bei 60°C zusammen. Bis zur Entnahme der Proben wurden diese bei 4°C im Mastercycler gelagert.

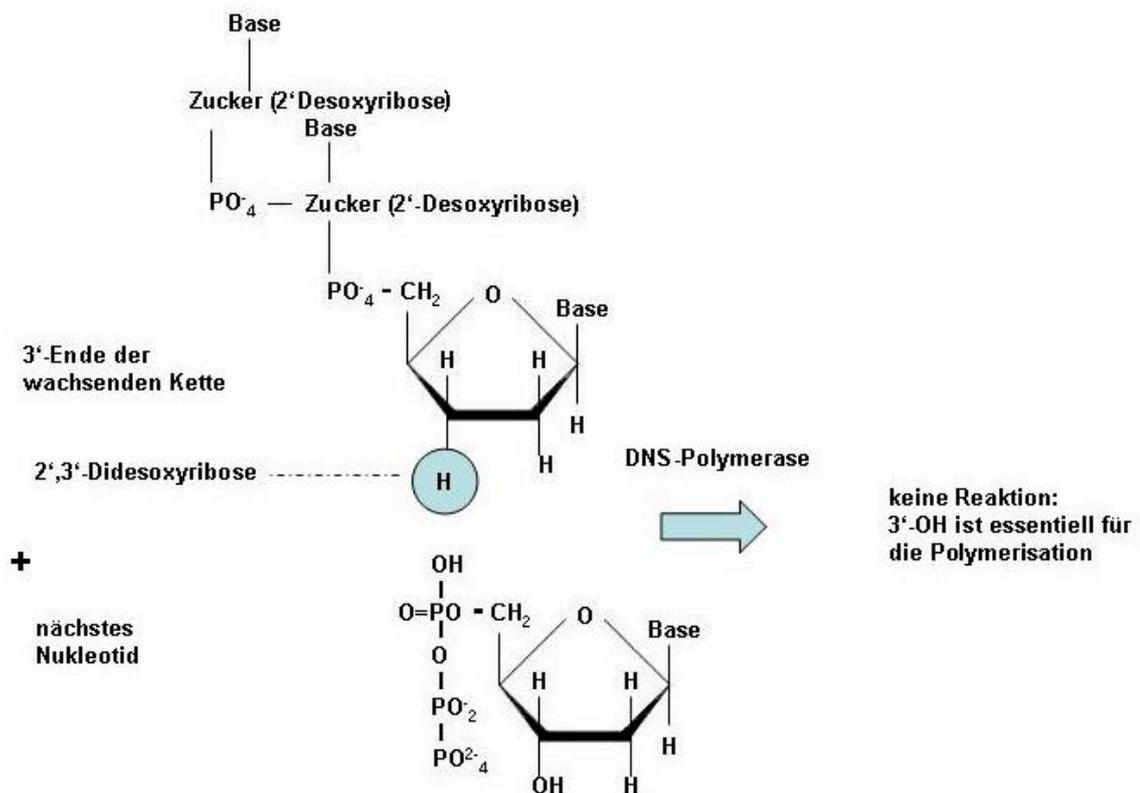


Abbildung 2.5: Kettenabbruch durch fehlendes 3'-OH Ende des ddNTP (Alphey, 1998)

#### 2.5.4 Fällung der Sequenzier-PCR

Die Fällung des PCR-Produktes diente zur Aufreinigung der DNA, z.B. um nicht eingebaute markierte Nukleotide zu entfernen. Dazu wurde zum PCR-Produkt 1  $\mu\text{l}$  3M Natriumacetat und 25  $\mu\text{l}$  100%iges Ethanol zugegeben. Die Lösung wurde gevortext, fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und fünfzehn Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der flüssige Überstand abpipettiert. Das verbleibenden Pellet wurde mit 25  $\mu\text{l}$  70%iges Ethanol gelöst, dann fünf Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die letzten drei Arbeitsschritte wurden einmal wiederholt. Danach wurde die Lösung nochmals fünf Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert und der restliche Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde im geöffneten Tube eine Stunde zum Trocknen unter die Abzugshaube gestellt und anschließend in 20  $\mu\text{l}$  HPLC-H<sub>2</sub>O eluiert.

#### 2.5.5 Sequenzierung

Die DNS-Sequenzierung dient zur Entschlüsselung von Nukleotidsequenzen. Die Sequenzier-PCR und die anschließende Sequenzierung werden als „Zyklus-Sequenzierung“ bezeichnet. Dazu wurde ein Sequenziergerät, ABI PRISM 310, bestehend aus einem Argonlaser, einem optischen Spiegelsystem und der Charged Coupled Device (CCD)-Kamera, benutzt (Abbildung 2.6).

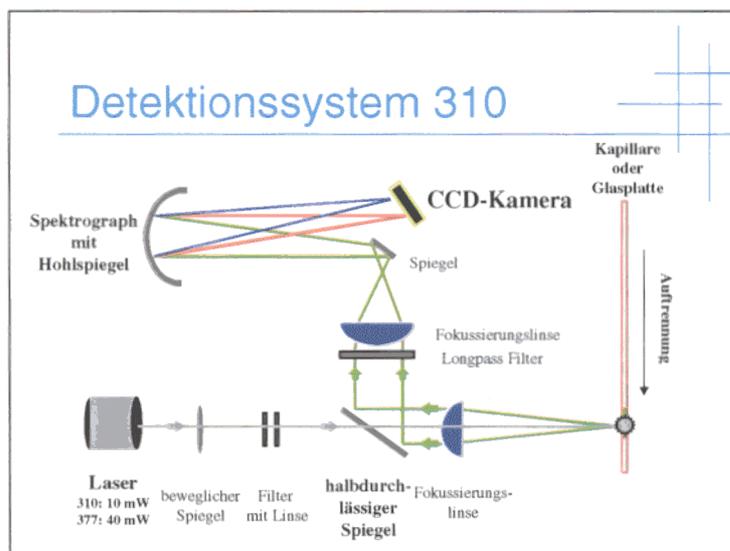


Abbildung 2.6: Aufbau des Detektionssystem des ABI PRISM 310

Wenn ein DNS-Fragment den Detektionsbereich erreicht, sendet es Fluoreszenzlicht aus. Nachdem es auf dem Hohlspiegel fokussiert ist, wird es prismatisch aufgespalten und trifft auf den Chip der CCD-Kamera. Dies ermöglicht die gleichzeitige Detektion verschiedener Farbstoffe. Für die Sequenzierung wurden 6 µl des gefällten Sequenzier-PCR-Produktes in 14 µl HPLC-H<sub>2</sub>O gelöst. Laut Bedienungsanleitung wurde das Sequenziergerät ABI PRISM 310 vorbereitet und gestartet. Die Kontrolle und Auswertung der Daten erfolgte mittels verschiedener Software-Programme am Power McIntosh G3

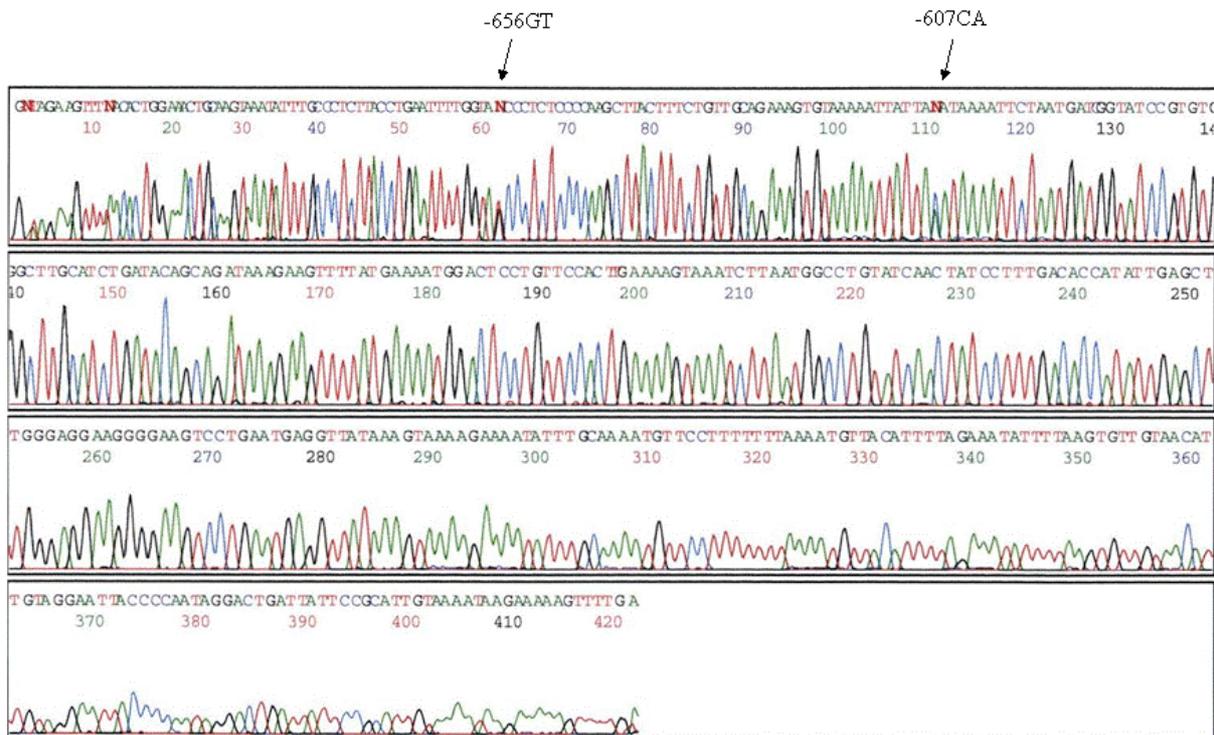


Abbildung 2.7: Sequenziausdruck für eine heterozygote DNS-Probe für die SNP -607 (CA) und -656 (GT) auf dem IL 18-Gen

## 2.6 Statistik

Zur Auswertung wurde SPSS 10 genutzt. Ausgewertet wurde mittels Chi-Quadrat-Test. Dieser dient dem Vergleich der Prozentzahlen zweier unabhängiger Gruppen zur Berechnung der Signifikanz. Für die asymmetrischen Patientencharakteristika BSR, CRP und Erkrankungsalter wurde der Median berechnet.

### 3 Ergebnisse

Das vorherrschende Zytokinmilieu und die in der Synovia gefundenen Th1-Helferzellen deuten auf eine Th1-dominierende Immunantwort in der Pathogenese der JIA hin. Die Induktion der Th1-Zellen wird vor allem durch die Zytokine Il-12 und Il-18 induziert. Weiterhin werden dem proinflammatorischen Zytokin Il-18 auch degenerative Effekte am Gelenkknorpel zugeschrieben (Leung et al. 2001). Es scheint somit stark an der Pathogenese der JIA beteiligt zu sein. Nobuaki und Mitarbeiter wiesen bei Kindern mit einer Systemischen Arthritis einen erhöhten Il-18-Serumspiegel gegenüber den Kontrollpersonen und den anderen JIA-Subtypen nach. Je höher dieser war, desto schwerer war der Krankheitsverlauf (Nobuaki et al., 2002).

#### 3.1 Kontrollpopulation

Die Kontrollpopulation bestand aus 202 gesunden Personen. Insgesamt gehörten 84 (41,6%) dem männlichen und 118 (58,4%) dem weiblichen Geschlecht an. Das Geschlecht konnte als Einflussfaktor (Confounder) auf die SNP -137, -607 und -656 ausgeschlossen werden (Logistische Regression).

#### 3.2 Patientenpopulation JIA

Die untersuchte Population bestand aus 226 an JIA erkrankten Kindern. 23 konnten dem systemischen Typ, 61 der seronegativen und 14 der seropositiven Polyarthritis, 37 Patienten der persistierenden und 28 der erweiterten Oligoarthritis, 36 der Enthesitis assoziierten Arthritis und 14 der Psoriasisarthritis zugeordnet werden. 13 Kinder wurden in die Gruppe der nicht klassifizierten Arthritiden eingeordnet.

<b>Manifestation</b>	JIA gesamt	system. Typ	seroneg. Poly- arthritis	seropos. Poly- arthritis	persist. Oligo- arthritis	erweiterte Oligo- arthritis	Enthesitis assoziierte Arthritis	Psoriasis- arthritis
<b>Geschlecht</b>	<b>224</b>	<b>22</b>	<b>61</b>	<b>14</b>	<b>37</b>	<b>28</b>	<b>35</b>	<b>14</b>
M	38,4% 86	72,7% 16	26,2% 16	7,1% 1	21,6% 8	35,7% 10	74,3% 26	50,0% 7
W	61,1% 138	27,3% 6	73,8% 45	92,9% 13	78,4% 29	64,3% 18	25,7% 9	50,0% 7
<b>ANA</b>	<b>220</b>	<b>21</b>	<b>61</b>	<b>14</b>	<b>37</b>	<b>27</b>	<b>33</b>	<b>14</b>
Positiv	41,4% 91	23,8% 5	41,0% 25	57,1% 8	64,9% 24	63,0% 17	18,2% 6	21,4% 3
Negativ	58,6% 129	76,2% 16	59,0% 36	42,9% 6	35,1% 13	37,0% 10	81,8% 27	78,6% 11
<b>RF</b>	<b>133</b>	<b>6</b>	<b>36</b>	<b>14</b>	<b>32</b>	<b>10</b>	<b>22</b>	<b>10</b>
Positiv	10,5% 14	0	0	100% 14	0	0	0	0
Negativ	89,5% 119	100% 6	100% 36	0	100% 32	100% 10	100% 22	100% 10
<b>DR4</b>	<b>134</b>	<b>9</b>	<b>44</b>	<b>8</b>	<b>24</b>	<b>11</b>	<b>21</b>	<b>9</b>
Positiv	17,2% 23	0	11,4% 5	62,5% 5	8,3% 2	18,2% 2	23,8% 5	0
Negativ	82,8% 111	100% 9	88,6% 39	37,5% 3	91,7% 22	81,8% 9	76,2% 16	100% 9
<b>HLA B27</b>	<b>204</b>	<b>17</b>	<b>58</b>	<b>11</b>	<b>33</b>	<b>23</b>	<b>35</b>	<b>14</b>
Positiv	33,3% 68	5,9% 1	25,9% 15	27,3% 3	15,2% 5	30,4% 7	85,7% 30	28,6% 4
Negativ	66,7% 136	94,1% 16	74,1% 43	72,7% 8	84,8% 28	69,6% 16	14,3% 5	71,4% 10
<b>Erkrankungsalter</b> Median in Jahren	7,6	4,4	6,9	10,1	3,2	2,9	10,9	10,8
<b>Radiologische Veränderung</b>	<b>123</b>	<b>5</b>	<b>35</b>	<b>8</b>	<b>32</b>	<b>7</b>	<b>24</b>	<b>9</b>
Keine	61,8% 76	60,0% 3	51,4% 18	0	90,6% 29	28,6% 2	66,7% 16	66,7% 6
Leichte	11,4% 14	0	8,6% 3	0	9,4% 3	28,6% 2	16,7% 4	22,2% 2
Schwere	26,8% 33	40,0% 2	40,0% 14	100% 8	0	42,9% 3	16,7% 4	11,1% 1
<b>Uveitis</b>	<b>226</b>	<b>23</b>	<b>61</b>	<b>14</b>	<b>37</b>	<b>28</b>	<b>36</b>	<b>14</b>
Ja	9,3% 21	0	11,5% 7	0	10,8% 4	21,4% 6	8,3% 3	0
Nein	90,7% 205	100% 23	88,5% 54	100% 14	89,2% 33	78,6% 22	91,7% 33	100% 14
<b>Remission</b>	<b>223</b>	<b>22</b>	<b>60</b>	<b>14</b>	<b>36</b>	<b>28</b>	<b>36</b>	<b>14</b>
Ja	30,0% 67	27,3% 6	26,7% 16	14,3% 2	58,3% 21	7,1% 2	36,1% 13	42,9% 6
Nein	70,0% 156	72,7% 16	73,3% 44	85,7% 12	41,7% 15	92,9% 26	63,9% 23	57,1% 8
<b>VR</b>	<b>223</b>	<b>22</b>	<b>60</b>	<b>14</b>	<b>36</b>	<b>28</b>	<b>36</b>	<b>14</b>
Ja	7,2% 16	13,6% 3	0	0	25,0% 9	3,6% 1	2,8% 1	14,3% 2
Nein	92,8% 207	76,4% 19	100% 60	100% 14	75,0% 17	96,4% 27	97,2% 35	85,7% 12

Tabelle 3.1: Patientencharakteristika; Verteilung in %, Anzahl innerhalb der JIA-Population und der einzelnen Subtypen

Insgesamt fanden sich 86 (38,4%) Jungen und 138 (61,6%) Mädchen. Bei 135 Patienten wurde der RF bestimmt. Dieser war bei 14 (10,5%) positiv. HLA B27 konnte bei 68 von 204 (33,3%) und DR4 bei 23 von 134 (17,2%) Kindern nachgewiesen werden. Hinsichtlich der ANA wurden 220 der Patienten untersucht. Ein positiver ANA zeigte sich bei 91 (41,4%) Kindern. Das durchschnittliche Erkrankungsalter lag bei 7,6 Jahren (Median). Es erkrankten 74 der 224 (33,0%) JIA-Patienten vor Beendigung des vierten Lebensjahres. Bei 21 der 226 (9,3%) Kinder konnte eine Uveitis im Krankheitsverlauf nachgewiesen werden. Für 123 Patienten lag eine radiologische Auswertung vor. 14 (11,4%) Kinder wiesen leichte und 33 (26,8%) schwere Veränderungen auf. 67 der 223 (30,0%) Patienten erreichten die Remission. Bei 16 (7,2%) Kindern konnte eine vollständige Remission nachgewiesen werden. Die mittlere BSR betrug 11,5 (Median) und mittlere CRP 6,6 (Median).

### 3.3 Der SNP Il-18-137 innerhalb der JIA-Population

Wir untersuchten 226 JIA-Patienten hinsichtlich des SNP -137 und fanden bei 117 Kindern (51,8%) den homozygoten Genotyp GG, bei 92 (40,7%) den heterozygoten Genotyp CG und bei 17 (7,5%) den homozygoten Genotyp CC. Das entspricht einer C-Allelfrequenz von 27,9%. Für die 202 gesunden Kontrollpersonen ermittelten wir 109 Individuen (54,0%) mit dem homozygoten Genotyp GG, 75 (37,1%) mit dem heterozygoten Genotyp CG und 18 (8,9%) mit dem homozygoten Genotyp CC. Das entspricht einer C-Allelfrequenz von 27,5%.

Subtyp (n)/-137	GG (n)	CG (n)	CC (n)	C-Allelfrequenz
JIA 1 (23)	56,5% (13)	34,8% (8)	8,7% (2)	26,1%
JIA 2 (61)	57,4% (35)	37,7% (23)	4,9% (3)	23,8%
<b>JIA 3 (14)</b>	<b>71,4% (10)</b>	<b>28,6% (4)</b>	<b>0</b>	<b>14,3%*</b>
JIA 4a (37)	51,4% (19)	35,1% (13)	13,5% (5)	31,1%
JIA 4b (28)	35,7% (10)	60,7% (17)	3,6% (1)	33,9%
JIA 5 (36)	47,2% (17)	41,7% (15)	11,1% (4)	31,9%
JIA 6 (14)	64,3% (9)	35,7% (5)	0	17,9%
JIA 7 (13)	30,8% (4)	53,9% (7)	15,4% (2)	42,3%
JIA gesamt (226)	51,8% (117)	40,7% (92)	7,5% (17)	27,9%
Kontrolle (202)	54,0% (109)	37,1% (75)	8,9% (18)	27,5%

Tabelle 3.2: -137 Genotypenverteilung in den verschiedenen Patienten- und Kontrollpopulationen

\* C-Allelfrequenz gegenüber den restlichen JIA-Subtypen und Kontrollpopulation nicht signifikant erniedrigt p=0,1

Interessanterweise zeigt sich die -137C-Allelfrequenz der JIA 3 (14,3%) nicht signifikant geringer gegenüber den anderen JIA-Subtypen ( $p=0,1$ ) und der Kontrollpopulation ( $p=0,1$ ). Kein Patient mit einer RF positiven Polyarthrititis besitzt den homozygoten Genotyp -137CC. Für acht dieser Kinder lagen radiologische Nachweise vor. Bei allen konnten schwere radiologische Veränderungen nachgewiesen werden. Nur zwei (14,3%) dieser 14 Patienten traten in Remission unter weitergeführter Medikamenteneinnahme. Beide haben den Genotyp -137GG. Kein Kind trat in VR, im Vergleich zur gesamten JIA-Population, wo 67 (30,0%) Patienten die Remission erreichten. Die -137C-Allelfrequenz liegt hier bei 32,1%. So findet sich innerhalb der JIA-Population eine nicht signifikante Erhöhung der -137C-Allelfrequenz bei den in Remission getretenen Patienten ( $p=0,16$ ). Insgesamt 16 (23,9%) Kinder erreichten eine VR. Auffällig ist auch hier die nicht signifikante erhöhte C-Allelfrequenz bei den in VR getretenen Patienten ( $p=0,09$ ).

Remission	Medikamente	GG (n)	CG (n)	CC (n)	C-Allelfrequenz
Nein		54,5% (85)	39,7% (62)	5,8% (9)	25,6%
Ja	Ja	51,0% (26)	39,2% (20)	9,8% (5)	29,4%
Ja	Nein	37,5% (6)	43,8% (7)	18,8% (3)	40,6%

Tabelle 3.3: -137 Genotypenverteilung innerhalb der verschiedenen Remissionsgruppen

Beim Vergleich von Patienten mit oligoartikulärer JIA und polyartikulärer JIA (Typ 2 und 3) findet sich das -137C-Allel bei Oligoarthritispatienten häufiger ( $p=0,05$ ). Kinder mit einer Polyarthrititis (JIA 2 und 3) zeigten im Vergleich zu Kindern mit erweiterter Oligoarthrititis (JIA 4b) eine nicht signifikante erniedrigte -137C-Allelfrequenz ( $p=0,08$ ). Interessanterweise findet sich das -137C-Allel bei ANA negativen Patienten nicht signifikant häufiger ( $p=0,2$ ). Hinsichtlich der Patientencharakteristika Geschlecht, RF, HLA-B27, DR4, Uveitis, radiologische Veränderungen, Erkrankungsalters und der Entzündungsparameter BSR und CRP konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

ANA/-137	GG (n)	CG (n)	CC (n)	C-Allelfrequenz
Positiv (91)	58,2% (53)	34,1% (31)	7,7% (7)	24,7%
Negativ (129)	47,3% (61)	45,0% (58)	7,8% (10)	30,2%

Tabelle 3.4: -137 Genotypenverteilung bei ANA positiven und negativen Patienten

### 3.4 Der SNP IL-18-607-656 innerhalb der JIA-Population

Wir untersuchten 226 JIA-Patienten hinsichtlich des SNP -607-656. Es zeigte sich ein Kopplungsgleichgewicht zwischen diesen beiden Polymorphismen. So wird das -607C (A)-Allel gemeinsam mit dem G- (T)-Allel an der Stelle -656 vererbt. Wir ermittelten bei 76 (33,6%) Kindern den homozygoten Genotyp -607CC-656GG, bei 102 (45,1%) den heterozygoten Genotyp -607CA-656GT und bei 48 (21,2%) den homozygoten Genotyp -607AA-656TT. Das entspricht einer -607A-656T-Allelfrequenz von 43,8%. Für die 202 gesunden Kontrollpersonen ermittelten wir 71 Individuen (35,2%) mit dem Genotyp -607CC-656GG, 95 (47,0%) mit dem heterozygoten Genotyp -607CA-656GT und 36 (17,8%) mit dem homozygoten Genotyp -607AA-656TT. Das entspricht einer -607A-656T-Allelfrequenz von 41,3%.

Subtyp (n)/-607-656	CCGG (n)	CAGT (n)	AATT (n)	A/T-Allelfrequenz
JIA 1 (23)	47,8% (11)	26,1% (6)	26,1% (6)	39,1%
JIA 2 (61)	34,5 % (21)	47,5% (29)	18,0% (11)	41,8%
<b>JIA 3 (14)</b>	<b>42,9% (6)</b>	<b>50,0% (7)</b>	<b>7,1% (1)</b>	<b>32,1%*</b>
JIA 4a (37)	35,1% (13)	35,1% (13)	29,7% (11)	47,3%
<b>JIA 4b (28)</b>	<b>25,0% (7)</b>	<b>50,0% (14)</b>	<b>25,0% (7)</b>	<b>50,9%**</b>
JIA 5 (36)	33,3% (12)	41,7% (10)	25,0% (9)	45,8%
JIA 6 (14)	28,6% (4)	71,4% (10)	0	35,7%
JIA 7 (13)	15,4% (2)	61,5% (8)	23,1% (3)	53,8%
JIA gesamt (226)	33,6% (76)	45,1% (102)	21,2% (48)	43,8%
Kontrolle (202)	35,2% (71)	47,0% (95)	17,8% (36)	41,3%

Tabelle 3.5: -607-656 Genotypverteilung der verschiedenen Patienten- und Kontrollpopulationen

\* A/T-Allelfrequenz gegenüber Kontrollpopulation nicht signifikant erniedrigt  
p=0,2

\*\* A/T- Allelfrequenz gegenüber Kontrollpopulation nicht signifikant erhöht  
p=0,2

Beachtenswert ist die -607A-656T-Allelfrequenz der JIA 3 (32,1%). Sie tritt, ebenso wie die -137C-Allelfrequenz, nicht signifikant geringer gegenüber der Kontrollgruppe auf (p=0,2). Nicht signifikant häufiger konnte das -607A-656T-Allel bei Patienten mit Oligoarthritis (JIA 4) im Vergleich zu Patienten mit Polyarthritis (JIA 2 und 3) beobachtet werden (p=0,16).

Kinder mit erweiterter Oligoarthritis (JIA 4b) zeigten gegenüber Kindern mit polyartikulärer Verlaufsform (JIA 2 und 3) eine nicht signifikant erhöhte -607A-656T-Allelfrequenz ( $p=0,2$ ). Bei Kindern mit einer JIA 4 und JIA 5 konnte -607A-656T nicht signifikant häufiger ermittelt werden als bei Kindern mit einer JIA 2 und 3 ( $p=0,16$ ). Zwischen dem SNP -607-656 und dem Erreichen der Remission wurde keine Beziehung ersichtlich. Nur Patienten, die in VR traten, wiesen gegenüber den anderen Patienten eine deutlich erhöhte -607A-656T-Allelfrequenz auf ( $p=0,01$ ).

Remission	Medikamente	CCGG (n)	CAGT (n)	AATT (n)	A/T-Allelfrequenz
Nein		35,9% (56)	43,6% (68)	20,5% (32)	42,3%
Ja	Ja	37,3% (19)	43,1% (22)	19,6% (10)	41,2%
Ja	Nein	6,3% (1)	56,3% (9)	37,5% (6)	65,6%*

Tabelle 3.6: -607 -656 Genotypenverteilung innerhalb der verschiedenen Remissionsgruppen  
\* A/T-Allelfrequenz der Patienten mit VR gegenüber A/T-Allelfrequenz der anderen Patienten erhöht ( $p=0,01$ )

Hinsichtlich der Patientencharakteristika, Geschlecht, RF, HLA-B27, DR4, ANA, Uveitis, radiologische Veränderung, Erkrankungsalter und Entzündungsaktivität konnte kein Zusammenhang zu den Polymorphismen -607-656 gefunden werden.

### 3.5 Patientenpopulation SLE

Der SLE ist eine seltene Erkrankung im Kindesalter. Ausgelöst wird er u. a. durch eine Dysbalance der Th1- und Th2-Zytokine (Mosmann et Coffman 1989; Horneff 2006). IL-18 scheint auch hier eine Rolle innerhalb der Pathogenese zu spielen.

Die untersuchte Population bestand aus 17 im Kindes- und Jugendalter an SLE erkrankten Patienten. Darunter befanden sich drei (17,6%) Jungen und 14 (82,4%) Mädchen. Bei zehn der 14 Patienten lag eine Proteinurie und bei neun eine Lupusnephritis vor. Eine Beteiligung der Lunge bestand bei drei, des Herzens bei zwei, des Zentralnervensystems (ZNS) bei fünf und der Haut bei zehn Patienten. Eine Arthritis entwickelten 13 der Kinder und Jugendlichen. Bei allen SLE-Patienten konnten positive ANA und ds-DNS-AK nachgewiesen werden. Aktuell lag bei neun Patienten eine Komplementerniedrigung des Faktors 3 (C3) und bei sieben Patienten des Faktors 4 (C4) vor.

### 3.6 Die SNP -137 und -607-656 innerhalb der SLE-Population

Innerhalb der SLE-Population ermittelten wir bei acht (47,05%) Kindern den homozygoten Genotyp -137GG, bei acht (47,05%) den heterozygoten Genotyp -137CG und bei einem (5,9%) Patienten den homozygoten Genotyp -137CC. Das entspricht einer -137C-Allelfrequenz von 29,4%. Drei (17,65%) Kinder wiesen den homozygoten Genotyp -607CC-656GG, elf (64,7%) den heterozygoten Genotyp -607CA-656GT und drei (17,65%) den homozygoten Genotyp -607AA-656TT auf. Das entspricht einer -607A-656T-Allelfrequenz von 50,0%.

Population (n)/-137	GG (n)	CG (n)	CC (n)	C-Allelfrequenz
SLE (17)	47,05% (8)	47,05% (8)	5,9% (1)	29,4%
JIA (226)	51,8% (117)	40,7% (92)	7,5% (17)	27,8%
Kontrollen (202)	54,0% (109)	37,1% (75)	8,9% (18)	27,5%

Tabelle 3.7: -137 Genotypenverteilung innerhalb der verschiedenen Patienten/Kontrollpopulationen

Population (n)/-607-656	CCGG (n)	CAGT (n)	AATT (n)	A/T-Allelfrequenz
SLE (17)	17,65% (3)	64,7% (11)	17,65% (3)	50,0%
JIA (226)	33,6% (76)	45,1% (102)	21,2% (48)	43,8%
Kontrollen (202)	35,2% (71)	47,0% (95)	17,8% (36)	41,3%

Tabelle 3.8: -607-656 Genotypenverteilung innerhalb der verschiedenen Patienten/Kontrollpopulationen

Auffällig ist die nicht signifikant erhöhte Anzahl des heterozygoten Genotyps -607CA-656GT bei den SLE-Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen ( $p=0,16$ ) und den JIA-Patienten ( $p=0,12$ ). Auch tritt das -607A-656T-Allel nicht signifikant häufiger innerhalb der SLE-Gruppe als in der JIA-Gruppe auf ( $p=0,2$ ). Gegenüber der Kontrollpopulation ist kein Zusammenhang ersichtlich. Hinsichtlich der verschiedenen Patientencharakteristika Proteinurie, Lupusnephritis, Lungen-, Herz-, ZNS-, Haut- und Gelenkbeteiligung, sowie der Erniedrigung der Komplementfaktoren C3 und C4 konnte weder zum SNP -137 noch zum SNP -607-656 eine Verbindung hergestellt werden.

### 3.7 Allelkombinationen der SNP -137-607-656 innerhalb der JIA- und SLE-Population

Da vor allem das Zusammenspiel mehrerer SNP zu einer bestimmten Erkrankung führen kann, haben wir die Polymorphismen -137-607-656 des Promotor 1 zusammengefasst.

Für die SNP -137-607-656 konnten in den JIA- und Kontroll-Populationen sechs verschiedene und innerhalb der SLE-Gruppe fünf verschiedene Allelkombinationen ermittelt werden (Tabelle 3.9). Die Kombinationen -137CC-607CA-656GT; -137CC-607CC-656GG und -137CG-607CC-656GG wurden nicht beobachtet. In der Kontrollgruppe ist die häufigste Allelkombination -137GG-607CC-656GG (35,1%) und die seltenste -137CG-607AA-656TT und -137GG-607AA-656TT (4,5%).

<b>Allelkombinationen -137-607-656</b>	<b>JIA gesamt (n)</b>	<b>SLE (n)</b>	<b>Kontrollpersonen (n)</b>
CCAATT	7,52% (17)	5,88% (1)	8,91% (18)
<b>CGAATT</b>	<b>11,50% (26)*</b>	<b>0</b>	<b>4,46% (9)</b>
<b>CGCAGT</b>	<b>29,20% (66)</b>	<b>47,06% (8)**</b>	<b>32,67% (66)</b>
GGAATT	2,21% (5)	11,76% (2)	4,46% (9)
GGCAGT	15,93% (36)	17,65% (3)	14,35% (29)
GGCCGG	33,63% (76)	17,65% (3)	35,15% (71)
<b>Gesamtanzahl</b>	<b>226</b>	<b>17</b>	<b>202</b>

Tabelle 3.9: Allelkombinationen innerhalb der JIA-, SLE- und Kontrollpopulation

\* CGAATT bei JIA-Patienten gegenüber Kontrollpersonen (p=0,008) und nicht signifikant gegenüber SLE-Patienten (p=0,14) erhöht

\*\*CGCAGT bei SLE-Patienten nicht signifikant gegenüber Kontrollpersonen (p=0,23) und gegenüber JIA-Patienten (p=0,12) erhöht

## 3.7.1 JIA-Population

Die häufigste Kombination ist -137GG-607CC-656GG. Sie findet sich bei 76 (33,6%) Patienten. Die Seltenste ist -137GG-607AA-656TT und konnte bei fünf (2,2%) Patienten ermittelt werden.

-137 -607 -656	<b>CC AA TT</b>	%	<b>CG AA TT</b>	%	<b>CG CA GT</b>	%	<b>GG AA TT</b>	%	<b>GG CA GT</b>	%	<b>GG CC GG</b>	%	<b>Gesamtzahl</b>
JIA 1	<b>2</b>	8,7	<b>4</b>	17,4	<b>4</b>	17,4	<b>0</b>	0	<b>2</b>	8,7	<b>11</b>	47,8	<b>23</b>
JIA 2	<b>3</b>	4,9	<b>6</b>	9,8	<b>17</b>	27,9	<b>2</b>	3,3	<b>12</b>	19,7	<b>21</b>	34,4	<b>61</b>
JIA 3	<b>0</b>	0	<b>1</b>	7,1	<b>3</b>	21,4	<b>0</b>	0	<b>4</b>	28,6	<b>6</b>	42,9	<b>14</b>
JIA 4a	<b>5</b>	13,5	<b>4</b>	10,8	<b>9</b>	24,3	<b>2</b>	5,4	<b>4</b>	10,8	<b>13</b>	35,1	<b>37</b>
JIA 4b	<b>1</b>	3,6	<b>6</b>	21,4	<b>11</b>	39,3	<b>0</b>	0	<b>3</b>	10,7	<b>7</b>	25,0	<b>28</b>
JIA 5	<b>4</b>	11,1	<b>4</b>	11,1	<b>11</b>	30,6	<b>1</b>	2,8	<b>4</b>	11,1	<b>12</b>	33,3	<b>36</b>
JIA 6	<b>0</b>	0	<b>0</b>	0	<b>5</b>	35,7	<b>0</b>	0	<b>5</b>	35,7	<b>4</b>	28,6	<b>14</b>
JIA 7	<b>2</b>	15,4	<b>1</b>	7,7	<b>6</b>	46,1	<b>0</b>	0	<b>2</b>	15,4	<b>2</b>	15,4	<b>13</b>
Gesamt	<b>17</b>	7,5	<b>26</b>	11,5	<b>66</b>	29,2	<b>5</b>	2,2	<b>36</b>	15,9	<b>76</b>	33,6	<b>226</b>
Kontrolle	<b>18</b>	8,9	<b>9</b>	4,5	<b>66</b>	32,7	<b>9</b>	4,5	<b>29</b>	14,4	<b>71</b>	35,1	<b>202</b>

Tabelle 3.10: Allelkombinationen innerhalb der einzelnen JIA-Subtypen

Auffällig ist die hohe Anzahl -137CG-607AA-656TT (11,5%) bei den an JIA erkrankten Kindern gegenüber der Kontrollgruppe (4,5%). Diese Allelkombination zeigte sich signifikant häufiger innerhalb der JIA-Population ( $p=0,008$ ). Besonders bei der erweiterten Oligoarthritis (JIA 4b) konnte -137CG-607AA-656TT (21,4%) im Vergleich zur Kontrollgruppe in erhöhter Anzahl nachgewiesen werden ( $p=0,001$ ). Im Gegensatz dazu wurde -137CG-607AA-656TT bei der Psoriasisarthritis (JIA 6) nicht gefunden. Interessanterweise traten radiologische Veränderungen statistisch grenzwertig signifikant häufiger bei Kindern mit dieser Allelkombination auf ( $p=0,07$ ). Denn sieben der elf (63,6%) -137CG-607AA-656TT-Patienten, aber nur 40 der 112 (35,7%) Patienten mit den anderen Kombinationen, wiesen radiologische Veränderungen auf. Auch konnte bei Patienten mit -137CG-607AA-656TT nicht signifikant häufiger ein positiver ANA ermittelt werden ( $p=0,25$ ). So wurden 13 der 25 (52,0%) -137CG-607AA-656TT-Patienten, aber nur 78 der 195 (40,0%) Kinder mit den restlichen Kombinationen ANA positiv getestet.

Vergleicht man Patienten, die in VR traten, mit Kindern, die nicht in Remission oder in Remission unter weiterführender Medikamenteneinnahme traten, konnte die Kombination

-137CC-607AA-656TT bei Kindern mit VR statistisch grenzwertig signifikant vermehrt nachgewiesen werden ( $p=0,08$ ). Die Allelkombination -137GG-607CC-656GG wurde innerhalb der Patientengruppe VR signifikant vermindert angetroffen ( $p=0,02$ ).

Betreffs der Patientencharakteristika Geschlecht, positiver RF, DR4, HLA-B27, Uveitis, Erkrankungsalter, Remission und Entzündungszeichen BSR und CRP konnten keine Zusammenhänge ermittelt werden.

### 3.7.2 SLE-Population

Die häufigste Allelkombination ist -137CG-607CA-656GT und konnte bei acht der 17 (47,06%) Patienten nachgewiesen werden. Diese Kombination trat nicht signifikant häufiger bei SLE-Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen auf ( $p=0,2$ ). Nicht gefunden wurden die Kombination -137CG-607AA-656TT. Es konnte keine statistisch signifikante Beziehung zwischen den verschiedenen Allelkombinationen und dem Auftreten eines SLE hergestellt werden. Auch hinsichtlich der Patientencharakteristika war keine Assoziation möglich. Ein möglicher Grund könnte die niedrige Patientenzahl sein.

## 4 Diskussion

In der vorgelegten Arbeit untersuchten wir den Einfluss der SNP -137, -607 und -656 auf dem Promotor 1 des IL-18-Gens zu Krankheitsmanifestation, -verlauf und Komplikationen bei Patienten mit JIA und SLE.

## 4.1 JIA

Bei einigen Untersuchungen wurde ein Zusammenhang zwischen der JIA-Krankheitsmanifestation und der IL-18-Serumkonzentration (Maeno et al., 2002; Sugiura et al., 2006) ermittelt. In einer japanischen Population untersuchten Sugiura und Mitarbeiter 33 Patienten mit JIA. 17 wiesen eine systemische JIA, 10 eine Polyarthrititis und 6 eine Oligoarthrititis auf. Weiterhin untersuchten sie 28 Patienten mit einem Adult onset Still's disease (AOSD), 164 Patienten mit einer Rheumatoiden Arthritis, 102 Patienten mit einer Kollagenose (davon 38 mit SLE) und 173 gesunde Individuen. Sie ermittelten die Frequenz von 12 SNP und einem 9 Basenpaaren großen Insert und fassten diese zu drei Haplotypen zusammen (siehe Tabelle 4.1). Ein vierter Haplotyp (-137C-607C-656G) konnte nur in einer polnischen Population ermittelt werden (Kretowski et al., 2002).

SNP	9bp	C/T	A/G	T/C	C/G	T/C	G/T	C/A	G/C	T/G	C/T	T/C	C/G
Ort	u	u	u	u	u	u	-656	-607	-137	+113	+127	-920	-133
H1	+	T	G	C	G	C	T	A	G	T	C	T	C
H2	-	C	A	T	C	T	G	C	G	T	C	C	C
H3	+	T	A	T	C	C	T	A	C	G	T	C	G

Tabelle 4.1: Die drei Haplotypen H1, H2 und H3 (Sugiura et al. 2006)

u = unbekannt

Interessanterweise konnten Giedraitis und Mitarbeiter für die Allelkombination -137C-607A-656T eine erniedrigte Genexpression nachweisen. Sie vermuten, dass der Polymorphismus -137 eine potentielle Rolle spielt. Durch den Wechsel der Base -137G zu C wird die H4TF-1-Bindungsstelle verändert. So kann der H4TF-1-Kernfaktor, im Gegensatz zu den Haplotypgruppen 1 (-137G-607A-656T) und 2 (-137G-607C-656G) nicht mehr an die Sequenz des Haplotypen 3 (-137C-607A-656T) bindet (Giedraitis et al., 2001). Neben der

Genotypisierung ermittelten Sugiura und Mitarbeiter bei allen JIA-Patienten den IL-18-Serumspiegel. Interessanterweise zeigt sich der IL-18-Serumwert bei Patienten mit systemischer Arthritis enorm erhöht im Vergleich zu den anderen Subtypen. Vor allem bei den vier Patienten mit der Allelkombination -137GG-607AA-656TT (Haplotyp 1) war der IL-18-Serumwert signifikant gegenüber den 13 anderen JIA 1-Patienten erhöht ( $78,7 \pm 22,8$  pg/ml versus  $10,1 \pm 28,2$  pg/ml). Für die anderen Subtypen konnte kein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Allelkombinationen und der IL-18-Serumkonzentration festgestellt werden (Sugiura et al., 2006). Auch Giedraitis und Mitarbeiter ermittelten, zwar für Multiple Sklerose (MS)-Patienten, für den SNP-137GG einen erhöhten IL-18-Serumwert. Dies weist darauf hin, dass die SNP auf dem IL-18-Promotor dessen Aktivität beeinflussen. Der Vorgang ist bisher nicht näher geklärt. Er könnte in den verschiedenen Zelltypen unterschiedlich ausfallen und/oder von der lokalen Zytokinumgebung abhängig sein (Giedraitis et al., 2001). Erhöhte IL-18-Serumspiegel bei JIA-Patienten wies auch die Arbeitsgruppe um Maeno nach. Sie untersuchten 76 an einer JIA erkrankte und 33 gesunde Kinder. 29 der Patienten konnten der systemischen Arthritis, 29 der Polyarthritis und 18 der Oligoarthritis zugeordnet werden. Für Patienten mit einer systemischen Arthritis ermittelten sie einen signifikant erhöhten IL-18-Serumspiegel ( $45'073 \pm 53'870$  pg/ml) gegenüber der Polyarthritis ( $526 \pm 554$  pg/ml), der Oligoarthritis ( $208 \pm 117$  pg/ml) und den Kontrollpersonen ( $305 \pm 124$  pg/ml). Weiterhin erwies sich die IL-18-Serumkonzentration bei Kindern, die an einer Hepatosplenomegalie oder Serositis erkrankten, signifikant erhöht gegenüber Patienten ohne diese Manifestation. Zwei dieser Patienten starben aufgrund eines ausgeprägten Makrophagenaktivierungssyndroms und einer Verbrauchskoagulopathie. Hierbei ermittelten Maeno und Mitarbeiter extrem hohe IL-18-Serumspiegel ( $200'000$  pg/ml). IL-18 scheint nachweislich an der Krankheitsaktivität der systemischen Arthritis mitzuwirken (Maeno et al., 2002). Das Korrelat zum systemischen JIA-Subtyp ist die Adult onset Still's disease (AOSD). Im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen ist die IL-18-Serumkonzentration bei AOSD-Patienten stark erhöht (Kawashima et al., 2001). Chen und Mitarbeiter untersuchten bei 20 AOSD-, 20 RA-Patienten und 20 Kontrollpersonen die IL-18-Serumkonzentrationen. Auch sie stellten eine Erhöhung der Serumkonzentration bei den AOSD-Patienten fest und konnten gleichzeitig den IL-18-Serumwert mit der Krankheitsaktivität in Zusammenhang bringen. Je höher die IL-18-Konzentration, desto schwerer äußert sich das Krankheitsbild (Chen et al., 2004). Sugiura und Mitarbeiter vermuten, dass die Allelkombination -137GG-607AA-656TT ein Marker für den Krankheitsverlauf ist. Patienten mit dieser Kombination tendierten zu einem niedrigeren

Erkrankungsalter, zu einer stärkeren Medikamententherapie und zu häufigeren Komplikationen, wie dem Makrophagenaktivierungssyndrom. Bisher unklar ist die Pathogenese des hohen IL-18-Serumspiegels. Als mögliche Erklärung sehen Sugiura und Mitarbeiter ein infektiöses Agens, welches die IL-18-Produktion induziert. Daneben vermuten sie weitere Kandidatengene, wie IL-18 mRNA Transkriptions-, Translationsfaktoren, Caspase-1, die die Krankheitsentstehung beeinflussen (Sugiura et al., 2006).

Andere Arbeitsgruppen untersuchten mögliche Zusammenhänge zwischen dem Ausbruch einer JIA und den SNP auf dem IL-18-Gen (Heinzmann et al., 2004, Sugiura et al., 2006). Unsere Untersuchung weist die größte JIA-Patientenanzahl hinsichtlich der IL-18-SNP -137, -607 und -656 in der Literatur auf.

#### 4.1.1 Der SNP IL-18-137 innerhalb der JIA-Population

Auffällig zeigte sich die erhöhte C-Allelfrequenz bei oligoartikulären Krankheitsverläufen im Vergleich zu polyartikulärer Manifestation ( $p=0,05$ ). Eine nicht signifikante Erhöhung konnten wir für Kinder mit erweiterter Oligoarthritis gegenüber Kindern mit einer bereits zu Krankheitsbeginn manifesten Polyarthritis nachweisen ( $p=0,08$ ).

Ein besonderes Augenmerk richteten wir auf den Zusammenhang zur JIA 3. Es ist der einzige juvenile Subtyp, der mit einem positiven RF einhergeht. Es sind vor allem Mädchen jenseits des zehnten Lebensjahres betroffen. Die RF positive Polyarthritis entspricht klinisch weitestgehend der RA des Erwachsenenalters. Die -137C-Allelfrequenz erwies sich bei diesen Patienten gegenüber den Kindern mit den anderen Subtypen ( $p=0,1$ ) und den Kontrollpersonen ( $p=0,1$ ) nicht signifikant erniedrigt. Kein Patient besitzt den Genotyp -137CC. Innerhalb dieser Gruppe erlangten nur zwei der 14 Kinder eine Remission unter weiterer Medikamenteneinnahme (14,3%). Beide Kinder besitzen den Genotypen -137GG. Die Remissionsquote für die gesamte JIA-Population liegt bei 30,0%. Sie ist also mehr als zweimal so hoch. Außerdem zeigt sich für die gesamte JIA-Population eine nicht signifikante Erhöhung der -137C-Allelfrequenz für die in Remission getretenen Kinder ( $p=0,16$ ). Für Patienten die eine VR erlangten, lag die -137C-Allelfrequenz noch höher ( $p=0,09$ ). Die dargestellten Ergebnisse lassen folgende Schlussfolgerung zu. Für die RF positive Polyarthritis lässt sich eine geringere Remissionsquote im Vergleich zu anderen Subtypen nachweisen. Die Remission bestand auch nur unter der Fortführung der Medikamenteneinnahme beibehalten werden. Kein Kind mit RF positiver Polyarthritis

erlangte eine VR. Die RF positive Polyarthrits hebt sich somit von den restlichen JIA-Subtypen und den Kontrollen ab. Welchen Einfluss der SNP -137 auf die Pathogenese der JIA, insbesondere der RF positiven Polyarthrits hat, ist aber bisher ungeklärt. Möglicherweise wird durch die Änderung der Basenfrequenz die GATA3 Bindungsstelle verändert, so dass nachfolgende Transkriptionsvorgänge unterbrochen werden. Bereits erforscht ist die Mitbeteiligung vom Transkriptionsfaktor GATA3 an der Polarisierung der Th2-Zelle (Kuo et Leiden, 1999; Ray et Cohn, 1999). Kruse und Mitarbeiter brachten die Allelvariante -137C mit allergischen Erkrankungen und einem erhöhten IgE-Serumspiegel in Verbindung (Kruse et al., 2003).

Eine nicht signifikant höhere C-Allelfrequenz findet sich bei ANA positiven Patienten ( $p=0,2$ ). Epidemiologische Daten für die kaukasische Bevölkerung zeigen für die RF positive Polyarthrits und die Oligoarthrits eine höhere Anzahl ANA positiver Patienten im Vergleich zu den restlichen Subtypen. In unserer Population ermittelten wir bei acht der 14 Kindern mit einer RF positiven Polyarthrits (57,1%) und bei 41 der 64 Patienten mit einer Oligoarthrits (64,1%) einen positiven ANA. Unsere Ergebnisse spiegeln den kaukasischen Durchschnitt wieder. Patienten mit Oligoarthrits zeigten am häufigsten ANA-Positivität. Gleichzeitig ermittelten wir für diesen Subtyp die höchste C-Allelfrequenz. Im Gegensatz dazu ist die RF positive Polyarthrits durch die zweithöchste Anzahl ANA positiver Kinder, aber die niedrigste C-Allelfrequenz gekennzeichnet. Eine mögliche Ursache wäre eine unterschiedliche Pathogenese der RF negativen JIA-Subtypen und der RF positiven Polyarthrits. Es spricht einiges dafür, dass die RF positive Polyarthrits eine ähnliche Ätiologie und Pathogenese wie die adulte RA aufweist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Patienten mit mindestens einem C-Allel häufiger an einer Oligoarthrits erkranken, häufiger in Remission treten und öfter ANA positiv sind. In der Literatur wurden bisher zu dieser Auffälligkeit keine Artikel veröffentlicht. Hinsichtlich der verschiedenen Patientencharakteristika Geschlecht, RF, HLA-B27, DR4, ANA, Uveitis, radiologische Veränderungen, Erkrankungsalter und Entzündungsaktivität konnten wir keine Assoziation zu dem SNP -137 nachweisen.

#### 4.1.2 Der SNP IL-18-607-656 innerhalb der JIA-Population

Für die SNP -607 und -656 konnten wir ein Kopplungsgleichgewicht beobachten. Eine Arbeitsgruppe bestätigte dies (Sugiura et al. 2006). So wird das -607C (A)-Allel gemeinsam mit dem G- (T)-Allel an der Stelle -656 vererbt. Auch zeigt sich bei Patienten mit einer Oligoarthritis eine nicht signifikante erhöhte -607A-656T-Allelfrequenz gegenüber Patienten mit einer Polyarthritis ( $p=0,16$ ). Auch für Kinder mit einer erweiterten Oligoarthritis haben wir eine nicht signifikante höhere -607A-656T-Allelfrequenz gegenüber Kindern mit einer bereits zu Krankheitsbeginn manifesten Polyarthritis ( $p=0,2$ ) beobachtet. Beachtenswert ist die nicht signifikante -607A-656T-Allelniedrigung innerhalb der RF positiven Polyarthritis im Vergleich zu den anderen JIA-Subtypen ( $p=0,2$ ) und den Kontrollpersonen ( $p=0,2$ ). Auch dies könnte ein Hinweis auf unterschiedliche Pathogenese der RF negativen JIA-Subtypen und der RF positiven Polyarthritis sein.

Patienten der gesamten JIA-Population, die in VR traten, wiesen gegenüber den anderen Kindern eine signifikant erhöhte -607A-656T-Allelfrequenz auf ( $p=0,01$ ). Hinsichtlich der verschiedenen Patientencharakteristika Geschlecht, RF, HLA-B27, DR4, ANA, Uveitis, radiologische Veränderungen, Erkrankungsalter und Entzündungsaktivität konnten wir keine Assoziation zu den SNP -607-656 nachweisen.

#### 4.1.3 Allelkombinationen der SNP -137-607-656 innerhalb der JIA-Population

Die häufigste Allelkombination in unserer JIA- und Kontrollpopulation ist -137GG-607CC-656GG. Es findet sich kein Unterschied zwischen den JIA-Erkrankten und den Kontrollpersonen. Interessant zeigt sich die Allelkombination -137CG-607AA-656TT. Sie tritt signifikant häufiger bei JIA-Patienten auf ( $p=0,008$ ). Besonders bei der erweiterten Oligoarthritis findet sich -137CG-607AA-656TT signifikant häufiger im Vergleich zur Kontrollpopulation ( $p=0,001$ ). Bei elf der 26 -137CG-607AA-656TT Patienten lagen radiologische Befunde vor. Radiologische Veränderungen waren bei sieben Kindern nachweisbar. JIA-Patienten mit dieser Allelkombination zeigen mehr radiologische Veränderungen im Vergleich zu den anderen Allelkombinationen ( $p=0,07$ ). Zwei Kinder konnten der RF negativen, eins der RF positiven Polyarthritis, zwei der Oligoarthritis und zwei der Enthesitis assoziierten Arthritis zugeordnet werden. Aufgrund der niedrigen Anzahl der radiologischen Nachweise kann das Ergebnis aber auch zufällig sein.

Bekannt sind bisher bereits drei veröffentlichte Artikel zur JIA. Heinzmann und Mitarbeiter untersuchten 321 Kinder mit Asthma, 86 Patienten mit einer ANA positiven JIA und 270 Kontrollpersonen innerhalb einer kaukasischen Population. Sie ermittelten die fünf SNP -607, -137, 113, 127 und 133. Für den SNP -137 wiesen 25% der JIA-Patienten und 28% der Kontrollen ein C-Allel auf. Dies entspricht der C-Allelfrequenz in unserer Population. Für den SNP -607 konnten sie bei 36% der an JIA erkrankten Kinder und bei 42% der Kontrollen ein A-Allel nachweisen. Die A-Allelfrequenz der JIA zeigt sich im Vergleich zu unserer Population (43,8%) geringer. Als Erklärung könnte herangezogen werden, dass Heinzmann und Mitarbeiter nur ANA positive Kinder untersuchten, während wir alle JIA-Subtypen berücksichtigten. Für keinen der fünf SNP konnte in dieser Arbeit eine Assoziation nachgewiesen werden (Heinzmann et al., 2004).

Den Haplotyp -137G-607A-656T fanden Sugiura und Mitarbeiter signifikant häufiger bei JIA-Patienten gegenüber den Kontrollpersonen ( $p=0,01$ ). Auch bei der Oligoarthritis wurde dieser häufiger als bei der Kontrollpopulation nachgewiesen ( $p=0,002$ ). Für die Polyarthritis und die systemische Arthritis konnte kein statistischer Unterschied im Vergleich zu den Kontrollpersonen ermittelt werden. Ebenso wurde die Allelkombination -137GG-607AA-656TT signifikant häufiger bei JIA-Patienten ( $p=0,005$ ) insbesondere bei der Oligoarthritis ( $p=0,0006$ ) und bei der Polyarthritis ( $p=0,05$ ) im Vergleich zu gesunden Individuen gefunden. Für den systemischen Typ konnten Sugiura und Mitarbeiter keinen Zusammenhang aufzeigen (Sugiura et al., 2006). Keine Erhöhung der Allelkombination -137GG-607AA-656TT fand sich bei RA-Patienten in einer chinesischen (Sivalingam et al., 2003) und bei JIA-Patienten in einer deutschen Population (Heinzmann et al., 2004). Auch wir konnten keine erhöhte -137GG-607AA-656TT Frequenz nachweisen. Kritisch anzumerken an der Arbeit von Sugiura und Mitarbeitern ist die geringe Patientenzahl, die sich hauptsächlich auf die systemischen Arthritis (17 der 33 JIA-Patienten) beschränkt und nicht alle Subtypen berücksichtigt. Auch wird ein erhöhter IL-18-Serumspiegel bei Kindern mit dem systemischen Typ beschrieben. Es konnte aber keine Assoziation zwischen der systemischen Arthritis und den verschiedenen SNP auf dem IL-18-Gen ermittelt werden. Ein Zusammenhang wurde nur bei der Oligo- und Polyarthritis beobachtet. Hier fand sich aber keine Erhöhung des IL-18-Serumspiegels. Es gibt also weiterhin keine Erklärung für das Zustandekommen der erhöhten IL-18-Serumkonzentration bei Patienten mit systemischer Arthritis. Schlussfolgernd lässt sich vermuten, dass der systemische JIA-Subtyp eine andere Pathogenese als die restlichen JIA-Subtypen aufweist.

Interessanterweise fassten Sugiura und Mitarbeiter die SNP in drei Gruppen zusammen (siehe Tabelle 4.1). Sie zeigten in ihrer eigenen Untersuchung den Zusammenhang zwischen der Gruppe H1 und der Erkrankung JIA oder AOSD auf. So könnte der Haplotyp -137G-607A-656T auf eine Th1 dominierende Immunerkrankung innerhalb einer japanischen Population hindeuten. Für Sarkoidose-Patienten scheint der Haplotyp -137G-607C-656G (Gruppe H2) innerhalb der japanischen Bevölkerung spezifisch zu sein (Takada et al., 2002). Sugiura und Mitarbeiter nutzen auch Daten aus anderen Untersuchungen hinsichtlich Th2 dominierenden Erkrankungen, wie Ekzemerkrankungen und Asthma bronchiale (Higa et al., 2003; Novak et al., 2005). Charakteristisch für die atopischen Erkrankungen innerhalb einer kaukasischen (Kruse et al., 2003) und japanischen Population (Higa et al., 2003; Novak et al., 2005) zeigten sich die Allele -137C+113G+127T-133G. Dies entspricht der Gruppe H3 (Sugiura et al., 2006). Diese Vermutung sollten durch weitere Untersuchungen hinsichtlich der verschiedenen Erkrankungen bestätigt werden.

Der Ansatz dieser Untersuchungen, die verschiedenen SNP auf dem IL-18-Gen zu drei Haplotypen zusammenzufassen, ist sinnvoll, doch bleibt die Ursache des erhöhten IL-18-Serumspiegels bislang ungeklärt. Die Ergebnisse von Sugiura und Mitarbeitern sind noch nicht relevant für das frühzeitige Erkennen der Autoimmunerkrankungen und eine neue Behandlungsoption.

## 4.2 SLE

Auch beim SLE konnten erhöhte IL-18-Serumspiegel beobachtet werden (Wong et al., 2000; Park et al., 2004; Calvani et al., 2005). Wong und Mitarbeiter ermittelten den IL-18-Serumwert bei 40 SLE-Patienten und 18 Kontrollpersonen in einer chinesischen Population. Sie fanden signifikant erhöhte Serumspiegel bei SLE-Patienten (320 pg/ml) im Vergleich zur Kontrollpopulation (130,1 pg/ml). Weiterhin korrelierte die ansteigende IL-18-Serumkonzentration signifikant mit dem Krankheitsaktivitätsindex für SLE-Patienten SLEDAI (Bombardier et al., 1992; Wong et al., 2000). Bestätigt wurde dies durch eine koreanische Untersuchung. Park und Mitarbeiter ermittelten bei 35 SLE-Patienten und 35 Kontrollpersonen die IL-18-Serumkonzentration. Auch hier ergaben sich signifikant erhöhte Serumspiegel bei SLE-Patienten bei Vorliegen eines aktiven Krankheitsschubs. Ebenso korrelierten erhöhte IL-18-Serumwerte mit der Krankheitsschwere, d.h. je höher der Spiegel, desto schwerer die Erkrankung (Park et al., 2004). In einer italienischen Population konnten Calvani und Mitarbeiter bei SLE-Patienten ( $498,7 \pm 369$  pg/ml) einen signifikant erhöhten IL-

IL-18-Serumspiegel gegenüber den Kontrollpersonen ( $213,7 \pm 142,5$  pg/ml) ermitteln. Interessanterweise erwies sich die IL-18-Konzentration bei SLE-Patienten mit einer Lupusnephritis ( $736,9 \pm 447,8$  pg/ml) stark erhöht im Vergleich zu SLE-Patienten ohne Nierenbeteiligung ( $340 \pm 177,6$  pg/ml) (Calvani et al., 2005).

In der vorliegenden Untersuchung konnte kein Zusammenhang zwischen der Manifestation eines SLE und den SNP -137, -607-656 nachgewiesen werden. Einzig auffällig ist die nicht signifikant erhöhte Anzahl des heterozygoten Genotyps -607CA-656GT gegenüber den Kontrollpersonen ( $p=0,16$ ). Auch in der Auswertung der Allelkombinationen schlägt sich die hohe Heterozygotenanzahl nieder. So ist die häufigste Kombination -137CG-607CA-656GT (47,1%). Im Gegensatz zu JIA-Patienten konnten bei SLE-Patienten die Allelkombination -137CG-607AA-656TT nicht gefunden werden. Aufgrund der relativ geringen Patientenanzahl können unsere Ergebnisse nicht als endgültiger Nachweis für eine klinisch relevante Aussage dienen. Sugiura und Mitarbeiter untersuchten neben JIA-Patienten auch 38 Patienten mit einem SLE und konnten ebenfalls keine Tendenzen zwischen den SNP und dem SLE beobachten (Sugiura et al., 2006). Die Ursache des erhöhten IL-18-Serumspiegels ist noch unklar und scheint nicht alleinig von den SNP im Promotor 1 des IL-18-Gens abhängig zu sein. In einer chinesischen Studie wurden 113 SLE-Patienten und 218 gesunde Kontrollpersonen hinsichtlich der SNP -137 und -607 untersucht. Interessanterweise konnte der SNP -607CC signifikant häufiger nachgewiesen werden ( $p<0,05$ ), während die Heterozygotenvariante -607CA im Vergleich zur Kontrollpopulation signifikant erniedrigt war ( $p<0,05$ ). Auch fanden Xu und Mitarbeiter für SLE-Patienten eine signifikant erhöhte IL-18-Serumkonzentration gegenüber den Kontrollpersonen. Auffällig zeigte sich der erhöhte IL-18-Serumspiegel bei Patienten und Kontrollpersonen mit dem Genotyp -607CC und -607CA gegenüber den Individuen mit dem Genotyp -607AA (Xu et al., 2007). Unsere Ergebnisse entsprechen dem Gegenteil: -607CC ist gegenüber der Kontrollpopulation nicht signifikant erniedrigt ( $p=0,14$ ), der heterozygote Genotyp -607CA gegenüber den Kontrollpersonen nicht signifikant erhöht ( $p=0,16$ ). Das A-Allel findet sich in unserer Untersuchung nicht signifikant häufiger ( $p=0,2$ ). Die Arbeitsgruppe um Xu und Mitarbeiter haben einen großen Patientenstamm (113) untersucht, während wir nur 17 am SLE erkrankte Patienten untersucht haben. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit könnte die verschiedene ethnische Zugehörigkeit oder die einwirkenden Umweltfaktoren sein.

### 4.3 Weitere Autoimmunerkrankungen und deren Zusammenhang zu den SNP im IL-18-Gen

#### 4.3.1 Rheumatoide Arthritis (RA)

Die häufigste rheumatische Erkrankung ist die RA. Sie entspricht klinisch weitestgehend der RF positiven Polyarthritis der JIA. Durch ihre weltweit große Häufigkeit stand und steht sie im Mittelpunkt vieler Untersuchungen um weitere Therapiemöglichkeiten zu ermitteln. So scheint das IL-18-Gen auch bei der Pathogenese der RA eine wichtige Rolle zu spielen (Gracie et al., 1999). In einer asiatischen Population mit 106 an einer rheumatischen Arthritis erkrankten Patienten und 273 gesunden Kontrollpersonen wurde der SNP -607AA signifikant häufiger in der Kontrollgruppe gefunden. Das Vorhandensein könnte einen protektiven Faktor darstellen. Eine Erklärung dieses Effektes könnte die Hemmung des cAMP-responsive-element (CRE)-Bindungsproteins durch Unterbrechung der CRE-Sequenz sein (ursächlich ist der Basenaustausch C zu A). Für den SNP -137 konnte kein Zusammenhang zur Erkrankung hergestellt werden. Auch zum RF konnte keine Assoziation beobachtet werden. Beim Genotypenvergleich fand sich am häufigsten die Allelkombination -137GG-607CA-656GT in der RA- und Kontrollgruppe. Die Allelkombination -137CC-607CC-656GG wurde nicht nachgewiesen (Sivalingam et al. 2003). Eine weitere Arbeitsgruppe suchte innerhalb zweier Kohorten nach einem Zusammenhang zwischen den SNP -137 und -607 und der RA. 102 deutsche an RA erkrankte Patienten wurden mit 98 Kontrollpersonen verglichen. Für den Polymorphismus -137 konnte keine Verbindung aufgezeigt werden. Das -607A-Allel trat innerhalb der JIA-Population seltener auf ( $p=0,06$ ). Der Genotyp -607CC konnte signifikant häufiger bei RA-Patienten ermittelt werden ( $p=0,001$ ). In der schottische Population zeichnete sich für den SNP -607 keine Assoziation ab. Für den SNP -137 konnte das C-Allel etwas häufiger in der Patientengruppe ermittelt werden ( $p=0,15$ ). Beim Vergleich der Genotypen konnte CC signifikant häufiger bei den RA-Patienten beobachtet werden ( $p=0,016$ ) (Gracie et al., 2005). Rueda und Mitarbeiter bestimmten die SNP -137 und -607 bei 362 RA-Patienten und 339 Kontrollpersonen in einer spanischen Population. Sie konnten dagegen keine Zusammenhänge zum Vorliegen der Erkrankung oder zu bestimmten Patientencharakteristika wie Geschlecht, Rheumafaktor, Erkrankungsalter und extraartikulärer Manifestationen ermitteln (Rueda et al., 2005). Auch für die RA ist der Erkrankungsmechanismus weiter unbekannt. Es konnte bisher kein SNP auf dem IL-18-Gen eruiert werden, welcher die Krankheitsentstehung und den Verlauf der RA beeinflusst.

#### 4.3.2 Sarkoidose

Eine Arbeitsgruppe untersuchte die IL-18-Serumkonzentration in der bronchoalveolären Flüssigkeit bei Sarkoidose-Patienten. Diese zeigte sich gegenüber den gesunden Kontrollindividuen erhöht (Shigehara et al., 2000). Takada und Mitarbeiter untersuchten 119 an einer Sarkoidose erkrankte Patienten innerhalb der japanischen Bevölkerung hinsichtlich der SNP -137 und -607. Es konnte keine Assoziation zum Polymorphismus -137 hergestellt werden. Allerdings ließ sich das -607C-Allel signifikant häufiger in der Patienten- als in der Kontrollgruppe nachweisen ( $p=0,006$ ). Der Genotyp -607CA fand sich häufiger bei Patienten (52,9%) im Vergleich zur Kontrollpopulation (39,2%). Zwischen den verschiedenen Patientencharakteristika Haut-, Herz-, Augenbeteiligung und den SNP wurde kein Zusammenhang festgestellt. Bei Sarkoidose-Patienten wurde die Allelkombination -137G -607C-656G (Gruppe H2) häufiger als bei den Kontrollpersonen ermittelt ( $p=0,031$ ) (Takada et al., 2002).

#### 4.3.3 Diabetes mellitus Typ1

Ide und Mitarbeiter untersuchten 116 Patienten mit Diabetes mellitus Typ1 aus der japanischen Bevölkerung hinsichtlich der SNP -137 und -607. Bezüglich des Polymorphismus -137 konnte kein Zusammenhang hergestellt werden. Interessanterweise fand sich der SNP -607C häufiger innerhalb der Diabetes-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollpersonen ( $p=0,062$ ). Der Genotyp -607AA zeigte sich seltener bei Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ1 im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p=0,023$ ). Bezüglich der Patientencharakteristika Geschlecht und Erkrankungsalter konnte keine Verbindung zu den SNP hergestellt werden. Es konnten alle drei Haplotypen (siehe Tabelle 4.1) nachgewiesen werden. Auffällig ist das häufigere Vorkommen der Haplotypen -137G-607C-656G (Gruppe H2) bei Diabetes-Patienten im Vergleich zur Kontrollpopulation ( $p=0,006$ ) (Ide et al., 2004).

#### 4.3.4 Multiple Sklerose (MS)

Giedraitis und Mitarbeiter untersuchten 208 schwedische Patienten mit MS hinsichtlich der IL-18 SNP -656, -607, -137, +113 und +127. Beim Allelvergleich konnte keine Verbindung zwischen den SNP -137, -607 und der MS hergestellt werden. Das -137C-Allel fand sich nicht signifikant häufiger innerhalb der Patientengruppe ( $p=0,17$ ). Bei der IL-18 Expressionsanalyse mittels RT-PCR zeigten sich für Patienten mit der Allelkombination -137GG-607CC-656GG (Gruppe H2) eine höhere IL-18 mRNA Konzentration ( $p=0,17$ ) im Vergleich zu den anderen Genotypen. Auch Giedraitis und Mitarbeiter ermittelten die drei Haplotypgruppen (siehe Tabelle 4.1) für MS-Patienten (Giedraitis et al., 2001).

In ihrem Tiermodell zur MS konnten Rothe und Mitarbeiter die erhöhte IL-18-mRNA Produktion mit der Krankheitsaktivität assoziieren. Je höher die IL-18-Serumkonzentration ist, desto schwerer zeigte sich das Krankheitsbild (Rothe et al., 1999).

#### 4.4 Fazit

Wir konnten in unserer Arbeit etliche Unterschiede zwischen den erkrankten Kindern und der gesunden Kontrollpopulation herausarbeiten. Interessant zeigt sich vor allem der SNP -137. Patienten die mindestens ein -137C-Allel aufweisen, erkranken häufiger an einer Oligoarthritis, sind häufiger ANA positiv und treten häufiger in Remission. Auch die verschiedenen Kombinationsvarianten der SNP -137-607-656 auf dem Promotor 1 des IL-18-Gens erweckten unser Interesse. Auffällig zeigt sich hier vor allem die Allelkombination -137CG-607AA-656TT, die gehäuft innerhalb der JIA-Population im Vergleich zu den Kontrollpersonen anzutreffen war. Ebenfalls wurde sie bei Kindern mit radiologischen Veränderungen häufiger gefunden. Eine andere Kombination -137CC-607CC-656GG konnte vermehrt bei Kindern, die in vollständige Remission traten, nachgewiesen werden. Es scheint, dass das Zusammenspiel mehrerer SNP entscheidend für die Krankheitsentstehung und der Krankheitsverlauf ist. Auch das einige Arbeitsgruppen einen erhöhten IL-18-Serumwert bei an JIA und SLE erkrankten Patienten nachweisen konnten (Maeno et al., 2002; Calvani et al., 2005; Suigara et al., 2006; Xu et al., 2007), spricht für eine Beteiligung der SNP auf dem IL-18-Gen an der Pathogenese der Autoimmunerkrankungen JIA und SLE. Zusammenfassend zeigen sich in der Literatur teils unterschiedliche Ergebnisse über die SNP auf dem IL-18-Gen. Wichtige Faktoren hierfür könnten die verschiedenen ethnischen Hintergründe und Umweltfaktoren sein. So scheinen einige Polymorphismen auf dem IL-18-Gen innerhalb der asiatischen, aber nicht in der kaukasischen Bevölkerung und umgekehrt eine Rolle zu spielen (Sugiura et al. 2006). Bisher noch ungeklärt ist der Einfluss der SNP auf den Organismus. Warum besitzen gesunde Kinder den gleichen Polymorphismus wie schwerst Erkrankte? Welches Zusammenspiel, welche Zytokinumgebung ist notwendig um eine Autoimmunerkrankung, wie die JIA auszulösen? Diese Fragen sind bis zum heutigen Zeitpunkt nicht geklärt. IL-18 ist ein weiterer Ansatz um die Pathogenese verstehen zu lernen. Ein Zytokin, welches beide, die Th1- und Th2-Immunantwort induzieren kann; welches viele verschiedene Zytokine, wie TNF $\alpha$  und Metalloproteinasen freisetzt und somit an den unterschiedlichen Geweben/Organen des Körpers, wie u. a. Gelenke, Niere, Herz, Lunge und Immunsystem, wirkt.

Es wäre wichtig, weitere Untersuchungen bezüglich des IL-18-Gens in Verbindung mit den Erkrankungen JIA und SLE in den verschiedenen ethnischen Gruppen durchzuführen. Ziel sollte es sein, die Pathogenese endgültig zu verstehen, um neue und verbesserte Therapieoptionen ableiten zu können.

## 5 Literatur

1. Albert ED, Scholz S: Juvenile arthritis: genetic update. *Baillieres Clin Rheumatol* 12 (1998) 209-218
2. Alsaeid KM, Haider MZ, al-Awadhi AM, Srivastva BS, Ayoub EM: Role of human leukocyte antigen DRB1\*0307 and DRB1\*0308 in susceptibility to juvenile rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 21 (2003) 399-402
3. Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM: T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression on naive CD4+ T cells. *Nat Immunol* 3 (2002) 549-557
4. Akita K, Ohtsuki T, Nukada Y, Tanimoto T, Namba M, Okura T, Takakura-Yamamoto R, Torigoe K, Gu Y, Su MS, Fujii M, Satoh-Itoh M, Yamamoto K, Kohno K, Ikeda M, Kurimoto M: Involvement of caspase-1 and caspase-3 in the production and processing of mature human interleukin-18 in monocytic THP 1 cells. *J Biol Chem* 272 (1997) 26595-26603
5. al-Janadi M, al-Balla S, al-Dalaan A, Raziuddin S: Cytokine profile in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and other rheumatic disease. *J Clin Immunol* 13 (1993) 58-67
6. Alphey L: DNA-Sequenzierung. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 1998, S.32
7. Amital H, Schoenfeld Y: Autoimmunity and autoimmune disease such as systemic lupus erythematosus. In: Lahita RG (Ed): *Systemic lupus erythematosus* Academic Press New York 1999, S.1-11
8. Arend WP, Dayer JM: Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 33 (1990) 305-315

9. Block SR, Winfield JB, Lockshin MD, D'Angelo WA, Christian CL: Studies of twins with systemic lupus erythematosus: a review of the literature and presentation of 12 additional sets. *Am J Med* 59(1975) 533-552
10. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH: Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 35 (1992) 630-640
11. Born TL, Thomassen E, Bird TA, Sims JE: Cloning a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling. *J Biol Chem* 273 (1998) 29445-29450
12. Botto M, Dell'Agnola C, Bygrave AE, Thompson EM, Cook HT, Petry F, Loos M, Pandolfi PP, Walport MJ: Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat Genet* 19 (1998) 56-59
13. Brunner HI, Silverman ED, To T, Bombardier C, Feldman BM: Risk factors for damage in childhood-onset systemic lupus erythematosus: cumulative disease activity and medication use predict disease damage. *Arthritis Rheum* 46 (2002) 436-444
14. Calvani N, Tucci M, Richards HB, Tartaglia P, Silvestris F: Th1 cytokines in the pathogenesis of lupus nephritis: the role of IL-18. *Autoimmunity Reviews* 4 (2005) 542-548
15. Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV: TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383 (1996) 443-446
16. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, Domenech I, Aydintug AO, Jedryka-Goral A, de Ramon E, et al.: Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine (Baltimore)* 72 (1993) 113-124

17. Chen DY, Lan JL, Lin FJ, Hsieh TY, Wen MC: Predominance of Th1 cytokine in peripheral blood and pathological tissues of patients with active untreated adult onset Still's disease. *Ann Rheum Dis* 63 (2004) 1300-1306
18. Clemens LE, Albert E, Ansell BM: HLA studies in IgM rheumatoid-factor-positive arthritis in childhood. *Ann Rheum Dis* 42 (1983) 431-434
19. Croston GE, Cao Z, Goeddel DV: NF- $\kappa$ B activation by interleukin-1 (IL-1) requires an IL-1 receptor-associated protein kinase activity. *J Biol Chem* 270 (1995) 16514-16517
20. Date Y, Seki N, Kamizono S, Higuchi T, Hirata T, Miyata K, Ohkuni M, Tatsuzawa O, Yokota S, Joo K, Ueda K, Sasazuki T, Kimura A, Itoh K, Kato H: Identification of a genetic risk factor for systemic juvenile rheumatoid arthritis in the 5'-flanking region of the TNF $\alpha$  gene and HLA genes. *Arthritis Rheum* 42 (1999) 2577-2582
21. Davas EM, Tsirogianni A, Kappou I, Karamitsos D, Economidou I, Dantis PC: Serum IL-16, TNF- $\alpha$ , p55 sr TNF- $\alpha$ , p75 sr TNF- $\alpha$ , srIL-12  $\alpha$  levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 18 (1999) 17-22
22. Davies EJ, Snowden N, Hillarby MC, Carthy D, Grennan DM, Thomson W, Ollier WE: Mannose-binding Protein gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 38 (1995) 110-114
23. Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachmann B, Roy-Burman P, Walker A, Mack TM: A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 35 (1992) 311-318
24. De Benedetti F, Maezza C, Vivarelli M, Rossi F, Pistorio A, Lamb R, Lunt M, Thomson W, Ravelli A, Donn R, Martini A; British Paediatric Rheumatology Study Group: Functional and prognostic relevance of the -173 polymorphism of the macrophage migration inhibitory factor gene in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 48 (2003) 1398-1407

25. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M: A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature* 388 (1997) 548-554
26. Dinarello CA: IL-18: A TH1-inducing proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol* 103 (1999) 11-24
27. Dinarello CA, Moldawer LL: Proinflammatory and Anti-inflammatory Cytokines in Rheumatoid Arthritis. Amgen. 2002
28. Dolhain RJ, van der Heiden AN, ter Haar NT, Breedveld FC, Miltenburg AM: Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39 (1996) 1961-1969
29. Dubois EL, Tufanelli DL: Clinical manifestations of systemic lupus erythematosus. Computer analysis of 520 cases. *JAMA* 190 (1964) 104.113
30. Esfandiari E, McInnes IB, Lindop G, Huang FP, Field M, Komai-Koma MK, Wei X, Liew FY: A proinflammatory role of IL-18 in the development of spontaneous autoimmune disease. *J Immunol* 167 (2001) 5338-5347
31. Eskdale J, Wordworth P, Bowman S, Field M, Gallagher G: Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 49 (1997) 635-639
32. Fernandez-Vina MA, Fink CW, Stastny P: HLA antigens in juvenile arthritis. Pauciarticular and polyarticular juvenile arthritis are immunogenetically distinct. *Arthritis Rheum* 33 (1990) 1787-1794
33. Font J, Cervera R, Espinosa G, Pallarés L, Ramos-Casals M, Jiménez S, Garcia-Carrasco M, Seisdedos L, Ingelmo M: Systemic lupus erythematosus (SLE) in childhood: analysis of clinical and immunological findings in 34 patients and comparison with SLE characteristic adults. *Ann Rheum Dis* 57 (1998) 456-459

34. Forre O, Dobloug JH, Hoyeraal HM, Thorsby E: HLA antigens in juvenile arthritis. Genetic bases for the different subtypes. *Arthritis Rheum* 26 (1983) 35-38
35. Fujikawa S, Okuni M: Clinical analysis of 570 cases with juvenile rheumatoid arthritis: results of a nationwide retrospective survey in Japan. *Acta Paediatr Jpn* 39 (1997) 245-249
36. Gattorno M, Facchetti P, Ghiotto F, Vignola S, Buoncompagni A, Prigione I, Picco P, Pistoia V: Synovial fluid T cell clones from oligoarticular juvenile arthritis patients display a prevalent Th1/Th0-type pattern of cytokine secretion irrespective of immunophenotype. *Clin Exp Immunol* 109 (1997) 4-11
37. Gracie JA: Interleukin-18 as a potential target in inflammatory arthritis. *Clin Exp Immunol* 136 (2004) 402-404
38. Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL, Gilmour A, Leung BP, Greer MR, Kennedy K, Carter R, Wei XQ, Xu D, Field M, Foulis A, Liew FY, McInnes IB: A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 104 (1999) 1393-1401
39. Gracie JA, Koyama N, Murdoch J, Field M, McGarry F, Crilly A, Schobel A, Madhok R, Pons-Kühnemann J, McInnes IB, Möller B: Disease association of two distinct interleukin-18 promoter polymorphisms in Caucasian rheumatoid arthritis patients. *Genes Immun* 6 (2005) 211-216
40. Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB: Interleukin-18. *J Leukoc Biol* 73 (2003) 213-224
41. Gerdes N, Sukhova GK, Libby P, Reynolds RS, Young JL, Schonbeck U: Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis. *J Exp Med* 195 (2002) 245-257

42. Gibofsky A, Winchester RJ, Patarroyo M, Fotino M, Kunkel HG: Disease association of the Ia-like human alloantigens. Contrasting patterns in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 148 (1978) 1728-1732
43. Giedraitis V, He B, Huang WX, Hillert J: Cloning and mutation analysis of the human Il-18 promotor: a possible role of polymorphism in expression regulation. *J Neuroimmunol* 112 (2001) 146-152
44. Grumet FC, Coukell A, Bodmer JG, Bodmer WF, McDevitt HO: Histocompatibility (HL-A) antigens associated with systemic lupus erythematosus. A possible genetic predisposition to disease. *N Engl J Med* 285 (1971) 193-196
45. Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, Hayashi N, Higashino K, Okamura H, Nakanishi K, Kurimoto M, Tanimoto T, Flavell RA, Sato V, Harding MW, Livingston DJ, Su MS: Activation of interferon- $\gamma$  inducing factor mediated by interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Science* 275 (1997) 206-209
46. Haas JP, Nevinny-Stickel C, Schoenwald U, Truckenbrodt H, Suschke J, Albert ED: Susceptible and protective major histocompatibility complex class II alleles in early-onset pauciarticular juvenile chronic arthritis. *Hum Immunol* 41(1994) 225-233
47. Haus-Seuffert P, Meisterernst M: Mechanisms of transcriptional activation of cAMP-responsive element-binding-protein CREB. *Mol Cell Biochem* 212 (2000) 5-9
48. Heinzmann A, Gerhold K, Ganter K, Kurz T, Schuchmann L, Keitzer R, Berner R, Deichmann KA.: Association study of polymorphisms within interleukin-18 in juvenile idiopathic arthritis and bronchial asthma. *Allergy* 59 (2004) 845-849
49. Heninger E, Treszl A, Kocsis I, Derfalvi B, Tulassay T, Vasarhelyi B: Genetic variants of the interleukin-18 promotor region (-607) influence of course of necrotising enterocolitis in very low birth weight neonates. *Eur J Pediatr* 161 (2002) 410-411

50. Hess EV: Lupus- the Clinical Entity. In Lupus: Kammer GM, Tsokos GC (Eds): Molecular and cellular pathogenesis. Humana Press, Totowa, 1999, S 1-12
51. Higa S, Hirano T, Mayumi M, Hiraoka M, Ohshima Y, Nambu M, Yamaguchi E, Hizawa N, Kondo N, Matsui E, Katada Y, Miyatake A, Kawase I, Tanaka T: Association between interleukin-18 gene polymorphism 105 A/C and asthma. Clin Exp Immunol 33 (2003) 1097-1102
52. Ho CT, Mok CC, Lau CS, Wong RW: Late onset systemic lupus erythematosus in southern Chinese. Ann Rheum Dis 57 (1998) 437-440
53. Horneff G: Ätiopathogenese des systemischen Lupus erythematoses. Monatsschrift Kinderheilkunde 154 (2006) 1177-1188
54. Horwitz DA, Stohl W, Gray JD: T-lymphocytes, natural killer cells, cytokines, and immune regulation. In: Wallace DJ, Hahn BJ (Eds): Duboi's lupus erythematosus. Williams & Willkins, Baltimore 1997, S.155-194
55. Hoshino K, Tsutsui H, Kawai T, Takeda K, Nakanishi K, Takeda Y, Akira S: Cutting edge: generation of IL-18 receptor-deficient mice: evidence for IL-1 receptor-related protein as an essential IL-18 binding receptor. J Immunol 162 (1999) 5041-5044
56. Hyodo Y, Matsui K, Hayashi N, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yamauchi H, Hiroishi K, Takeda K, Tagawa Y, Iwakura Y, Kayagaki N, Kurimoto M, Okamura H, Hada T, Yagita H, Akira S, Nakanishi K, Higashino K.: IL-18 up-regulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin messenger RNA expression by binding to constitutively expressed IL-18 receptor. J Immunol 162 (1999) 1662-1668
57. Ide A, Kawasaki E, Abiru N, Sun F, Kobayashi M, Fukushima T, Takahashi R, Kuwahara H, Kita A, Oshima K, Uotani S, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Eguchi K: Association between IL-18 gene promotor polymorphisms and CTLA-4 gene 49A/G polymorphism in Japanese patients with type 1 diabetes. J Autoimmunity 22 (2004) 73-78

58. Kawashima M, Yamamura M, Taniai M, Yamauchi H, Tanimoto T, Kurimoto M, Miyawaki S, Amano T, Takeuchi T, Makino H: Levels of interleukin-18 and its binding inhibitors in the blood circulation of patients with adult-onset Still's disease. *Arthritis Rheum* 46 (2001) 2539-2541
59. Kjeldsen-Kragh J, Quayle A, Kalvenes C, Forre O, Sorskaar D, Vinje O, Thoen J, Natvig JB: T gamma delta cells in juvenile rheumatoid arthritis and rheumatoid arthritis. In the juvenile rheumatoid arthritis synovium the T gamma delta cells express activation antigens and are predominantly V delta 1+, and a significant proportion of these patients have elevated percentages of T gamma delta cells. *Scand J Immunol* 32 (1990) 651-659
60. Koene HR, Kleijer M, Swaak AJG, Sullivan E, Bijl M, Petri MA, Kallenberg CGM, Roos D, von dem Borne AEGK, de Haas M: The FcγRIIIa-158F allele is a risk factor for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41 (1998) 1813-1818
61. Kretowski A, Mironczuk K, Karpinska A, Bojaryn U, Kinalski M, Puchalski Z, Kinalska I: Interleukin-18 promoter polymorphism in type 1 diabetes. *Diabetes* 51 (2002) 3347-3349
62. Kruse S, Kuehr J, Moseler M, Kopp MV, Kurz T, Deichmann KA, Foster PS, Mattes J: Polymorphisms in the IL 18 gene are associated with specific sensitization to common allergens and allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 111 (2003) 117-122
63. Kuo CT, Leiden JM: Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function. *Annu Rev Immunol* 17 (1999) 149-187
64. Lee WK, Song CH, Park YB, Lee CW, Suh CH, Lee CH, Lee J, Kim DS, Lee SK: Correlation of serum interleukin-8 with clinical activity in systemic lupus erythematosus (SLE). *Korean J Med* 54 (1998) 770-777
65. Leung BP, Culshaw S, Gracie JA, Hunter D, Canetti CA, Campbell C, Cunha F, Liew FY, McInnes IB.: A role for IL-18 in neutrophil activation. *J Immunol* 167 (2001) 2879-2886

66. Maeno N, Takei S, Nomura Y, Imanaka H, Hokonohara M, Miyata K: High elevated serum levels of interleukin-18 in systemic juvenile idiopathic arthritis but not in other juvenile idiopathic arthritis subtypes or in Kawasaki disease: comment on the article by Kawashima et al. *Arthritis Rheum* 46 (2002) 2539-2541; author reply 2541-2542
67. Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D: MAP3K-related kinase involved in NK- $\kappa$ B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385 (1997) 540-544
68. McMurray RW, May W: Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis. *Arthritis Rheum* 48 (2003) 2100-2110
69. McDowell TL, Symons JA, Ploski R, Forre O, Duff GW: A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin-1 alpha polymorphism. *Arthritis Rheum* 38 (1995) 221-228
70. Miller ML, Aaron S, Jackson J, Fraser P, Cairns L, Hoch S, Borel Y, Larson M, Glass DN: HLA gene frequencies in children and adults with systemic onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 28 (1985) 146-150
71. Miltenburg AM, van Laar JM, de Kuiper R, Daha MR, Breedveld FC: T cells cloned from human rheumatoid synoviale membrane functionally represent the Th1 subset. *Scand J Immunol* 35 (1992) 603-610
72. Mitchell DA, Pickering MC, Warren J, Fossati-Jimack L, Cortes-Hernandez J, Cook HT, Botto M, Walport MJ: C1q deficiency and autoimmunity: the effects of genetic background on disease expression. *J Immunol* 168 (2002) 2538-2543
73. Mitterski B, Drynda S, Boschow G, Klein W, Oppermann J, Kekow J, Epplen JT: Complex genetic predisposition in adult and juvenile rheumatoid arthritis. *BMC Genet* 5 (2004) 1-14
74. Mok CC, Mak A, Chu WP, To CH, Wong SN: Long-term survival of southern chinese patients with systemic lupus erythematosus. A prospective study of all age-groups. *Medicine (Baltimore)* 84 (2005) 218-224

75. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, Luzzza F, Fusco A, Pallone F: Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* 163 (1999) 143-147
76. Morel JC, Park CC, Zhu K, Kumar P, Ruth JH, Koch AE: Signal transduction pathways involved in rheumatoid arthritis synovial fibroblast interleukin-18-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression. *J Biol Chem* 277 (2002) 34679-3491
77. Moroldo MB, Chaudhari M, Shear E, Thompson SD, Glass DN, Giannini EH: Juvenile rheumatoid arthritis affected sibpairs. *Arthritis & Rheumatism* 50 (2004) 1928-1934
78. Mosmann TR, Coffman RL: Th1 and th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7 (1989) 145-173
79. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H: Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev* 12 (2001) 53-72
80. Nakamura K, Okamura H, Wada M, Nagata K, Tamura T: Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infect Immun* 57 (1989) 590-595
81. Netea MG, Fantuzzi G, Kullberg BJ, Stuyt RJ, Pulido EJ, McIntyre RC Jr, Joosten LA, Van der Meer JW, Dinarello CA: Neutralization of IL-18 reduces neutrophil tissue accumulation and protects mice against lethal *Echerichia coli* and *Salmonella typhimurium* endotoxemia. *J Immunol* 164 (2000) 2644-2649
82. Newton CR, Graham A: PCR. 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1994, S.28
83. Novak N, Kruse S, Potreck J, Maintz L, Jenneck C, Weidinger S, Fimmers R, Bieber T: Single nucleotide polymorphisms of the IL 18 gene are associated with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 115 (2005) 828-833

84. Oen K, Petty RE, Schroeder ML: An association between HLA-A2 and juvenile rheumatoid arthritis in girls. *J Rheumatol* 9 (1982) 916-920
85. Park MC, Park YB, Lee SK: Elevated interleukin-18 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 23 (2004) 225-229
86. Park YB, Lee SK, Kim DS, Lee J, Lee CH, Song CH: Elevated IL-10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 16 (1998) 283-288
87. Paul C, Yao Z, Nevinny-Stickel C, Keller E, Schoenwald U, Truckenbrodt H, Hoza J, Suschke HJ, Albert ED: Immunogenetics of juvenile chronic arthritis. HLA interactions between A2, DR5/8-DR/DQ, and DPB1\*0201 is a general feature of all subsets of early onset pauciarticular juvenile chronic arthritis. *Tissue Antigens* 45 (1995) 280-283
88. Petty RE, Southwood TR, Manners P, Baum J, Glass DN, Goldenberg J, He X, Maldonado-Cocco J, Orozco-Alcala J, Prieur AM, Suarez-Almazor ME, Woo P; International League of Associations for Rheumatology.: International League of Association for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol* 31 (2004) 390-392
89. Pickering MC, Walport MJ: Links between complement abnormalities and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 39 (2000) 133-141
90. Pirhonen J: Regulation of IL-18 expression in virus infection. *Scand J Immunol* 53 (2001) 533-539
91. Ploski R: Immunogenetic polymorphism and disease mechanism in juvenile chronic arthritis. *Rev Rhum Engl Ed* 64 (1997) 127-130
92. Ploski R, Flato B, Vinje O, Maksymowych W, Forre O, Thorsby E: Association to HLA-DRB1\*08, HLA-DPB1\*0301 and homozygosity for an HLA-linked proteasome gene in juvenile ankylosing spondylitis. *Hum Immunol* 44 (1995) 88-96

93. Ploski R, Vinje O, Ronningen KS, Spurkland A, Sorskaar D, Vartdal F, Forre O: HLA class II alleles and heterogeneity of juvenile rheumatoid arthritis. DRB1\*0101 may define a novel subset of disease. *Arthritis Rheum* 36 (1993) 465-472
94. Rachelefsky GS, Terasaki PI, Katz R, Stiehm ER: Increased prevalence of W27 in juvenile rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 290 (1974) 892-893
95. Ray A, Cohn L: Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *J Clin Invest* 104 (1999) 985-993
96. Reinertsen JL, Klippel JH, Johnson AH, Steinberg AD, Decker JL, Mann DL: B-lymphocyte alloantigens associated with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 299 (1978) 515-518
97. Rothe H, Hausmann A, Casteels K, Okamura H, Kurimoto M, Burkart V, Mathieu C, Kolb H: IL-18 inhibits diabetes development in nonobese diabetic mice by counterregulation of Th1-dependent destructive insulinitis. *J Immunol* 163 (1999) 1230-1236
98. Rueda B, González-Gay MÁ, Mataran L, López-Nevot MÁ, Martín J: Interleukin-18-promotor polymorphisms are not relevant in rheumatoid arthritis *Tissue Antigens* 65 (2005) 544-548
99. Schur PH, Meyer I, Garovoy M, Carpenter CB: Associations between systemic lupus erythematosus and the major histocompatibility complex: clinical and immunological considerations. *Clin Immunol Immunopathol* 24 (1982) 263-275
100. Seya T, Matsumoto M, Shiratori I, Fukumori Y, Toyoshima K: Protein polymorphism of human IL-18 identified by monoclonal antibodies. *Int J Mol Med* 8 (2001) 585-590
101. Shigehara K, Shijubo N, Ohmichi M, Yamada G, Takahashi R, Okamura H, Kurimoto M, Hiraga Y, Tatsuno T, Abe S, Sato N: Increased levels of interleukin-18 in patients with pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 162 (2000) 1979-1982

102. Sivalingam SP, Yoon KH, Koh DR, Fong KY: Single-nucleotide polymorphism of the interleukin-18 gene promoter region in rheumatoid arthritis patients: protective effect of AA genotype. *Tissue Antigens* 62 (2003) 498-504
103. Smeltz RB, Chen J, HU-LI J, Shevach EM: Regulation of interleukin (IL)-18 receptor alpha chain expression on CD4(+) T cells during T helper(Th)1/ Th2 differentiation. Critical downregulatory role of IL-4. *J Exp Med* 194 (2001) 143-153
104. Spronk PE, ter Borg EJ, Kallenberg CG: Plasma concentration of IL-6 in systemic lupus erythematosus: an indicator of disease activity? *Clin Exp Immunol* 90 (1992) 106-110
105. Sugiura T, Maeno N, Kawaguchi Y, Takei S, Imanaka H, Kawano Y, Terajima. Ichida H, Hara M, Kamatani N: A promoter haplotype of interleukin-18 gene is associated with juvenile idiopathic arthritis in the Japanese population. *Arthritis Res Ther* 8 (2006) 1-9
106. Takada T, Suzuki E, Morohashi K, Gejyo F: Association of single nucleotide polymorphism in IL-18 gene with sarcoidosis in a Japanese population. *Tissue Antigens* 60 (2002) 36-42
107. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 25 (1982) 1271-1277
108. Tokano Y, Morimoto S, Kaneko H, Amano H, Nozawa K, Takasaki Y, Hashimoto H: Levels of IL-12 in sera of patients with systemic lupus erythematosus (SLE)-relation to Th1 and Th2 derived cytokines. *Clin Exp Immunol* 116 (1999) 169-173
109. Tominaga K, Yoshimoto T, Torigoe K, Kurimoto M, Matsui K, Hada T, Okamura H, Nakanishi K: IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1 beta for IFN-gamma production from human T cells. *Int Immunol* 12 (2000) 151-160

110. Tsao BP, Grossman JM, Riemekasten G, Strong N, Kalsi J, Wallace DJ, Chen CJ, Lau CS, Ginzler EM, Goldstein R, Kalunian KC, Harley JB, Arnett FC, Hahn BH, Cantor RM: Familiality and co-occurrence of clinical feature of systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheum* 46 (2002) 2678-2685
111. Tsao BP, Cantor RM, Grossman JM, Shen N, Teophilov NT, Wallace DJ Arnett FC, Hartung K, Goldstein R, Kalunian KC, Hahn BH, Rotter JL: PARP alleles within the linked chromosomal region are associated with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 103 (1999) 1135-1140
112. van Kerckhove C, Luyrink L, Taylor J, Melin-Aldana H, Balakrishnan K, Maksymowych W, Elma M, Lovell D, Choi E, Glass DN: HLA-DQA1\*0101 haplotypes and disease outcome in early onset pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 18 (1991) 874-879
113. Williams J, Ceccarelli A, Spurr N: Genetic Engineering. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, 1993, S.2
114. Wong CK, Li EK, Ho CY, Lam CW: Elevation of plasma interleukin-18 concentration is correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 39 (2000) 1078-1081
115. Xu D, Chan WL, Leung BP, Hunter D, Schulz K, Carter RW, McInnes IB, Robinson JH, Liew FY: Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J Exp Med* 188 (1998) 1485-1492
116. Xu Q, Tin SK, Paramalingam SS, Thumboo J, Koh DR, Fong KY: Interleukin-18 promotor gene polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus: association with CC genotype at position -607. *Ann Acad Med Singapore* 36 (2007) 91-95

117. Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, Akira S, Nakanishi K: IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* 161 (1998) 3400-3407

## 6 Thesen

1. Die juvenile idiopathische Arthritis (JIA) ist die häufigste chronische Autoimmunerkrankung im Kindesalter.
2. Beide Autoimmunerkrankungen, JIA und Systemischer Lupus erythematoses (SLE), sind unbekannter Ätiologie. Sie sind multifaktoriell bedingt. Der Vererbungsmechanismus ist polygen.
3. Mädchen erkranken bis zu neunmal häufiger an einem SLE. Ein frühes Erstmanifestationsalter gilt als Risikofaktor für einen schweren Krankheitsverlauf des SLE.
4. IL-18 kann eine Th1- oder Th2-Immunantwort auslösen und somit das Gleichgewicht der Zytokine beeinflussen.
5. Zwischen den SNP -607 und -656 besteht ein Kopplungsgleichgewicht. So wird das -607C (A)-Allel zusammen mit dem -656G (T)-Allel vererbt.
6. Die Allelkombination -137CG-607AA-656TT tritt häufiger bei Kindern mit einer JIA im Vergleich zur Kontrollpopulation auf. Patienten mit dieser Allelkombination zeigen seltener radiologische Veränderungen als Patienten mit anderen Allelkombinationen.
7. Bei Kindern, die in vollständige Remission traten, konnte die Allelkombination -137CC-607CC-656GG häufiger als bei Kindern, die nicht in Remission oder nur in Remission unter weiterführender Medikamenteneinnahme traten, nachgewiesen werden.
8. Das -137C-Allel findet sich seltener bei Patienten mit einer RF positiven Polyarthritits als bei den Kontrollpersonen. oder bei Patienten mit oligoartikulärer JIA.
9. Der SNP -607A-656T trifft bei der RF positiven Polyarthritits seltener und bei der erweiterten Oligoarthritits häufiger im Vergleich zur Kontrollpopulation auf. Patienten mit diesem Allel erlangen häufiger die vollständige Remission.

10. Es besteht kein statistischer Zusammenhang zwischen der Krankheitsentstehung des SLE und den SNP -137 und -607-656.
11. Innerhalb der japanischen Bevölkerung konnte die Allelkombination -137G-607A-656T mit der JIA und der Adult onset Still's disease (AOSD), die Allelkombination -137G-607C-656G mit dem Diabetes mellitus Typ1 sowie der Sarkoidose und die Allelkombination -137C-607A-656T mit allergischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden.
12. Eine erhöhte IL-18-Serumkonzentration korreliert positiv mit der Krankheitsschwere der Systemischen Arthritis und des SLE.

## Lebenslauf

Name: Christina Krug

Wohnhaft: Stralsunder Str. 11  
56075 Koblenz  
Tel: 0174/9450677

Geburtsdatum: 20.09.1981

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1988-1990 Friedrich Wolf Oberschule in Leipzig  
1990-2000 11. Schule, Gymnasium in Leipzig

Schulabschluss: 2000 Abitur

Berufstätigkeit: 09/2000 – 12/2000 Lehre zur Hebamme  
01/2001 Bundeswehr, Laufbahn Sanitätsoffizier  
10/2001 Studium der Humanmedizin  
12/2007 Assistenzärztin im  
Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz,  
Abteilung Unfallchirurgie/ Orthopädie

Famulaturen: Bundeswehrkrankenhaus Leipzig, Abteilung für  
Innere Medizin  
Universitätsklinik Halle, Abteilung für Pädiatrie  
Universitätsklinik Halle, Abteilung für  
Gynäkologie und Geburtshilfe  
Universitätsklinik Halle, Abteilung für  
Unfallchirurgie  
Sportmedizinisches Institut der Bundeswehr

Besondere Kenntnisse: Sprachkenntnisse Englisch und Französisch

## Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt und bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Koblenz, 27.01.2008

## Publikation

Schmeling H, **Krug C**, Heins S, Keysser G, Horneff G: Interleukin-18 promotor polymorphisms in children with autoimmune disease. American College of Rheumatology, Annual scientific meeting, Boston 06.11-11.11.2007

## Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Gerd Horneff für die Überlassung des interessanten Themas und die Einweisung in die Aufgabe, Frau Dr. med. Heinrike Schmeling für ihre Unterstützung bei der Abfassung dieser Arbeit. Trotz der vielen Kilometer Entfernung hätte die Zusammenarbeit nicht besser sein können.

Für die gute Betreuung im Labor, die hilfreichen Diskussionen, sowie die schönen und erfolgreichen Momente bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Sigrid Heins, Gudrun Göttert und Bianca Ulitzsch.

Bei meinen Eltern und Großeltern bedanke ich mich für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Kraft, die sie mir in schwierigen Situationen gegeben haben.

Danke auch an meine Freunde Susanna, Cindy, Ulrike und Lars, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mit ihrem scharfen Blick für Rechtschreibung und Grammatik meiner Arbeit den letzten Schliff verpassten.