elektronisches dokument
ULB Sachsen-Anhalt

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. Fleig)

und dem

Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. I. Hansmann)

Der Einfluß von MMP-1 und MMP-3 Polymorphismen auf die Röntgenprogression der Rheumatoiden Arthritis

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Nadine Lechtenböhmer

geboren am 14.01.1977 in Neuss

Betreuer: Priv. Doz. Dr. med. Keyßer

Gutachter: Priv. Doz. Dr. Keyßer
Prof. Dr. Buttgereit (Berlin)
Prof. Dr. Lorenz (Heidelberg)

verteidigt am 12.06.2006

urn:nbn:de:gbv:3-000010701
[http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010701]

Meinen Eltern

Referat und bibliographische Beschreibung

Die Rheumatoide Arthritis ist eine entzündliche Gelenkerkrankung und betrifft etwa 1% der Weltbevölkerung. Ätiologie und Pathogenese sind bis heute ungeklärt. Es spielen sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren eine wichtige Rolle. Der Krankheitsverlauf variiert zwischen den einzelnen Patienten stark. Prognostische Parameter für den Krankheitsverlauf basieren auf einer Kombination klinischer und laborchemischer Faktoren und sind nur bedingt aussagefähig.

Zu den genetischen Faktoren, die die Progression der RA beeinflussen, gehört das HLA-System und die genetischen Polymorphismen von Interferon-γ, Il-1ß und TNF-α.

Matrixmetalloproteinasen als wichtigste proteolytische Enzyme für den enzymatischen Abbau von Proteoglykanen, Kollagenen und weiterer extrazellulärer Matrix ermöglichen die Progression des Knorpel- und Knochenabbaus der RA.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Progression der RA und den Polymorphismen der Matrixmetalloproteinasen zu analysieren. Mittels *PCR* und *SSCP* wurden der ***MMP-3 5A/6A***, ***MMP-1 1G/2G***, ***MMP-1 A/T*** und der ***MMP-1 C/T*** Polymorphismus bei 308 Patienten und 110 Kontrollen analysiert. Es konnte erstmals ein Linkage Disequilibrium zwischen dem ***MMP-1 1G/2G*** und ***MMP-3 5A/6A***-Polymorphismus nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine Assoziation des ***1G-5A*** Haplotypen mit der Progression der RA in Abhängigkeit der Erkrankungsdauer. Der ***1G-5A*** Haplotyp ist mit einem protektiven Effekt bezüglich der Progression der RA in den ersten 15 Jahren assoziiert. Diese hochsignifikante Assoziation ist von ihrer Bedeutung mit der Assoziation des SE mit der Progression der RA gleichzusetzen.

Die Analyse des ***MMP 1G/2G***-Promotorpolymorphismus zeigte eine signifikante Assoziaton des ***2G***-Allels mit der Progression der RA in der ersten 15 Erkrankungsjahren. Das 1G-Allel ist mit der Progression nach 15 Jahren assoziiert.

Der ***MMP-3 5A/6A-,*** der ***MMP-1 C/T*** und der ***MMP-1 A/T***-Polymorphismus zeigten keine Assoziation mit der Erkrankungsschwere der RA.

Lechtenböhmer, Nadine: Der Einfluß von ***MMP-1*** und ***MMP-3*** Polymorphismen auf die Röntgenprogression der Rheumatoiden Arthritis. Halle,
Martin-Luther-Univ., Med.Fak., Diss., Seiten, 2005

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Klinik der Rheumatoiden Arthritis **1**
1.2 Epidemiologie der RA **1**
1.3 Ätiologie und Pathogenese **2**
1.4 Diagnostik **4**
1.5 Therapie **5**
1.6 Prognostische Parameter für den Krankheitsverlauf der RA **5**
1.7 Matrix- Metalloproteinasen **6**
1.7.1 Die Bedeutung der Matrix- Metalloproteinasen für die Gelenkerosion **7**
1.7.2 Genetische Polymorphismen der Matrix- Metalloproteinasen **8**
1.8 Ziel der Arbeit **11**

2 Material und Methoden 12

2.1 Material **12**
2.1.1 Chemikalien **12**
2.1.2 Gebrauchswaren **13**
2.2 Patienten und Kontrollpersonen **14**
2.3 Gewinnung genomischer-DNA aus peripherem Blut **16**
2.3.1 Elektrophoretische Auftrennung von DNA- Fragmenten **18**
2.4 Polymerase - Kettenreaktion (PCR) (nach Saiki et al. 1988) **18**
2.4.1 Analyse des MMP1-A/T Polymorphismus **19**
2.4.2 Analyse des MMP 1 C/T-Polymorphismus **21**
2.5 SSCP (single-strand conformational polymorphism analysis) **22**
2.5.1 Etablierung der Bedingungen für die SSCP-Analyse **25**
2.5.2. Analyse des MMP-3 5A/6A Polymorphismus **25**
2.5.3 Analyse des MMP-1 1G/2G-Polymorphismus **27**
2.6 DNA-Sequenzierung **27**
2.7 Qualitätssicherung **29**
2.8 Statistik **30**

3 Ergebnisse 31

3.1 Ergebnisse der SSCP-Analyse in der 5´upstream Region von MMP-3 **31**
3.1.1 MMP-3 5A/6A Genotypverteilung in Abhängigkeit vom Geschlecht **31**
3.1.2 MMP-3 5A/6A-Polymorphismus und das „shared epitope“ **32**
3.1.4 Untersuchung der Assoziation des MMP-3 5A/6A-Polymorphismus mit klinischen Parametern **32**
3.1.5 MMP-3 5A/6A-Polymorphismus in Abhängigkeit vom Ratingenscore **33**
3.2 Röntgenprogression **33**
3.3 Ergebnisse der SSCP-Analyse des MMP-1 1G/2G Polymorphismus **34**
3.3.1 MMP-1 1G/2G Genotypverteilung in Abhängigkeit vom Geschlecht **35**

3.3.2	MMP-1 Polymorphismus und das „shared epitope“	**36**
3.3.3	Assoziation des MMP-1 Genotyps mit der Röntgenprogression	**37**
3.4	Haplotypenvergleich des MMP-1 und MMP-3 Polymorphismus	**38**
3.4.1	Regressionsanalyse des 1G-5A Haplotyps	**39**
3.4.2	Zeitabhängiger Verlauf des Ratingenscores in Abhängigkeit der Genotypen	**41**
3.5	Ergebnisse der Analyse des MMP-1 C/T- Polymorphismus	**41**
3.5.1	C/T Polymorphismus in Abhängigkeit vom Geschlecht	**42**
3.5.2	MMP-1 C/T-Polymorphismus und das SE in Abhängigkeit der Genotypen	**42**
3.6	Ergebnisse der Analyse des MMP-1 A/T-Polymorphismus	**43**
3.6.1	MMP-1 A/T-Polymorphismus in Abhängigkeit vom Geschlecht	**44**
3.6.2	MMP-1 A/T-Polymorphismus in Abhängigkeit vom SE	**44**
3.7	Vergleich des MMP-1 C/T und MMP-1 A/T- Polymorphismus	**44**
3.7.1	MMP-1 A-T-Haplotyp in Abhängigkeit der Erkrankungsdauer	**45**
3.7.2	Vergleich des MMP-1 A/T-Polymorphismus mit dem MMP-3 5A/6A-Polymorphismus	**46**
3.7.3	Vergleich der Ergebnisse des MMP-1 A/T-Polymorphismus mit dem MMP-1 1G/2G-Polymorphismus	**46**
3.8	Vergleich der Ergebnisse des MMP-3 5A/6A-Polymorphismus mit dem MMP-1 C/T Polymorphismus	**47**
3.8.1	Vergleich der Genotypen des MMP-3 5A/6A-Polymorphismus mit dem MMP-1 C/T-Polymorphismus in Abhängigkeit der Erkrankungsschwere	**48**
3.8.2	Genotypenvergleich des MMP-1 C/T Polymorphismus mit dem MMP-1 1G/2G-Polymorphismus	**48**
3.9	Regressionsanalyse der klinischen und laborchemischen Daten	**49**
3.10	Regressionsanalyse des SE	**50**
4.	**Diskussion**	**51**
4.1	Der Einfluss des MMP-3 5A/6A-Polymorphismus auf die RA	**52**
4.2	Der Einfluss des MMP-1 1G/2G-Polymorphismus auf die RA	**52**
4.3	Linkage Disequilibrium zwischen MMP-1 1G/2G- und MMP-3 5A/6A-Polymorphismus	**53**
4.3.1	Bedeutung des 1G(MMP-1)-5A(MMP-3) Haplotyps für die Gelenkerosionen der RA	**55**
4.3.2	Die Bedeutung des MMP-1 1G/2G und des MMP-3 5A/6A Haplotyps für die RA	**56**
4.4	Der Einfluß des MMP-1 A/T-Polymorphismus auf die RA	**56**
4.5	Einfluss des MMP-1 C/T- Polymorphismus auf die RA	**57**
4.6	Die Bedeutung des MMP-1 A/T und C/T Haplotyps für die RA	**57**
4.7	Die Bedeutung des MMP-1 A/T und 1G/2G Haplotyps für die RA	**58**
4.8	Andere genetische Polymorphismen in Assoziation mit der Inzidenz und Schwere der RA	**58**
5	**Zusammenfassung**	**59**
6	**Literaturverzeichnis**	**61**
7	**Thesen**	**70**

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
AP-1	Tanskritptionsfaktor
APS	Ammoniumperoxidsulfat
bp	Basenpaare
BSG	Blutkörperchen Senkungsgeschwindigkeit
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
CRP	C-reaktives Protein
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytosintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleidtriphosphat
ddTTP	Didesoxythymintriphosphat
dTTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Etyhlendiaminotetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
et al.	et alteres
Ets	Transkriptionsfaktor
H_2O	Wasser
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
Il-1	Interleukin 1
MCP	Metacarpophalangealgelenk
MHC	Major histocompatibility complex
MLU	Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
MMP	Matrixmetalloproteinase
MTP	Metatarsophalangealgelenk
MTX	Methotrexat
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Kochsalz
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika

PCR	Polymersekettenreaktion
PDGF	platlet derived growth factor
PIP	proximales Interphalangealgelenk
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Shared epitope
SSCP	single stranded conformation polymorphism
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEMED	N, N,N´,N´-Tetramethylethylendiamid
TGF-ß	Transforming growth factor
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinase
TNF α	Tumornekrosefaktor α
UV	Ultra-Violett
V	Verdünnungsfaktor

1 Einleitung

1.1 Klinik der Rheumatoiden Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine schubweise systemisch auftretende chronisch entzündliche Erkrankung mit bislang ungeklärter Ursache. Ihr Verlauf manifestiert sich in einer Entzündungsreaktion, die die Synovialmembran der peripheren Gelenke, Sehnenscheiden und Bursae befällt. Aber auch extraartikuläre Organmanifestationen wie Perikarditis, Pleuritis, Keratokonjunktivits sicca und Vaskulitiden kommen vor (Miehle et al., 1999). Der progrediente Krankheitsverlauf kann zu Gelenkdestruktion und Invalidität führen.
Häufig beginnt die RA mit uncharakteristischen Prodromalsymptomen wie Abgeschlagenheit, körperlicher und geistiger Ermüdbarkeit, Sehnenscheidenentzündungen oder neu aufgetretener Hyperhidrosis palmaris. Häufig sind auch flüchtige Arthralgien, Parästhesien, Akrozyanose und ein Querdruckschmerz der MCP-Gelenke (positives Gaenslen-Zeichen) vorhanden. Im Stadium der frühen RA, die in 60% langsam und schleichend beginnt, kommt es zu einem überwiegend symmetrischen Befall von Hand-, MCP- und PIP-Gelenken, sowie von Fuß- und MTP-Gelenken. Im weiteren Verlauf werden auch die mittleren und großen Gelenke involviert. Klinisch lassen sich sowohl schwere erosive Verläufe mit starker Knorpel- und Knochendestruktion als auch milde Verläufe mit leichten Destruktionen beobachten (Miehle et al., 1999).
Die schwere erosive Verlaufsform mit Knorpel und Knochendestruktionen führt zu den klassischen Deformierungen der RA mit Ulnardeviation, Knopfloch- und Schwanenhalsdeformität, Mutilationen, Gelenkspaltverschmälerungen sowie der 90°/90° Deformität des Daumens (siehe Abb.1). Eine gefürchtete Komplikation ist die atlantoaxiale Dislokation, die zur Kompression des Rückenmarks führen kann. Durch die chronisch entzündliche Gelenkschwellung kommt es zu radiologischen Veränderungen, mit gelenknaher Osteoporose, einem Verlust der Grenzlamelle, Erosionen und Usuren (Miehle et al., 1999; Harris et al., 1989).

1.2 Epidemiologie der RA

Die Prävalenz der RA liegt bei 1% der Bevölkerung weltweit und ist damit als eine häufige Erkrankung anzusehen. Das durchschnittliche Manifestationsalter liegt zwischen der 4. und 5. Lebensdekade, wobei Frauen deutlich häufiger betroffen sind als Männer (Lawrence et al., 1961; Harris et al., 1989)

Bereits an 3000-5000 Jahre alten prähistorischen Knochenfunden der Ureinwohner Amerikas konnten erosive Polyarthritiden nachgewiesen werden, nicht so bei asiatischen oder europäischen Knochenfunden aus dieser Zeit. Diese Indianer könnten, so eine Hypothese bei einer überträgergebundenen Ausbreitung (z.B. Mikoorganismen), die Erkrankung an die einwandernden Europäer weitergegeben haben (Woods et al., 1988; Rothschild et al., 1988). Erst 1802 wies William Heberden in Europa auf eine Erkrankung hin, die dem Bild der RA entspricht. Der Begriff der RA wird von Sir Alfred B. Garrod 1876 eingeführt und in einer Monographie mit dem Titel „Treatise on Gout“ veröffentlicht (Garrod, 1876).

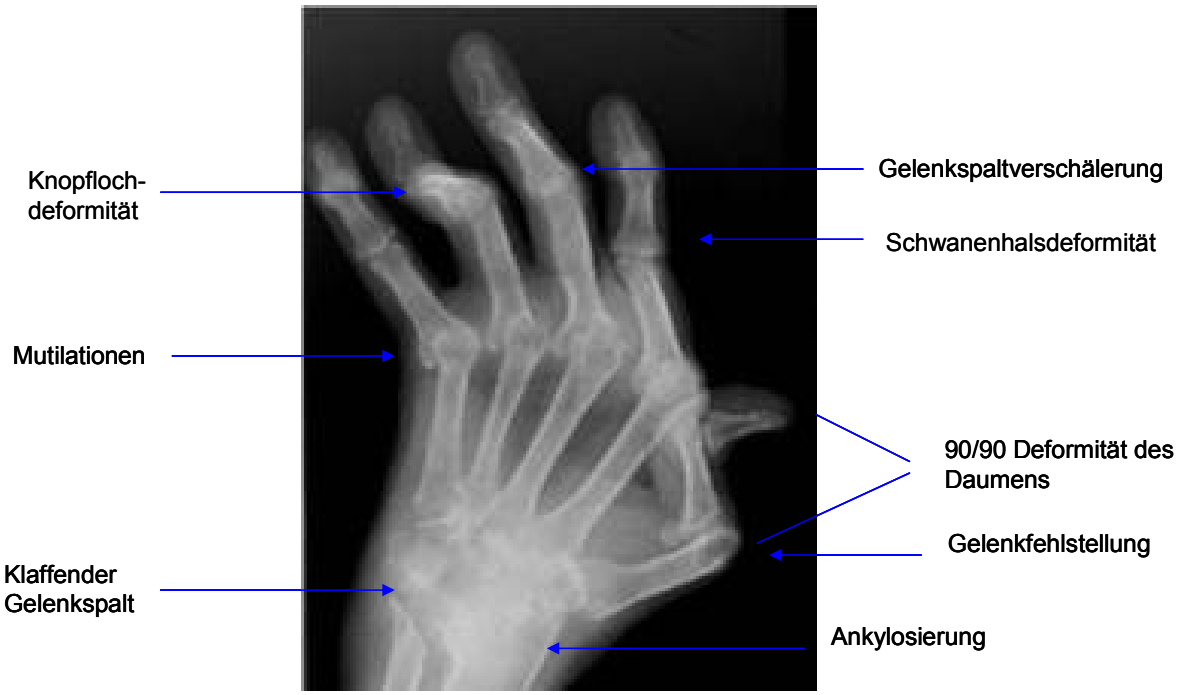


Abbildung 1: Röntgenaufnahme mit typischen Handdeformitäten bei der RA

1.3 Ätiologie und Pathogenese

Ätiologie und Pathogenese der RA sind bis heute ungeklärt. Sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren spielen bei der komplexen Ätiologie der RA eine wichtige Rolle. (Albani et al., 1992).

Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, dass genetische Faktoren einen wichtigen Einfluss auf die individuelle Susceptibilität der RA ausüben (Gregersen, 2000). Anhand von Zwillingsstudien konnte der Einfluss genetischer Faktoren aufgezeigt werden. So ist das Risiko für eineiige Zwillinge, eine RA zu entwickeln signifikant höher als das zweieiiger (MacGregor et al., 2000). Die Konkordanzrate der RA liegt bei 15-30% für eineiige gegenüber 4% bei zweieiigen Zwillingen (Aho et al. 1986; Wolfe et al. 1988). Die niedrige Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen lässt vermuten, dass die für die Entstehung der RA

verantwortlichen Gene auch bei vielen gesunden Individuen vorhanden sind, die niemals eine RA entwickeln.

Zu den wichtigen genetischen Faktoren, die prädisponierend für das Vorkommen der RA sind, zählt das weibliche Geschlecht. Das Risiko für Frauen, an RA zu erkranken, steigt bis über das 45.Lebensjahr ständig an und erreicht dann seinen Höhepunkt (Masi, 1994). Zu diesem Zeitpunkt liegt die Erkrankungsrate für Frauen etwa 6-mal höher als die der Männer. Ab dem 60. Lebensjahr jedoch ist die Inzidenz der RA für beide Geschlechter gleich, was für einen hormonellen Einfluss der Erkrankung spricht (Masi, 1994).

Einen weiteren wichtigen Faktor für die genetische Prädisposition der RA stellt das *shared epitope* (SE) auf dem HLA-Typ der MHC-Klasse II Proteine dar. Es handelt sich um einen aus 5 Aminosäuren bestehenden Abschnitt auf der dritten hypervariablen Region der ß-Kette des MHC-Moleküls (Korman et al., 1985). Das SE bei HLA-DR4 und –DR1 wurde häufiger bei Patienten mit schwerem destruierendem Verlauf und extraartikulärer Krankheitsmanifestation gefunden. Die Arbeitsgruppe um Weyand et al. konnte zeigen, dass die Schwere des Krankheitsverlaufs der RA mit der Art und Zahl der RA-assoziierten Allele korreliert (Weyand et al., 1995; Weyand et al., 1994). Möglicherweise ist das SE, welches an der Antigenpräsentation und damit Aktivierung von T-Zellen beteiligt ist, durch die Bindung eines noch unbekannten arthritogenem Peptids für die Initialphase der RA verantwortlich. Trotz dieser strengen Assoziation der RA mit dem HLA-Molekül gilt es als sicher, dass verschiedene andere Gene ebenfalls mit der Susceptibilität der RA assoziiert sind (Cornelis et al., 1998).

Die krankheitsassoziierten HLA-Gene modifizieren die Progression und Schwere und ein erhöhtes Erkrankungsrisiko der RA. (Firestein et al., 1996). Auch ethnische Faktoren spielen eine Rolle, da in bestimmten Bevölkerungsgruppen wie z.B. in Zentralafrika die RA kaum vorkommt.

Die Hypothese einer infektiösen Genese als Auslöser der RA in einem genetisch empfänglichen Patienten wird seit vielen Jahren diskutiert. Prinzipiell ist eine chronische Arthritis, ausgelöst durch eine infektiöse Erkrankung wie der Lyme-Borreliose möglich (Krause et al., 1996). Ein solcher Mechanismus müsste auf Grund der weltweiten Verbreitung der RA ebenfalls ubiquitär vorkommen. Eine Vielzahl möglicher Krankheitsverursacher wie Mykobakterien, Epstein-Barr-Virus (EBV), Parvovirus B 19, Zytomegalievirus (CMV), Chlamydien, „Heat -shock-Proteine“, Staphylokokken und Streptokokken als Auslöser wurden vermutet, ein endgültiger Beweis ist jedoch noch nicht erbracht (Albani et al., 1992).

Wegen des Auftretens autoreaktiver T- und B-Zellen zählt die RA zu den Autoimmunerkrankungen. Ein weiteres Argument für die Autoimmunhypothese der RA ist der Nachweis hochtitriger Rheumafaktoren (RF) und eines Autoantikörpers gegen das Fc-

Fragment des IgG. Der RF ist prädisponierend für einen erosiven Verlauf der RA, sagt aber nichts über das Auftreten der RA aus, da ca. 5% der Gesunden ebenfalls einen RF aufweisen (Miehle et al., 1999; Harris et al., 1989; Albani et al., 1992; Fehr et al. 1989).
Bei genetisch disponierten Menschen führt möglicherweise eine abnorme Antigenpräsentation durch dendritische Zellen, Makrophagen oder synoviale Fibroblasten zu einer Aktivierung autoreaktiver T-Helferzellen, die ihrerseits Makrophagen aktivieren. Dies führt zu einer Sekretion von Zytokinen (Il-1,-6, TNF-α) und Wachstumsfaktoren. Die Zytokine aktivieren die Fibroblasten, die in großen Mengen proteolytische Enzyme freisetzen, wie z.B. MMP die zum Abbau des Knochen- und Knorpelgewebes führen (Fassbender et al., 1988; Firestein et al., 1996). Die so ausgelöste Entzündungsreaktion führt über eine Pannusbildung zur Gelenkdestruktion. Es kommt es zu einer vermehrten Vaskularisierung der Synovia und zu einer Aktivierung der Osteoklasten, die ebenfalls zur Knochendestruktion beitragen. Die Pannusbildung wird durch Proliferation von makrophagenähnlicher Typ-A-Synoviozyten und durch die Proliferation fibroblastenähnlicher Typ-B-Synoviozyten verursacht. Normalerweise besteht die Synovialmembran aus 1-2 Zellschichten, durch die entzündliche Reaktion im Rahmen der RA kommt es jedoch zu einer massiven Hyperplasie. Der Pannus überwuchert und invadiert Knorpel und Knochen durch sein tumorartiges Wachstum und zerstört ihn unaufhaltsam (Gay et al., 1993; Bläß et al., 1999; Fassbender et al., 1988; Burmester et al., 1983).

1.4 Diagnostik

Die Diagnose der RA wird in erster Linie durch die Anamnese und die körperliche Untersuchung erhoben. Hilfreich für die Klassifikation in klinischen Studien, wenn auch nur zu etwa 90% sensitiv, sind die Revised Criteria for the Classification of Rheumatoid Arthritis 1987 (Arnett et al., 1988):

1. Morgensteifigkeit von mindestens einer Stunde Dauer
2. Weichteilschwellung oder Erguß an mindestens drei oder mehr Gelenken
3. Arthritis der proximalen Interphalangealgelenke (PIP), Metacarpophalangeal -gelenke (MCP) oder Handgelenke
4. Symmetrische Arthritis mit simultaner Beteiligung der gleichen Gelenkregionen auf beiden Körperseiten
5. Rheumaknoten: Subkutane Knoten über Knochenvorsprüngen, and den Streckseiten oder im juxtaartikulären Bereich
6. Rheumafaktor im Serum nachweisbar
7. Radiologische Veränderungen mit gelenknaher Osteoporose und/oder Erosionen an den betroffenen Gelenken

Für die Diagnose müssen mindestens vier der sieben Kriterien erfüllt sein und diese müssen für mindestens sechs Wochen bestanden haben.

1.5 Therapie

Die RA-Therapie ist eine kombinierte, auf Medikamenten und nichtmedikamentösen Maßnahmen basierende, dem individuellen Krankheitsverlauf entsprechende Behandlung. Zur Therapie stehen die nicht steroidalen Antirheumatika (NSAR) zur Verfügung. Sie wirken antiinflamatorisch, antiphlogistisch und schmerzlindernd. Allerdings haben sie keinen Einfluß auf das Voranschreiten der Gelenkzerstörung im Gegensatz zu den Basistherapeutika. Letztere spielen in der RA-Therapie die Hauptrolle, da sie als krankheitsmodifizierende Medikamente eine Voll- oder Teilremission erzielen können. Zu den wichtigsten Basistherapeutika gehören MTX, Leflunomid, Sulfasalazin, TNF-α-Inhibitoren und Aurothioglukose. Der Wirkungseintritt erfolgt meist verzögert nach ca. 3 Monaten (Migita et al. 2004; Miehle et al., 1999).
Glukokortikoide nehmen in der antirheumatischen Therapie eine Zwischenstellung ein: einerseits zeigen sie, wie die NSAR, eine rasch einsetzende schmerzlindernde und entzündungshemmende Wirkung, andererseits verzögern sie in Kombination mit anderen Basistherapeutika die Gelenkdestruktion.

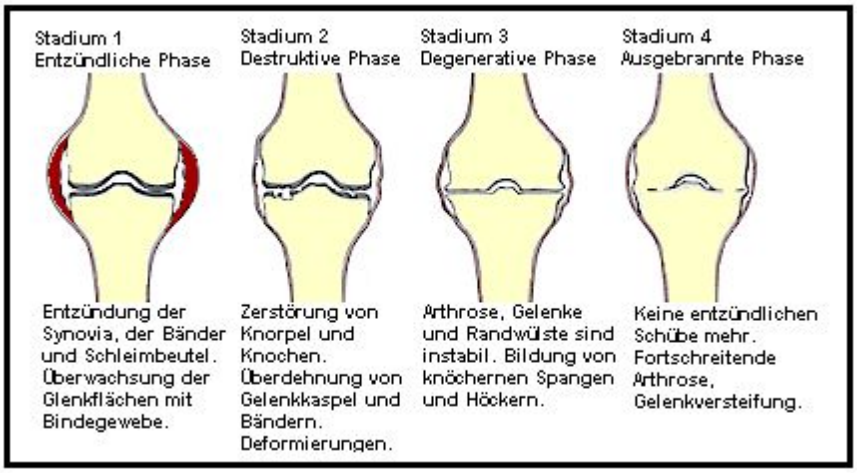


Abbildung 2: Stadien der Gelenkentzündung, modifiziert nach Miehle et al.1999

1.6 Prognostische Parameter für den Krankheitsverlauf der RA

Die RA ist eine entzündliche Gelenkerkrankung, die zwischen einzelnen Patienten stark variiert. So kann es bei einem erosiven Verlauf der Krankheit in kürzester Zeit zu einer ausgeprägten Gelenkzerstörung kommen, welche nach einigen Jahren bis zur Invalidität führen kann. Die RA kann jedoch auch in einer milden Form verlaufen, in der die Entzündungsreaktion erst spät oder gar nicht zu Knochenerosionen führt. Trotzdem

entwickeln ca. 70% der Patienten nach dreijähriger Krankheitsdauer Knochenerosionen (van der Heijde et al., 1992). Bisher lässt sich nur bedingt vorhersagen, welche Patienten eine erosive RA entwickeln und welche nicht. Indikatoren für einen schweren Verlauf der RA sind, basierend auf einer Kombination von demographischen, klinischen und laborchemischen Faktoren, ein erhöhtes CRP und BSG, das Vorhandensein von IgM und IgA-Rheumafaktoren, Rheumaknoten und eine erhöhte ***MMP-3*** Serumkonzentration (Combe et al., 2001; Ribbens et al., 2000). Diese Faktoren sind jedoch nur bedingt und in Kombination aussagefähig (Combe et al., 2001). In tierexperimentellen Studien mit induzierter Arthritis konnte gezeigt werden, dass sowohl das Auftreten, die Krankheitsschwere, als auch der Krankheitsverlauf (akut oder chronisch) der Arthritis durch Gene, die nicht mit dem MHC-Locus identisch sind, beeinflusst werden (Vingsbo-Lundberg et al., 1998).
Die Gründe für den unterschiedlichen Krankheitsverlauf beim Menschen sind noch nicht geklärt, aber genetische Risikofaktoren scheinen einen wichtigen Einfluss zu haben.
Zu den genetischen Faktoren, die im Zusammenhang mit der Schwere der RA stehen, zählen das shared epitope auf der ß-Kette des HLA Klasse II Moleküls und genetische Polymorphismen von Interferon-γ (Khani-Hanjani et al., 2000), Interleukin 1ß (Cantagrel et al., 1999) und TNF-α. (Brinkmann et al., 1997; Brennan et al., 1997).

1.7 *Matrix- Metalloproteinasen*

Matrix- Metalloproteinasen (MMP) sind zinkabhängige Enzyme, die extrazellulär wirksam sind und Bestandteile des interstitiellen Bindegewebes und der Bindegewebsmatrix abbauen können. Unter physiologischen, aber auch pathologischen Bedingung spielen diese Enzyme eine wesentliche Rolle bei Vorgängen wie Proliferation, Wundheilung, Gewebeumbau, Involution hormonabhängiger Organe, Tumorinvasion, Metastasierung und der Bindegewebszerstörung bei RA (Nagase et al., 1999).
Der strukturelle Aufbau der ***MMP*** basiert auf verschiedenen Regionen: einer Propeptiddomäne, einer katalytischen Domäne, einer Hämopexin-ähnlichen Domäne (außer ***MMP-7***) sowie einer flexiblen Gelenkregion (hinge) (siehe Abb.3) (Massova et al., 1998). Alle ***MMP*** werden als inaktive Präproenzyme synthetisiert und als Proenzyme sezerniert. Zur Aktivierung der ***MMP*** wird die aus 80-90 AS bestehende Propeptiddomäne abgespalten. Die katalytische Domäne als das aktive Zentrum weist mit einem aus 5 AS bestehendem Motiv eine wichtige Bindungsstelle für Zinkionen auf, die für die Enzymaktivität wichtig ist. Die Hämopexin-ähnliche Domäne, mit über 210 AS, spielt für die Substratbindung eine wichtige Rolle. Bei den Kollagenasen (z.B. ***MMP-1***) umfasst ihre Aufgabe auch die Spaltung der Tripelhelix des interstitiellen Kollagens. (Nagase et al. 1999; Massova et al., 1998) Die ***MMP*** werden als Proenzyme synthetisiert und durch proteolytische Abspaltung der N-terminalen Sequenz aktiviert. Einmal aktivierte ***MMP*** werden vom Organismus auf Grund ihrer starken

enzymatischen Wirksamkeit schnell wieder inaktiviert. Diese Inaktivierung wird von speziellen Gewebeinhibitoren (TIMP, *tissue inhibitors of metalloproteinase*) und vom Serumprotein α_2-Makroglobulin durchgeführt. TIMP werden von den meisten mesenchymalen Zellen produziert, und unterscheiden sich bezüglich ihrer Assoziation zu bestimmten ***MMP*** und ihrer Gewebeverteilung (Nagase et al., 1999). Im Gegensatz dazu ist α_2-Makroglobulin ein unspezifischer Inhibitor der ***MMP*** (Wagener et al., 1999).

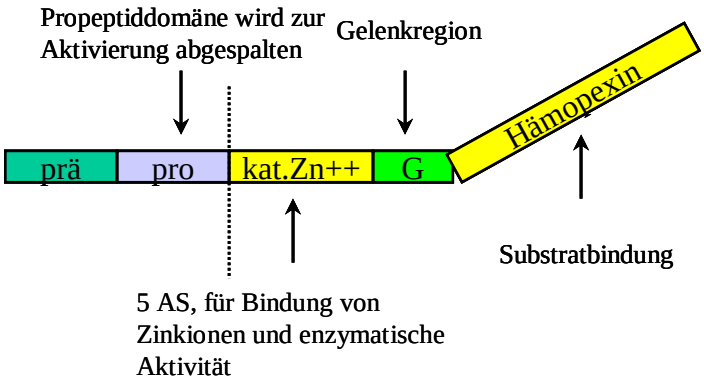


Abbildung 3: Domänenstruktur von MMP-1 und 3 (nach Powell et al., 1996)
prä: Präpetiddomäne, pro: Propeptidomäne; kat. Zn: katalytische Domäne;**
G:Gelenkregion; Hämopexin: Hämopexin-Domäne

1.7.1 Die Bedeutung der *Matrix- Metalloproteinasen* für die Gelenkerosion

Knorpelgewebe besteht aus zwei Hauptkomponenten, den Proteoglykanen und den Kollagenen. Das Kollagen sichert die Zug- und Zerreißfestigkeit des Knorpels und die Fähigkeit, Scherkräften zu widerstehen. Die Proteoglykane gewährleisten die Festigkeit und die Belastbarkeit des Knorpelgewebes. Proteoglykane und Glykoproteine schützen aber auch fibrilläre Kollagene vor dem proteolytischen Abbau durch ***MMP***. Erst nach Abbau der Glykoproteine durch Plasmin sind fibrilläre Kollagene für ***MMP*** zugänglich (Montgomery et al. 1993).

Die Balance der Abbau- und Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix, das so genannte Remodelling, wird durch verschiedene Faktoren bestimmt. ***MMP*** werden von verschiedenen Zelltypen wie Fibroblasten, Makrophagen, Neutrophilen, Synovialzellen und einigen epithelialen Zellen produziert und sezerniert. Die Sekretion wird über verschiedene Stimuli gesteuert. So stimulieren Wachstumsfaktoren wie PDGF und EGF und Zytokine, hier besonders IL-1 und TNF die ***MMP***-bildenden Zellen, während Steroide und TGF-ß die ***MMP*** Ausschüttung inhibieren (Gravallese et al., 1991; Shingu et al., 1993). Die ausgeschütteten ***MMP*** werden dann durch IL-1 getriggerte Plasminausschüttung und über ***MMP-3*** induzierte Autokatalyse aktiviert und von TIMP-bildenden Zellen wieder gehemmt (Abb.4).

Im Rahmen einer RA führt die Synovialitis zur Entstehung eines erosiv wachsenden Pannusgewebes, welches Knorpel und Knochen zerstört.

Die Bedeutung der ***MMP*** für die RA wurde auch durch tierexperimentelle Studien nachgewiesen. So zeigte ein Experiment an ***MMP-3*** Knockout-Mäusen und Kontrolltieren, denen eine Arthritis induziert wurde, dass die Knockout Mäuse keine Knorpelerosionen aufwiesen, bei ansonsten gleichen entzündlichen Zellinfiltraten in der Synovialmembran. Die Kontrolltiere zeigten neben entzündlichen Zellinfiltraten zusätzlich Knorpelerosionen. Im chronischen Stadium der Entzündung zeigten die Knockout-Mäuse eine generell geringere Synovialitis als die Kontrolltiere. Dieses Experiment zeigt, dass ***MMP-3*** bei der Knorpelzerstörung und der entzündlichen Reaktion eine besondere Rolle spielt (van Meurs et al., 1999).

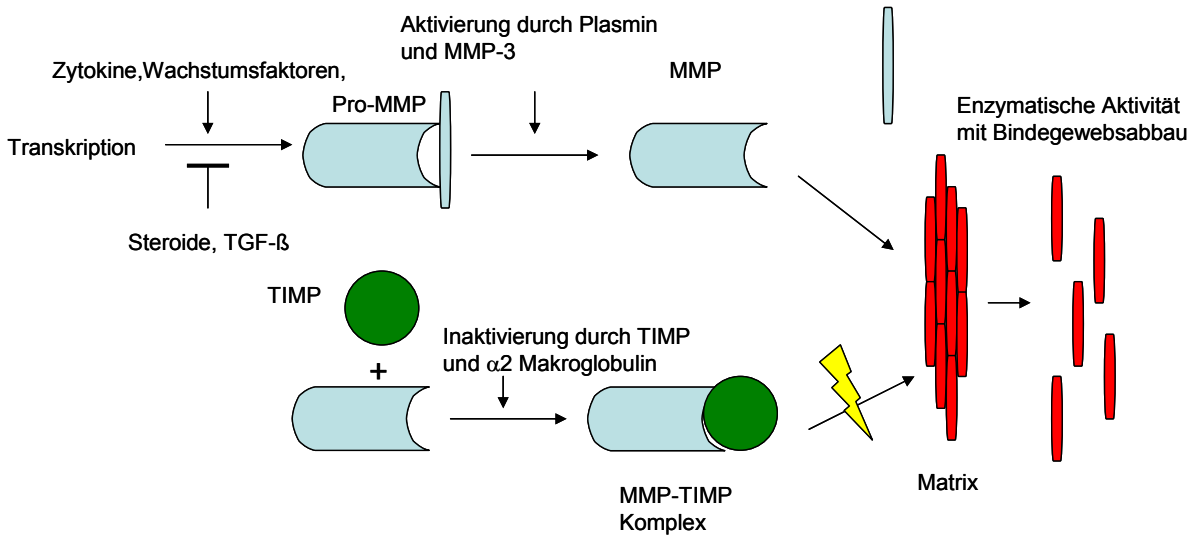


Abbildung 4: Pathophysiologie der MMP-Aktivierung (modifizert nach Literaturbefunden s.o.)

1.7.2 Genetische Polymorphismen der *Matrix- Metalloproteinasen*

Sind in einem Genlocus zwei oder mehrere Allele in einer Population vorhanden, spricht man von einem Polymorphismus. Tritt das seltenere Allel häufiger als ein Prozent auf, wird dieser Locus als polymorph bezeichnet (Stachan et al., 1996).

Im menschlichen Genom sind Mutationen, die zu Polymorphismen führen, in gleicher Wahrscheinlichkeit in kodierenden und nichtkodierenden DNA-Regionen vorhanden. Mutationen, die zu Veränderungen im Genprodukt, führen unterscheiden sich von denen, die auf die Genproduktsequenz durch ihre Lage im Tripletcode keinen Einfluß haben. In diesem Fall hat die Mutation trotz Änderung in der Basensequenz keinen Einfluß auf die Proteine. Eine Änderung des Genotyps führt nicht zwangsläufig zu einer Änderung des Phänotyps.

Anders als bei monogenen Erkrankungen, die eine einzige Genmutation aufweisen, (z.B. Thalassämie), gehört die RA zu den Krankheitsbildern, die von multifaktoriellen genetischen Einflüssen geprägt werden. Für die Untersuchung ist es nahe liegend, zunächst genetische Faktoren für die Prognose der RA zu untersuchen, deren Produkt bekanntermaßen eine physiologische Bedeutung für den Phänotyp der Erkrankung hat. Ein genetischer Polymorphismus der am Ende der entzündlichen Kaskade der RA stehenden ***MMP***, der zu einer veränderten Transkriptionsrate und damit zu veränderter Expression der jeweiligen ***MMP*** führt, könnte die Schwere der RA beeinflussen. Zahlreiche Studien wiesen eine signifikante Korrelation zwischen einer erhöhten Serumkonzentration von ***MMP-1***, vor allem aber ***MMP-3*** und Knochenerosionen in der frühen Phase der RA und dem Disease activity score (DAS) nach (Cunnane et al., 2001; Green et al., 2003; Yamanaka et al., 2000; Posthumus et al., 2000). ***MMP*** werden an den Orten der Gelenkdestruktionen vermehrt exprimiert (Tomita et al., 2002).

Besonders die Höhe der ***MMP-3*** Serumkonzentration scheint als Prognosefaktor für den Verlauf in der frühen RA zu gelten (Yamanaka et al., 2000; Ribbens et al., 2000). Aber auch im Verlauf der RA sind die Serumkonzentrationen von ***MMP-3*** bei Patienten erhöht, verglichen mit gesunden Kontrollen (Walakovits et al., 1992).

Aufgrund der Rolle die ***MMP-1*** und ***-3*** bei der Knorpelzerstörung und Synovialitis der RA spielen, sind diese Genloci Kandidatengene für die Entwicklung einer erosiven RA (Fassbender et al., 1988; Case et al., 1989; Konttinen et al., 1999). Derartige Polymorphismen sind aus der Tumorforschung für ***MMP-1*** (Kanamori et al., 1999; Thiry-Blaise et al., 1995), ***MMP-3*** (Ye et al., 1996) bekannt.

***MMP-3 5A/6A*-Polymorphismus**

Im Jahr 1996 identifizierte Ye et al. einen ***MMP-3*** Promotorpolymorphismus, 1600 bp upstream vom Start der Transkription an Position -1171, der in einem ***Allel 5*** und im anderen 6 Adenosinbasen aufwies (Abb.5). ***MMP-3***, welches eine breite Substratspezifität aufweist, kann einerseits Proteoglykane, verschiedene Kollagene, Laminin, Fibronectin und Elastin spalten, andererseits auch selber ***MMP-1, 2, 8, 9*** und ***13*** aktivieren. (Ito et al., 1989) Zudem gehört ***MMP-3*** neben ***MMP-1,2*** und ***9*** zu den ***MMP***, welche bei RA des Menschen in der Synovialmembran im Vergleich zu degenerativen Gelenkerkrankungen oder Gesunden vermehrt exprimiert werden (Murphy et al., 1992; Nagase et al., 1999; Case et al., 1989; Ishiguro et al., 1996). Die Regulation der ***MMP-3*** Expression erfolgt auf der Stufe der Transkription. Die Promotorregion reagiert auf verschiedene Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone. Die Gruppe um Ye et al. konnte 1996 nachweisen, dass Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit, sofern sie homozygot für das ***6A*** Allel waren, eine rasche Progression der Erkrankung aufwiesen. Auf Grund der geringeren proteolytischen Aktivität

des ***6A*** Allels konnten sich atherosklerotische Plaques vergrößern. Sie konnten weiterhin nachweisen, dass die geringere proteolytische Aktivität des ***6A***-Allels mit der Anlagerung eines Nukleotidfaktors 1, der bevorzugt das ***6A***-Allel bindet und als transkriptionaler Repressor wirkt, begründet ist (Ye et al., 1996).

Quinones et al. 1989 konnte anhand von 354 gesunden Individuen zeigen, dass die Verteilung der beiden Allele in der Britischen Bevölkerung mit 0,51 für das ***5A***-Allel und 0,49 für das ***6A***-Allel ausgeglichen ist. Constatin et al. wies 2002 eine Assoziation zwischen dem 6A-Allel und der Röntgenprogression der RA auf (Constatin et al., 2002 b).

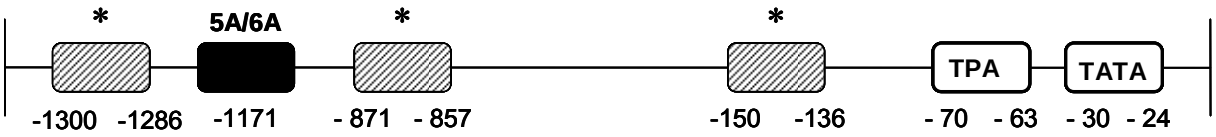


Abbildung 5: Modellhafte Darstellung der MMP-3 5A/6A-Promotorpolymorphismusregion mit umliegenden Regulationselementen. * : glucocorticoid-response element

MMP-1 1G/2G-Polymorphismus

Rutter et al. beschrieb 1998 erstmals einen Insertions/Deletionspolymorphismus in der ***MMP1*** Promotorregion (Rutter et al., 1998). Der entdeckte ***MMP-1 1G/2G*** Promotorpolymorphismus weist ein oder zwei Guaninbasen auf (***1G/2G***). Der Insertions-Typ (***2G***) zeigt eine höhere transkriptionale Aktivität als der Deletions-Typ (***1G***), weil das Guanin eine Erkennungssequenz (5´-GGA-3´) für die Bindungsstelle eines Ets-Transkriptionsfaktors bildet. Damit legt der Polymorphismus fest, ob in der MMP-1 Promotorregion eine Ets-Bindungsstelle vorliegt oder nicht und beeinflusst dadurch die transkriptionale Aktivität (Rutter et al., 1998). In der Entwicklung einer COPD konnte Joos et al. 2002 eine wichtige Rolle des ***MMP-1G/2G*** Polymorphismus nachweisen. Auch viele andere Arbeiten wiesen eine positive Assoziation des ***2G***-Allels mit der ***MMP1*** Expression in Kolon-, Lungen- und Ovarialtumoren nach, die in der Tumorausbreitung und Metastasierung eine wichtige Rolle spielen (Ghilardi et al., 2001; Kanamori et al., 1999; Powell et al., 1996; Zhu et al., 2001). Diese Ergebnisse unterstreichen die Relevanz dieses Allels für Invasive Prozesse.

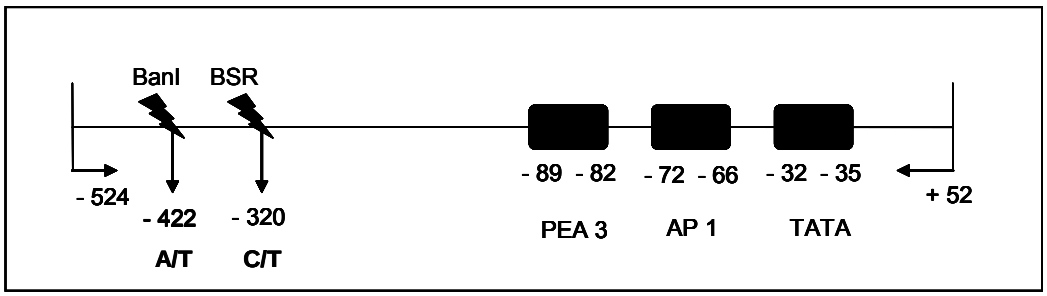
MMP-1 C/T-Polymorphismus

Ein weiterer ***MMP-1*** Promotorpolymorphismus ist der ***C/T*** Polymorphismus, der in der von Thiry-Blaise et al. 1995 beschriebenen Region der Base -320 liegt (Abb.6). Die funktionelle Bedeutung dieses Polymorphismus ist noch unbekannt.

MMP-1 A/T-Polymorphismus

Thiry-Blaise et al. beschrieb 1995 erstmals einen ***MMP-1 A/T*** Polymorphismus, der in unmittelbarer Nähe zum vorhin erwähnten ***C/T*** Polymorphismus liegt. Beide Polymorphismen

sind deshalb so interessant, weil sich in ihrer unmittelbaren Nähe 3 wichtige, die Transkription regulierende, Elemente befinden. Mutationen in unmittelbarer Umgebung dieser Regulatorregion könnten eine wichtige Lokalisation für eine individuell unterschiedliche der ***MMP-1*** Expression sein. Zwei dieser Elemente sind cis-Elemente, zum einen die AP-1, die den AP-1 Faktor bindet und dadurch die transkriptionale Aktivität des ***MMP-1*** Gens beeinflusst (Abb.7). Das zweite cis-Element PEA3, liegt ebenfalls in dieser Region. Über deren regulierende Wirkung ist jedoch nicht viel bekannt (Thiry-Blaise et al., 1995)



:

Abbildung 6: Modellhafte Darstellung der amplifizierten 5´upstream Region mit dem MMP-1 A/T-und C/T-Polymorphismen in Anlehnung an das Schema von Thiry-Blaise. Neben den Positionen der Polymorphismen sind auch Restriktionsenzyme (BanI, BSR) dargestellt. Die regulatorischen Elemente PEA 3, AP 1 und die TATA-Box sind mit Angabe ihrer Position als schwarze Kästchen dargestellt.

1.8 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Studie ist es, den Einfluss von verschiedenen MMP-Polymorphismen auf den Krankheitsverlauf der RA zu untersuchen und möglicherweise Krankheitsmarker zu identifizieren, die einen milden oder erosiven Verlauf der RA vorhersagen können. Untersucht wurden die für die Gelenkerosion der RA wichtigen MMP-1, und -3.

Folgende Fragestellungen wurden überprüft:

1. Sind die Polymorphismen mit dem Auftreten der RA assoziiert?
2. Sind die Polymorphismen zwischen Patienten mit geringer und starker Röntgenprogression unterschiedlich verteilt?
3. Beeinflussen sich die Polymorphismen gegenseitig?
4. Korrelieren diese Polymorphismen mit anderen, prognostischen Parametern für den Krankheitsverlauf der RA?

Erkenntnisse über die Assoziation von ***MMP***-Allelen mit einem destruierenden Verlauf der RA würden zu einer Optimierung der individuellen Therapie beitragen können. Ein drohender, irreversibler Verlust der Gelenkfunktion könnte frühzeitig erkannt und mit einer entsprechenden Therapie vermieden werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Allgemeine Chemikalien und Enzyme

Agarose	Gibco BRL, Eggstein, D
Ammoniumperoxidsulfat, APS	Serva, Heidelberg, D
Ampuwa	Fresenius AG, Bad Homburg, D
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Amersham, Cleveland, Ohio, USA
	Boehringer, Mannheim, D
Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	ABI, Weiterstadt, D
EDTA	USB, Cleveland, Ohio, USA
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, D
Ficoll 400	Sigma, Deisendorf, D
Formamid	Fluka, Neu-Ulm, D
Formamid loading dye	Amersham, Cleveland, USA
MDE-Fertiglösung	Serva, Heidelberg, D
Repro Gel ™	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt, D
BAN	BioLabs Inc, New England
BSR I	BioLabs Inc., New England
dNTPs	Boehringer, Mannheim
Sma I	BioLabs Inc., New England
Taq-DNA-Polymerase	MBI/Fermantas, St.Leon-Roth, D
	Roche, Mannheim,D
Thermo Sequenase dye terminator cycle sequencing pre-mix kit	Amersham LIFE SCIENCE, Braunschweig, D

DNA-Längenstandards

1 kb-Leiter	Boehringer, Mannheim, D
pUC-Mix Marker, 8	MBI/Fermentas, St. Leon-Roth, D

Oligodesoxyribonukleotide

Die verwendeten Oligodesoxyribonukleotide wurden von Pharmacia Biotech, Freiburg bezogen.

Primersequenzen

MMP-Polymorphsimus	Primersequenz	Länge des Amplifikats
MMP-1 1G/2G	5´-TTC CTC CCC TTA TGG ATT CC-3´ 5´-GTT ATG CCA CTT AGA TGA GG-3´	148/149 bp
MMP-1 C/T und MMP-1 A/T	5´-AGG GTA CCA GGC AGC TTA ACA AAG GC-3´ 5´-TCG AGC TCA GTG CAA GGT AAG TGA TGG C-3´	576 bp
MMP-3 5A/6A	5´-GGT TCT CCA TTC CTT TGA TG-3´ 5´-TCC TGG AAT TCA CAT CAC TG-3´	127/128 bp

2.1.2 Gebrauchswaren

Filterpapier	Schleicher & Schüll, Dassel, D
Glaswaren	Schott, Jena, D
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, D
Repro Gel ™	Pharmacia, Freiburg, D
Scalpelle, steril	Swann-Morton, Sheffield, UK

2.1.3 Geräte

Autoklav, Modell Sanoclav	Schütt, Göttingen, D
Biofuge A	Heraeus, Osterode, D
Biofuge pico	Heraeus, Osterode, D
Elektrophoresekammern	peq-Lab, Erlangen, D
Gelträger, EASY-CAST ™	peQLab, Erlangen, D
Sequenziergerät, ABI 377 und zughörige Anwendungsprogramme	Applied Biosystems, Weiterstadt, D
Sequenziergerät, Alf Express und zugehörige Anwendungsprogramme	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Spektralphotometer, LKB Ultrospec III	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Thermocycler, Gene Amp 9600	Percin Elmer Cetus, Weiterstadt, D
Thermocycler, Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, D
Transilluminator	Herolab, Wiesloch, D
Video copy processor	Mitsubishi, Japan

Videoprinter, E.A.S.Y. Image Plus	Herolab, Wiesloch, D
Vortex, Reax-top	Heidolph, Schwabach, D
Waage	Sartorius, Göttingen, D
Zentrifuge, 3K20	Sigma, Deisenhofen, D
Zentrifuge, Megafuge 1.0 R	Heraeus, Osterode, D

2.1.4 Puffer und Stammlösungen

Für alle Lösungen wurde Milli-Q-Wasser (Milli-Q-Water-System von Millipore) verwendet.

Elektrophorese-Ladepuffer

0,1 % Bromphenolblau

15 % Ficoll 400

Formamid-Ladepuffer

85 % Formamid

0,1 % Dextranblau

5x TBE

445 mM Tris

445 mM Borsäure

10 mM EDTA

ph 8,3

Lysispuffer

155 mM NH_4Cl

10 mM $KHCO_3$

0,1 mM EDTA

pH 7,4

SE-Puffer

75 mM NaCl

1 mM EDTA

ph 8,0

2.2 Patienten und Kontrollpersonen

Patientenkollektiv mit Rheumatoider Arthritis

In Zusammenarbeit mit der Rheumaklinik Ratingen wurde ein Kollektiv von insgesamt 308 Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA) rekrutiert. Das Kollektiv bestand aus 252 Frauen und 56 Männern. Vor Beginn der Studie wurde diese durch die Ethikkomission der Medizinischen Fakultät der MLU-Halle-Wittenberg genehmigt. Alle an der Studie teilnehmenden Patienten wurden schriftlich informiert und gaben ihr Einverständnis. Als Einschlusskriterium galt die Erkrankung an RA.

Die klinische Diagnose der RA erfolgte durch die behandelnden Ärzte nach den 1987 festgelegten Kriterien des American College of Rheumatology. (Arnett et al., 1988) Alle Patienten der Studie waren über einen Zeitraum von mindestens 4 Jahren an RA erkrankt und in regelmäßiger Behandlung der Rheumaklinik Ratingen. Als Parameter für den Schweregrad der Erkrankung und die Progression dienten sequentielle Röntgenaufnahmen

der Hände und Füße, von welchen mindestens 2 aufeinander folgende Aufnahmen vorhanden sein mussten.

Tabelle 1: Klinische und laborchemische Parameter (Mittelwert ± SD). Vergleich der Krankheitsverlaufsschwere untereinander.

	Milde RA	Schwere RA	Gesamt kollektiv
Patienten	170	138	308
Alter	62.95 ± 10.85	64.04 ± 10.53	63.44 ± 10.7
Geschlecht (weiblich)	83.5%	79.7%	81.8%
Erkrankungsdauer	12.75 ± 5.64	19.36 ± 8.28	15.74 ± 7.69
Ratingen-Score	9.45 ± 6.75	61.39 ± 35.1	33.14 ± 35.4
Rheuma faktor positiv	51.2%	77.9%	63.2%
Rheuma knoten	6.6%	11%	8.4%
CRP (mg/dl)	5.82 ± 10.83	10.34 ± 19.11	7.84 ± 15.23
BSG	21.93 ± 17.58	32.72 ± 20.52	26.76 ± 19.67
Synovek tomie	7.6%	18.5%	12%
Prothesen	9.6%	32.6%	12%
SE positiv	55.6%	72.4%	64.3%
DAS	3.9 ± 1.82	5.09 ± 1.86	4.43 ± 1.93
Erfolglose Basistherapien	1.46 ± 1.68	2.36 ± 2.04	1.87 ± 1.9

Klinische Verlaufparameter

Als klinische Verlaufparameter wurden 28 periphere Gelenke auf entzündliche Schwellung untersucht, sowie die Blutsenkungsrate (BSG) und das CRP bestimmt.

Ratingen-Score

Der Ratingen-Score ist ein 38 Gelenke umfassender Röntgenscore (incl. alle PIP und MCP Gelenke, 4 Handgelenksverbindungen, IP beider Zehen und die MTP Gelenke 2-5). Das Grading bei diesem Score wird für jedes Gelenk einzeln durchgeführt und basiert einzig auf dem Ausmaß der Oberflächenzerstörung, unabhängig davon ob die Oberfläche durch eine große Erosion oder mehrere kleine Erosionen zerstört ist. Mit einer Scala von 0-5 wird das Ausmaß der Knochendestruktion an jedem Gelenken gemessen. Jeder Grad der Scala entspricht einer Destruktion von 20% des Gelenkes.

Grad 1: eindeutige Erosion bis zu 20% der gesamten Oberfläche

Grad 2: Oberflächenzerstörung von 21 – 40 %

Grad 3: Oberflächenzerstörung von 41 – 60 %

Grad 4: Oberflächenzerstörung von 61 – 80 %

Grad 5: Oberflächenzerstörung von > 80 %

Zur Gradeinteilung werden die Gelenkoberflächen in 5 gleich große Bereiche eingeteilt (die distalen Gelenkoberflächen in 2, die proximalen in je 3 Bereiche und die Handgelenksknochen in 5 Bereiche). Das Ausmaß der Gelenkoberflächenzerstörung ist

durch die Länge der klar erkennbaren Unterbrechung der Kortikalis in Relation zur Gesamtoberfläche zu sehen. Durch die Länge der Oberflächendestruktion und die Einteilung der Gelenke in 5 Bereiche, kann eine genaue Einteilung vorgenommen werden. Dies geschieht für jedes Gelenk einzeln und die Gesamtsumme ergibt den Ratingen-Score, der in einem Bereich von 0-190 liegen kann. Bei einem oder mehreren nicht auswertbaren Gelenken, z.B. durch schlechte Filmqualität oder künstlichen Gelenkersatz, wurde der Score folgendermaßen errechnet: (Rau et al., 1998)

$$\text{Score} = \frac{\text{Gesamtscore aller auswertbaren Gelenke}}{\text{Zahl aller auswertbaren Gelenke}} \times 38$$

Die Differenzierung der Verlaufsform der RA wurde für die Patienten von Prof. Dr. Rau aus Ratingen vorgenommen. Es wurden zunächst Patienten ausgewählt, die anhand ihrer klinischen und röntgenologischen Befunde eindeutig der schweren oder der leichten Verlaufsform zuzuordnen waren. Anschließend wurden vergleichend die entsprechenden Ratingen-Scores hinzugezogen. Hierbei ergab sich folgende Einteilung:

Ratingen-Score

leichter Verlauf : 0–24

destruierender Verlauf : 25–190

Dieser Einteilung entsprechend ergaben sich 168 Fälle mit leichter RA und 140 mit schwerer RA. Die Patienten mit einer leichten RA waren seit mindestens 4 Jahren unter klinischer Kontrolle, die Patienten mit einer schweren RA seit mindestens 7 Jahren.

Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe besteht aus 110 gesunden nichtverwandten Kaukasiern, die hinsichtlich der Patientengruppe alters-und geschlechtsangepasst waren. Das Durchschnittsalter betrug 50 Jahre und der Frauenanteil betrug 80.9%.

2.3 Gewinnung genomischer-DNA aus peripherem Blut

Materialgewinnung

Für die molekulargenetische Bestimmung wurde venöses EDTA-Blut von Patienten und Kontrollpersonen benötigt. Die genomische DNA wurde aus den Leukozyten der Blutproben mit QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) extrahiert. Die Proben wurden in 1,5 ml Ependorf cups portioniert und bei -20°C eingefroren.

DNA-Isolierung aus Blut mit Proteinaussalzung (nach Baas et al. 1984; Miller et al.1988)

In einem 50 ml Reagenzgefäß wurden 10 ml EDTA-Vollblut mit 30 ml kaltem Lysispuffer vermischt und unter mehrmaligem Mischen 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Leukozyten für 15 min bei 2000 rpm und 10°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet in 10 ml kaltem Lysispuffer resuspendiert und erneut für 15 min bei 2000rpm und 10°C abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis das Leukozytensediment weißlich erschien. Anschließend wurde das Pellet zur Proteolyse der Leukozyten vollständig in 5 ml SE-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde mit 25 µl Proteinkinase K (10mg/ml) und 250µl 10 % SDS versehen und bei 55°C über Nacht inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 1,5 ml gesättigte NaCl-Lösung hinzugegeben. Die Suspension wurde 15 s gerührt und anschließend 15 min bei Raumtemperatur und 4000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reagenzgefäß gefüllt und die DNA mit 2 Volumen absolutem Ethanol, unter vorsichtigem Schwenken, aus dem Überstand ausgefällt. Dieses DNA-Präzipitat wurde mit einer 1 ml Pipette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und angetrocknet. Anschließend wurde das Pellet in H_2O aufgenommen und bis zu seiner Verwendung bei 4°C gekühlt.

Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte durch die Bestimmung der Extinktion mit einem Spektralphotometer, welches eine Quarzküvette von 1 cm Innendurchmesser besitzt. Nach Abgleichung des Photometers mit destilliertem Wasser wurde die in Ampuwa gelöste DNA folgenden Wellenlängen gemessen:

230 nm: Absorptionsbereich von Salzen

260 nm: Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren

280 nm: Absorptionsmaximum von Proteinen

So entspricht die OD_{260} (optische Dichte bei 260 nm) von 1 bei einer Küvettenschichtdicke von 1 cm 47,5 µg/ml für doppelsträngige DNA. Das Verhältnis zwischen den Extinktionen bei 260 und 280 nm (OD260/OD280) ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren und sollte 2,0 +/- 0,2 betragen. Die Konzentration der Nukleinsäure errechnet sich nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$\boxed{C_{DNA} = E_{260} \cdot f \cdot e}$$

C_{DNA} = Konzentration

E_{260} = Extinktion bei 260 nm

f = Verdünnungsfaktor

e = Konzentrationskoeffizient bei OD = 1 (µg/ml)

2.3.1 Elektrophoretische Auftrennung von DNA- Fragmenten

Agarose-Gelelektrophorese

Durch eine Elektrophorese in Agarosegelen können DNA-Moleküle in einem Größenbereich von 0,1 - 30 kb aufgetrennt werden. Zur Herstellung eines 2 %igen Agarosegels wurde die jeweils benötigte Agarosemenge in 1 x TBE Puffer gegeben, durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlung auf ca. 50°C mit EtBr-Lösung (10mg/ml) bis zu einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml versetzt. Anschließend wurde das mit Etbr versetzte Gel in einen Gelträger gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Längenstandard diente eine DNA mit bekannten Fragmentgrößen. Die Elektrophorese wurde in 1 x TBE Laufpuffer bei 90-120 V durchgeführt. Nach Ablauf der Elektrophorese wurden die Gele mit Hilfe des Videoprinter-Systems dokumentiert.

Isolierung von DNA aus Agarosegel

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente, wurden die gewünschten DNA Banden unter UV-Licht (305 nm) mit einem sterilen Skalpell aus den präperativen Gelen herausgeschnitten. Die so gewonnenen Agaroseblöckchen wurden in ein Filterpapier überführt, welches sich in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit abgeschnittenem Boden befand. Dieses wiederum befand sich in einem weiteren 1,5 ml-Reaktionsgefäß, in welchem nun die DNA nach Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge für 45 s bei 12.000 rpm aufgefangen wurde. Die so gewonnene DNA war frei von Agarose und konnte direkt für Sequenzierungen eingesetzt werden.

2.4 Polymerase - Kettenreaktion (PCR) (nach Saiki et al. 1988)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion, abgekürzt PCR, ermöglicht die Vermehrung (Amplifikation) spezifischer DNA Bereiche *in vitro* selbst bei Vorhandensein sehr geringer Ausgangsmengen an DNA. Die Methode basiert auf der enzymatischen Vermehrung eines spezifischen DNA-Abschnitts, zwischen zwei Primern (Oligonukleotide). Vorraussetzung ist allerdings die Information über die Sequenz beidseits des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes, sowie ein geeignetes Primer-Paar. Die Amplifikation findet in 20-50 aufeinander folgenden Zyklen mit jeweils drei Schritten statt. Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der genomischen DNA bei 94 °C. Die Auftrennung der doppelsträngigen DNA zu Einzelsträngen ist die Grundlage für den zweiten Schritt der PCR. Hier erfolgt eine Anlagerung des sequenzspezifischen Primers (Annealing) bei Temperaturen zwischen 55 - 75° C. Im dritten Schritt (Elongation) lagern sich mit Hilfe der bis 95°C thermostabilen Taq-Polymerase die komplementären Basen an der template-DNA an. Die 3'- Enden der Primer bilden die Startpunkte für die DNA-Polymerase. Um im dritten Schritt eine komplementäre DNA Sequenz herzustellen werden

neben den Primern die vier Desoxynucleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP benötigt. Über die zyklischen Wiederholungen der drei beschriebenen Schritte in einem programmierbaren Thermocycler kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der Zielsequenz im Reaktionsansatz, so dass als Ergebnis eine millionenfache Kopie des spezifischen DNA - Abschnittes vorliegt.

Allgemeiner Ansatz für eine PCR

Zur Durchführung einer PCR wurden folgenden Komponenten in einem Reaktionsgefäß vereinigt:

genomische DNA (50ng/µl)	2,0µl
dNTPs (10mM)	0,5µl
10x Taq-Polymerase-Puffer	2,5µl
forward Primer (15 pmol/µl)	1,0µl
reverse Primer (15 pmol/µl)	1,0µl
Taq-Polymerse (1 U/µl)	0,1-0,75 µl
H_2O	ad 20 µl

Nach Hinzugabe aller Komponenten, wurden die Proben in den Thermocycler mit dem bei 105°C vorgeheizten Deckel gegeben.
Es wurde auch eine so genannte touch-down PCR eingesetzt, bei welcher die Anlagerungstemperatur der Primer schrittweise um 1°C herabgesetzt wurde. Dies diente der Erhöhung der Spezifität bei unspezifischer Bindung der Primer.
Bei jeder PCR wurde eine Negativkontrolle, in dem alle Komponenten bis auf die DNA enthalten waren, mitgeführt. Alle Programme beginnen mit einem 3 min Denaturierungsschritt bei 94°C und enden mit einer 7 min Elongation der DNA-Stränge bei 72°C.

2.4.1 Analyse des *MMP1-A/T* Polymorphismus

Zur Genotypisierung des ***MMP1-A/T*** Polymorphismus wurde zuerst eine PCR durchgeführt, bei der eine 576 bp lange Sequenz amplifiziert wurde. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit dem Restrinktionsenzym BAN I versetzt. Dieses Enzym spaltet das 576 bp lange PCR Produkt am durch Punktmutation entstandenem ***T***-Allel in ein 475 bp und 101 bp langes Fragment. Die Spaltprodukte wurden nach Gelektrophorese im 2%igem Agarosegel nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz ohne Zugabe des Restriktionsenzyms mitgeführt.

1. Allgemeiner PCR-Ansatz (s.o.)
2. PCR Programm

Schritte 1-3 wurden über 35 Zyklen durchgeführt.

Vordenaturierung	94°C	3 min.
1. Denaturierung	94°C	60s
2. Primeranlagerung	62°C	60s
3. Elongation	72°C	3 min
Endelongation	72°C	7 min

3. Ansatz für die Spaltung mit BAN I

1,5µl	Puffer
3,2µl	Wasser
0,3µl	BAN I (20 U/µl)
10µl	amplifizierte DNA

Die Restriktion mit BAN I erfolgte über eine Zeit von 3h bei 37°C.

4. Gelelektrophorese

Die Fragmente wurden auf einem 2%iges Agarose Gel aufgetrennt und konnten durch Ethidiumbromidfärbung nachgewiesen werden. Zum Längenvergleich wurde ein 1kb Leiter und ein Puk Mix Marker verwendet. Der homozygote ***T/T*** Genotyp, bei dem beide Stränge gespalten wurden, wies eine Bande bei 475 bp, 101 bp und 3 bp auf, weil es eine zweite Schnittstelle des Enzyms gibt die das Fragment in ein 3 bp und ein 573 bp spaltet. Der Heterozygote ***A/T*** Genotyp wies Banden bei 576 bp, 475 bp, 101 bp und 3 bp auf. Der homozygote ***A/A*** Genotyp zeigte entsprechende Banden bei 576 bp und 3 bp (Abb.7).

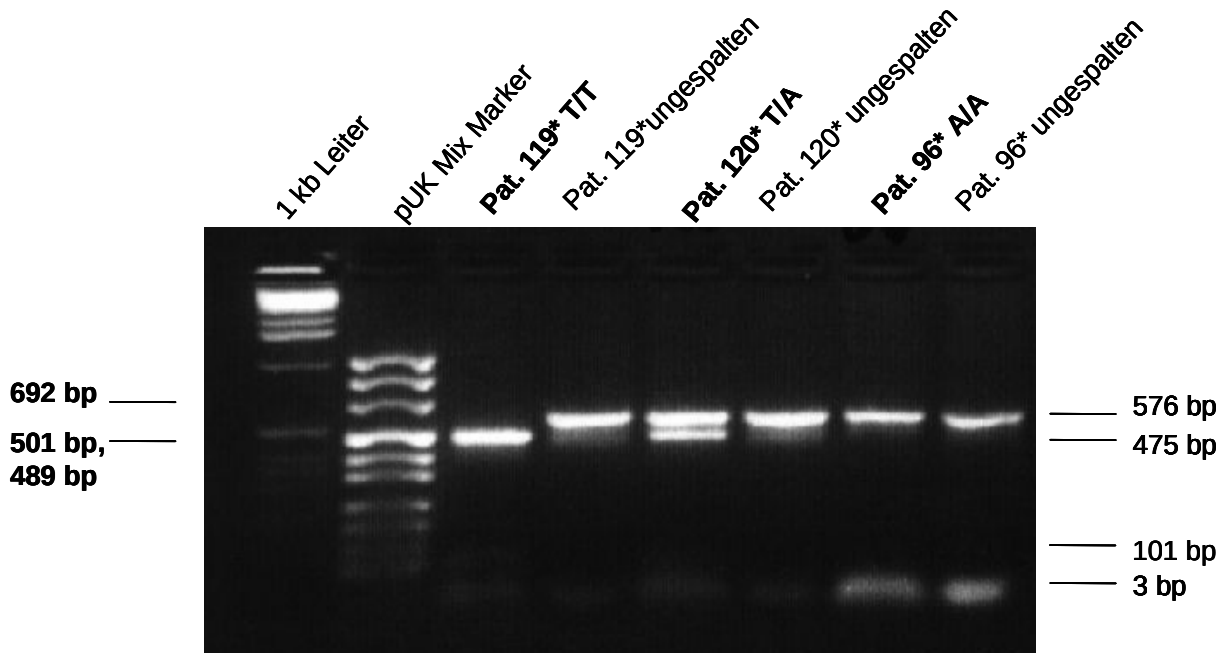


Abbildung 1: Spaltprodukte des MMP-1 A/T-Polymorphismus, mit BAN I gespalten neben der entsprechenden ungespaltenen Probe

2.4.2 Analyse des *MMP 1 C/T*-Polymorphismus

Zur Analyse des ***MMP1 C/T*** Polymorphismus wurde zunächst eine PCR durchgeführt bei der eine 576 bp lange Sequenz amplifiziert wurde, wie bei dem benachbartem ***MMP1 A/T*** Polymorphismus. Das PCR-Produkt wurde anschließend zur Hälfte mit dem Restriktionsenzym BSR I versetzt. Dieses Enzym spaltet das 576 bp lange PCR-Produkt in ein 375 bp und 101 bp langes Fragment an einem durch Punktmutation entstandenem ***T***-Allel. Diese Spaltprodukte wurden nach Gelektrophorese in Agarosegel nachgewiesen.

1. Allgemeiner PCR-Ansatz
2. PCR-Programm (siehe MMP1-A/T)
3. Ansatz für die Spaltung mit BSR I

1,5 µl	Puffer
2,9 µl	Wasser
0,6 µl	BSR I (5U/µl = 3U)
10 µl	PCR Produkt

Inkubation mit BSR I über 3 h bei 37°C

4. Gelektrophorese

Nach Auftragen auf ein 2%iges Agarose Gel wurden die DNA-Fragmente bei der Gelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromidanfärbung nachgewiesen. Der homozygote ***C/C***-Genotyp, bei dem das DNA Fragment nicht gespalten wurde wies eine Bande bei 576 bp auf. Der heterozygote ***C/T***-Genotyp weist Banden bei 576 bp, 375 bp und 101 bp auf. Der homozygote ***T/T***-Genotyp zeigt seine Banden bei 375 bp und 101 bp (Abb.8).

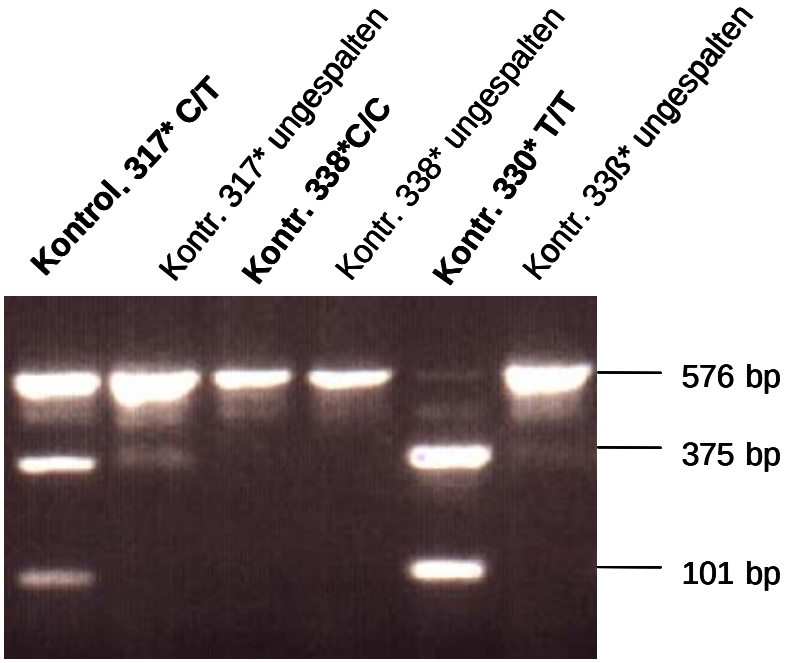


Abbildung 2: MMP-1 C/T-Polymorphismus mit paarweise aufgetragenen gespaltenen (mit BSR) und ungespaltenen Proben

2.5 SSCP (single-strand conformational polymorphism analysis) (nach Orita et al. 1989)

Dieses Verfahren dient der schnellen und unkomplizierten Identifikation von DNA-Polymorphismen. Nach Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnittes werden die DNA-Proben auf ein nichtdenaturierendes Polyacrylamidgel geladen, um elektrophoretisch aufgetrennt zu werden. Durch intramolekulare Wechselwirkungen kommt es innerhalb eines DNA-Stranges zur spezifischen Rückfaltung und Ausbildung komplexer Strukturen. Diese räumliche Anordnung (Konformität) ist abhängig von der DNA-Sequenz, d.h. bereits ein Unterschied in einer Base bewirkt eine Konformationsänderung. Auf diesem Prinzip der Konformationsänderung, des Längenunterschiedes und der damit verbundenen veränderten elektrophoretischen Mobilität im Gel basiert die SSCP. Durch die Markierung der Einzelstränge mit einem durch Cy5 Fluoreszenz-markiertem Primer konnte nun der Mobilitätsunterschied anhand der Fluoreszenssignale gemessen werden. Die Signale wurden durch einen Laserstrahl induziert und einem computergesteuerten Auswertprogramm im Alf-express Sequenzierautomaten übermittelt (Abb.9).

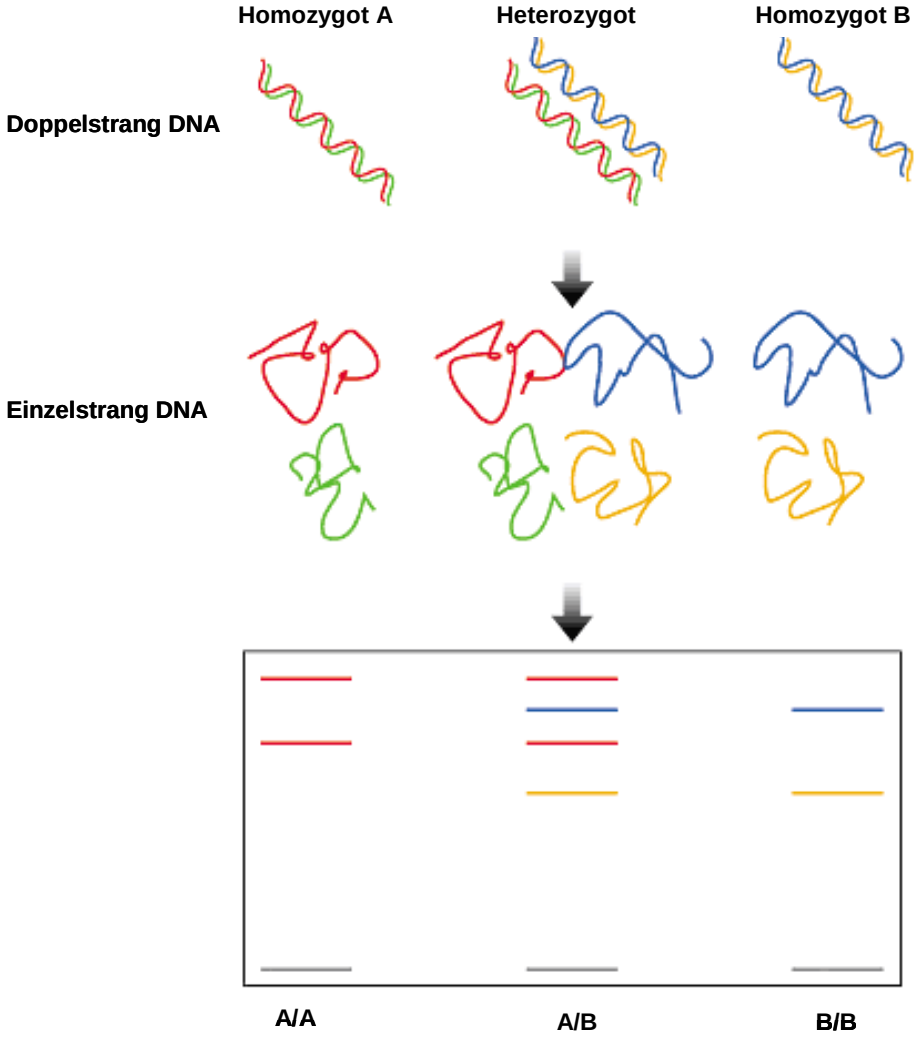


Abbildung 3: Schematische Darstellung des SSCP-Verfahrens, modifiziert nach Orita et al. 1989

Ansatz der PCR für die SSCP

Zur Durchführung der SSCP-PCR wurde zunächst ein PCR-Ansatz von 20µl, wie unter 2.3.6 beschrieben, angesetzt, wobei hier sowohl die verwendeten forward- als auch reverse-Primer mit Cy5-Fluoreszensfarbstoff markiert waren.

Folgendes PCR-Programm wurde eingesetzt:

1. Denaturierung für 2:30 min. bei 90°
2. 30 Zyklen mit jeweils
   - 2.1 Denaturierung: 94° für 45s
   - 2.2 Annealing: 60° für 45s
   - 2.3 Elongation: 72° für 90s
3. Abschließende Elongation der DNA-Stränge: 72° für 7 min.
4. Abkühlung auf 4°

Anschließend wurde 1 µl des PCR-Produkts mit 19µl Formamid-Ladepuffer gemischt und 3 min bei 85°C denaturiert. Die Proben wurden auf Eis gestellt und verblieben dort bis zum Auftragen auf das Gel.

Anfertigung von Gelen für den SSCP-Elektrophoreselauf

Vor dem Zusammenbau der Elektrophoresekammern wurden die Elektrophoreseplatten mit deionisiertem Wasser gereinigt, mit Isopropanol abgespült und anschließend getrocknet. Die beiden Platten wurden übereinander gelegt und durch seitliche Abstandhalter blieb ein Abstand von 0,5 mm zwischen den beiden Platten erhalten. Das Konstrukt wurde durch Metallklammern fest zusammengehalten. Die Elektrophoresekammern hatten eine Breite von 30 cm und eine Höhe von 14,5 cm, daraus ergab sich eine Laufstrecke von 8,5 cm von den Geltaschen bis zum Laserstrahl. Zum Schluss wurde der Kamm eingesetzt und die Glasplatten am Kamm mit Metallklammern zusammengedrückt.

Für die Herstellung des SSCP-Gels dienten 7,5 ml einer MDE-2x-Fertiglösung von Biozym als Grundmatrix.

Mischung für ein 0,5xMDE-Gel :

1. 7,5ml MDE (2x) Gellösung (Endkonzentration von 0,5xMDE)
2. 3,6ml 5xTBE (Endkonzentration von 0,6xTBE)
3. ad. 30ml deionisiertes Wasser
4. 12µl TEMED
5. 120µl APS (10% frisch hergestellt) (Endkonzentration von 0,04%)

Zuerst wurden die Stoffe der Position 1 bis 3 zusammengemischt. Anschließend wurde die Lösung 5 min mit einer Wasserstrahlpumpe entgast. Es erfolgte die Zugabe der Reagenzien 4 und 5, wobei das APS unter Schwenken hinzugefügt wurde. Nun konnte die Gellösung mit Hilfe einer 50 ml Spritze zügig und luftblasenfrei zwischen die präparierten Glasplatten gegossen werden. Nach einer Polymerisationszeit von mindestens 2 h konnten die Elektrophoresekammern in den Sequenzierautomaten eingesetzt werden. Als Laufpuffer wurde 0,6 x TBE in die Pufferkammer gegeben. Nun wurde der Gelkamm vorsichtig aus dem Gel herausgezogen, die Geltaschen wurden, falls nötig, gerichtet und vor einem Elektrophoreseverlauf mit TBE-Puffer ausgespült. Der korrekte waagerechte Einbau der Elektrophoresekammern wurde anhand der Markierungen auf den Glasplatten und dem Gerät kontrolliert und ggf. nachgestellt. Vor der SSCP-Analyse wurden die Glasplatten, die mittels einer inneren Zirkulationsschleife temperiert wurden, über einen externen Thermostaten auf die entsprechende Lauftemperatur (10°C oder 18°C) vorgekühlt. Damit das Gel richtig temperiert für den ersten Gellauf zur Verfügung stand, wurde es etwa eine Stunde vorgekühlt.

Der SSCP-Gelelektrophoreselauf

Die denaturierten und dann auf Eis stehenden Proben (siehe 2.5.1), wurden zu je 2µl in die mit Puffer gespülten Geltaschen gefüllt. Nachdem alle PCR-Produkte aufgetragen waren, dienten als Längenstandard PCR-Produkte mit bekannten Fragmentgrößen. Nun wurde die Elektrophoreseapparatur zusammengebaut. An das obere Puffergefäß wurde der Minuspol und an das untere Gefäß der Pluspol des Netzteiles angeschlossen. Das Programm Alfwin wurde gestartet, dieses stellt die Verbindung zwischen Alf-Express und dem Computer her und sammelt die gewonnenen Daten.

Für die Elektrophorese wurden folgende Laufbedingungen gewählt:

- 1500 Volt
- 150mA
- 15 Watt
- 540 min
- Heizung: aus
- Sample intervall: 2s

Auswertung der SSCP-Elektrophoreseläufe

Die Auswertung der Elektrophoresläufe erfolgte mit dem Computerprogramm Allelink der Firma Pharmacia. Zur Linearisierung aller Peaks wurde in jeder Spur der erste und letzte Peak gekennzeichnet, so wurden alle Peaks auf die gleiche Größe eingestellt. Nun waren

die dazwischenliegenden Peaks vergleichbar. Während jeder Elektrophorese liefen durch Sequenzierung bekannte Kontrollen zu jedem Genotyp mit.

2.5.1 Etablierung der Bedingungen für die SSCP-Analyse

Modifizierung der MDE-Konzentration

Für die SSCP-Analyse wurden die Elektrophoresegele mit einer Endkonzentration von 0,5x MDE und als Laufpuffer 0,6x TBE gewählt. Konzentrationsänderungen von MDE oder TBE führten zu keiner Verbesserung der Laufeigenschaften der Gele.

Modifizierung der Temperatur

Probeläufe der Gelelektrophorese bei 4, 10 und 18 C zeigten deutliche Unterschiede im Laufverhalten. Je niedriger die Temperatur war, desto langsamer erfolgte die Auftrennung der einzelnen Fragmente. Bei dem 4 C Lauf kam es zu einer erheblichen Wasserkondensation an den Glasscheiben der Gelkammern. Dies führte zum einen zu einer Fluoreszenzverminderung durch die feuchten Scheiben und einer Lichtstreuung der fluoreszierenden Primer und zum anderen zu einer Verminderung des TBE-Puffers durch das kondensierte, herunterlaufende Wasser. Bei 10 C zeigte sich eine deutlich verminderte Kondensation und die beste Darstellung der SSCP-Veränderungen. Nach jedem Lauf wurde der TBE-Puffer gewechselt, um einer Verdünnung so weit wie möglich vorzubeugen. Zunächst wurden alle SSCP-Läufe bei 18 C und 10 C durchgeführt, die Ergebnisse rechtfertigten jedoch eine alleinige Durchführung des 10 C Laufes.

2.5.2. Analyse des *MMP-3 5A/6A* Polymorphismus

Im Rahmen der Arbeit wurden 308 DNA-Proben von Patienten auf den ***MMP-3 5A/6A***-Promoterpolymorphismus mittels der oben beschriebenen SSCP-Analyse untersucht. Der homozygote ***5A*** Genotyp mit 127 bp wies seinen spezifischen Peak zeitlich kurz vor dem Peak der 128 bp langen ***6 A*** Genotyp aufgrund des Mobilitätsunterschiedes auf. Die heterozygoten Proben wiesen Peaks in beiden Lokalisationen auf (Abb.10).

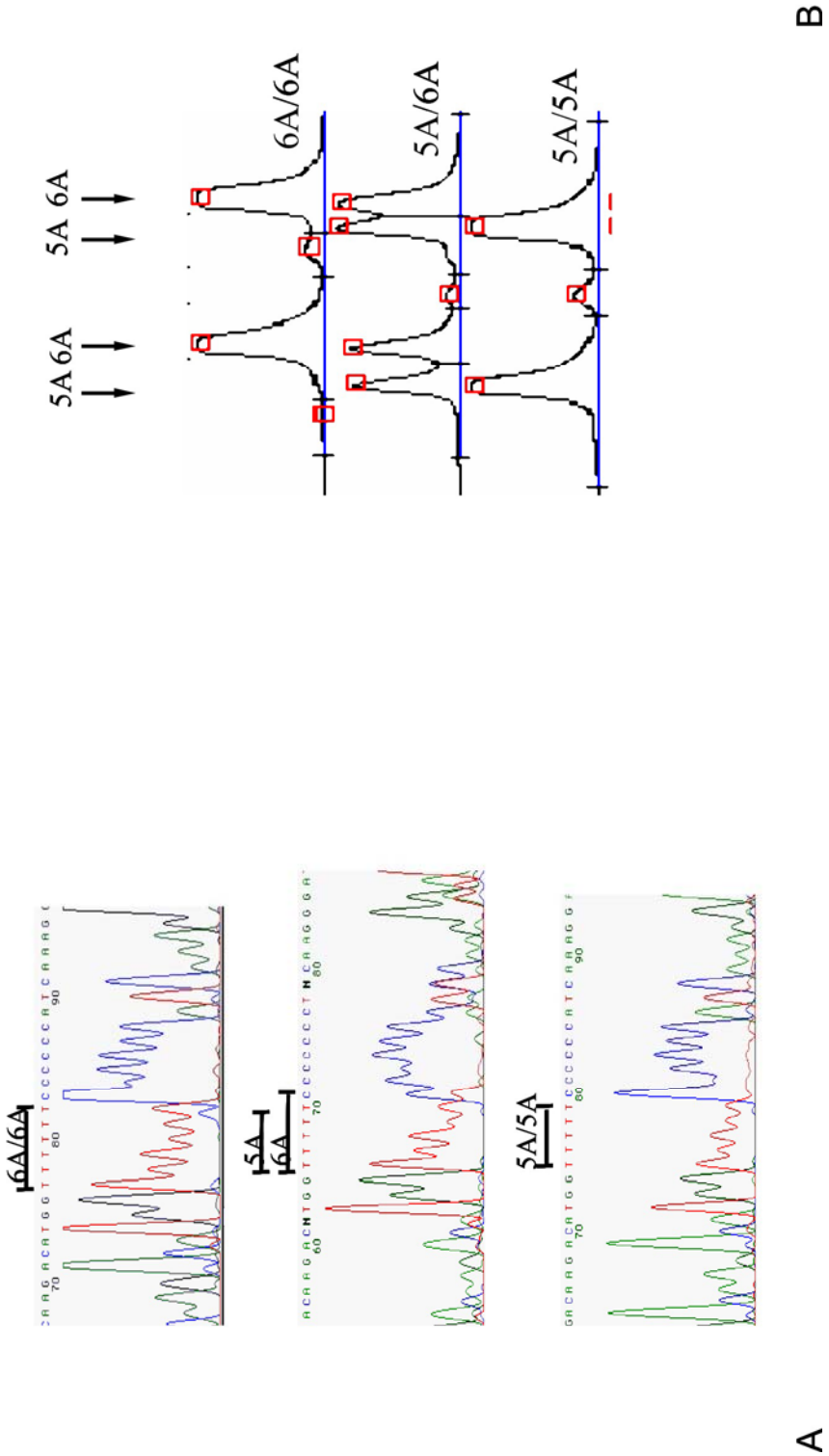


Abbildung 1 A: Reverse Sequenzierung des 5A/6A-Polymorphismus von MMP-3. B: SSCP-Chromatogramm des 5A/6A-Polymorphismus von MMP-3

2.5.3 Analyse des *MMP-1 1G/2G*-Polymorphismus

Zur Analyse dieses Polymorphismus wurde auch hier die SSCP-Gelelektrophorese gewählt. Der ***1G***-Genotyp ein 148 bp langes PCR-Produkt wies seinen spezifischen Peak zeitlich kurz vor dem charakteristischem Peak des ***2G***-Genotyps, einem DNA-Fragment von 149 bp Länge auf. Bei jeder Elektrophorese liefen zuvor sequenzierte Kontrollen eines jeden Genotypen mit (Abb.11).

2.6 DNA-Sequenzierung (nach Sanger et al. 1977)

Das Prinzip der DNA-Sequenzierung besteht in dem basenspezifischen Abbruch des zu sequenzierenden DNA-Abschnittes des 5'- nach 3'- Stranges. Dadurch entstehen verschieden große DNA-Fragmente. Der Kettenabbruch wird durch Didesoxynukleotide ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP hervorgerufen , welche statt einer OH-Gruppe in Position 3 des Kohlenstoffrings nur ein Wasserstoffatom besitzen, so dass sich dort kein weiteres Nukleotid anlagern kann. Die 4 Basen der Didesoxynukleotide sind mit jeweils verschiedenen fluoreszierenden Gruppen versehen, deren Signale während der Elektrophorese an einem bestimmten Punkt des Gels, an dem die DNA vorbeiwandert, durch einen Detektor aufgezeichnet werden. Durch die vier basenspezifischen Fluorophore können alle vier Ansätze auf eine einzige Gelspur aufgetragen werden.

Sequenzierreaktion

Die Sequenzierung wurde mit dem *Thermo Sequenase dye terminator cycle sequencing premix Kit* der Firma Amersham durchgeführt. In diesem Kit befanden sich ein gebrauchsfertiger Prämix bestehend aus Thermo Sequenase-DNA-Polymerase (Thermoplasma acidophilum), dNTPs, dITP, mit Fluoreszensfarbstoffen markierte ddNTPs und Puffer. Die Thermo Sequenase DNA Polymerase ermöglicht einen effizienten Einbau der ddNTPs. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte auf einer automatischen Sequenzieranlage (ABI 377) der Firma Applied Biosystems. Die zu sequenzierende DNA wurde aus Agarosegelen extrahiert und gereinigt.

Der Sequenzierungsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Prämix :	Thermo Sequenase II Mix A:	2 µl
	Thermo Sequenase II Mix B:	2 µl
Matrizen-DNA:		15 µl
Primer:		1µl
		ad 20 µl H_2O

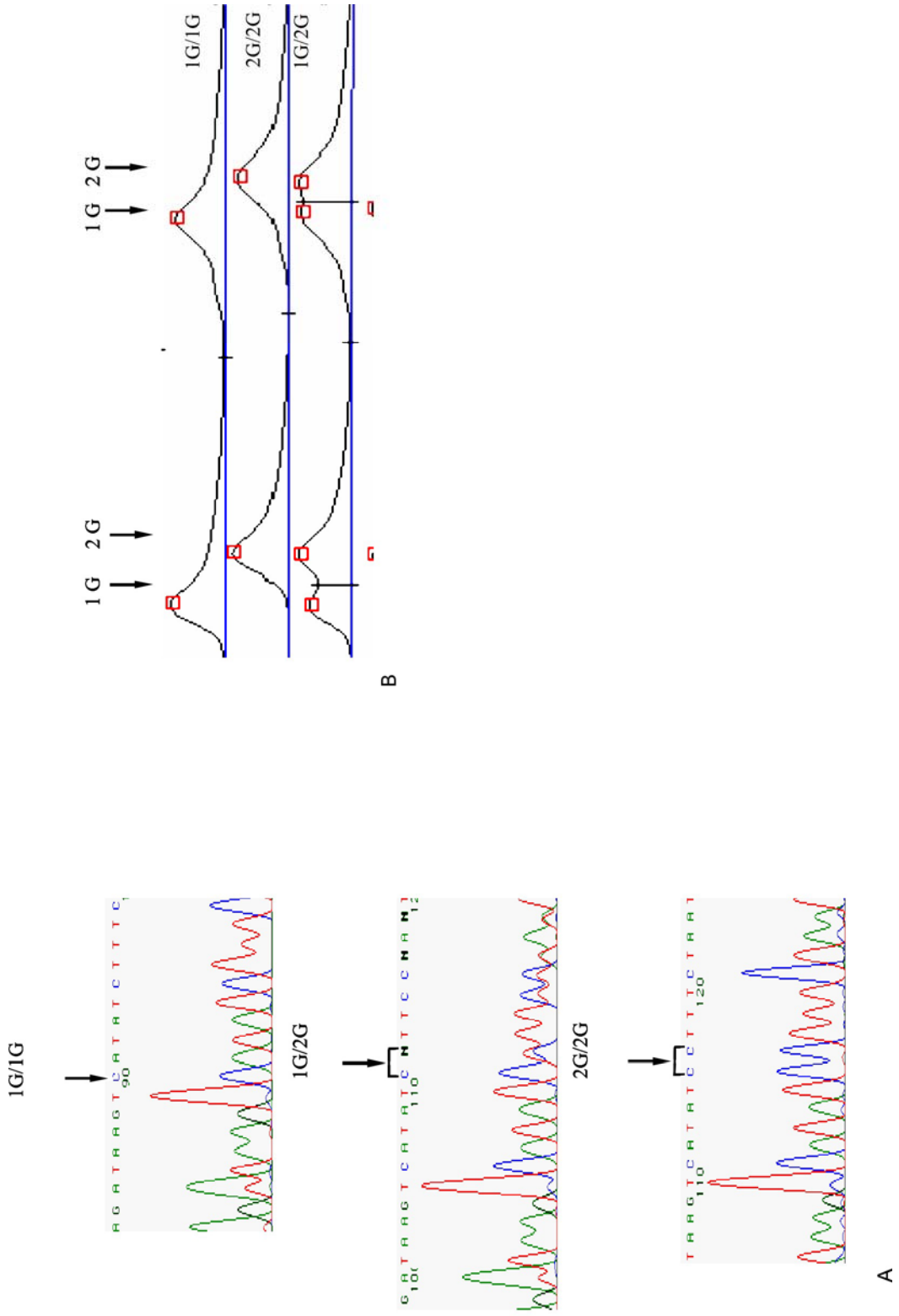


Abbildung 1:A: Reverse Sequenzierung des 1G/2G-Polymorphismus von MMP-1. B: SSCP-Chromatogramm des 1G/2G-Polymorphismus von MMP-

In einem Thermocycler wurde die Reaktion mit folgendem Cycling-Programm inkubiert:

1. Denaturierung zu Beginn der Reaktion: 94°C für 30 s
2. 25 Zyklen :

2.1	Denaturierung :	30 s bei 94°C
2.2	Annealing:	15 s bei 50°C
2.3	Elongation:	2 min bei 60°C

3. Abkühlung auf 4°C.

Nach Abschluss der Sequenzierung wurde die DNA durch Zugabe von 2 µl 2M NaAc und 66 µl 100% EtOH gefällt. Anschließend wurde für 15 min bei 12.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Pellets wurden in 250-500 µl 70% EtOH gewaschen, der Überstand abgetragen und anschließend 2-5 min getrocknet. Die Pellets wurden in 4 µl Ladepuffer resuspendiert. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben denaturiert und auf Eis abgekühlt

Elektrophorese und Auswertung

Die PCR-Produkte wurden von einer automatischen Sequenzieranlage ABI377 aufgetrennt und die Sequenz abgelesen. Die dafür nötigen Sequenzplatten wurden mit deionisiertem Wasser gespült und mit 70% Ethanol nachgespült und getrocknet. Als Gel diente die Long-Ranger Fertigmatrix von Biozym. Die Gele waren 48 cm lang und 0,3 mm dick. Die Elektrophorese lief bei 37 W über 15 Stunden mit 1x TBE als Laufpuffer. Die Auswertung erfolgt über die Software des Herstellers.

2.7 Qualitätssicherung

Sämtliche Elektrophoresen wurden grundsätzlich zweimalig durchgeführt. Die Elektrophoresephotos wurden von zwei Untersuchern bewertet. Bei unterschiedlichen Bewertungen einer Probe wurde die Bestimmung wiederholt.

In jeder PCR und Gelektrophorese liefen Kontrollen mit allen Allelkombinationen mit. Zur frühzeitigen Erkennung einer Kontamination wurde in jeder PCR bzw. Gelektrophorese eine negative Kontrolle mitgeführt.

2.8 Statistik

Für die statistische Analyse wurde das Patientenkollektiv in zwei Gruppen unterteilt: eine Gruppe mit leichter RA (n=170) und eine zweite Gruppe mit schwerer RA (n=138). Die Zugehörigkeit zu der einen oder anderen Gruppe war abhängig von der Höhe des Ratingen-Scores. Alle Patienten mit einem Score > 24 wurden in die Gruppe der schwer Erkrankten eingeteilt. Bei allen Patienten war der Krankheitsverlauf über mindestens 4 Jahre beobachtet worden.

Die untersuchten Parameter wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Die Variablen wurden in jeder Gruppe mit dem Koomogorov-Smirnov-Test für eine Stichprobe auf Normalverteilung getestet. Bei normalverteilten Variablen wurden Mittelwerte mit dem t-Test nach Student für unabhängige Stichproben zwischen zwei Gruppen verglichen. Die einfaktorielle ANOVA wurde eingesetzt, wenn mehr als 2 Gruppen vorhanden waren. Bei nicht normalverteilten Variablen wurde für den Vergleich zwischen zwei Gruppen der U-Test nach Mann-Whitney und bei mehr als zwei Gruppen der H-Test nach Kruskal-Wallis durchgeführt. Ein Vergleich innerhalb der Gruppen wurde mit dem Wilcoxon Test vorgenommen. Kreuztabellen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson und dem exakten Test nach Fisher ausgewertet. Die Genotypenverteilung in der Patienten- und Kontrollgruppe wurde zum Ausschluss einer Selektion mit den anhand des Hardy-Weinberg-Gesetzes erwarteten Frequenzen verglichen (Hardy, 1908). Diese statistischen Berechnungen wurden mit dem SPSS Programm (Statistic Package for Social Science, SPSS GmbH, München) durchgeführt. Wahrscheinlichkeitswerte $p < 0.05$ galten als signifikant.

Die Hypothese, dass ein Haplotyp zwischen den Genen ***MMP 3*** und ***MMP 1*** eine Assoziation mit der Schwere der RA zeigt, wurde mit einem Likelihood-ratio-test analysiert. Hier wurden die Häufigkeiten der Allelunterschiede und der Haplotypen der schweren und leichten Fälle berechnet und verglichen. Eine Interpretation dieser Ergebnisse wurde mit dem Programm ASSOCIAT.EXE (Ott, J, http://linkage.rockefeller.edu) durchgeführt. Die Regressionsanalyse wurde mit dem Progamm STATISTICA V6 errechnet.

Die Schwere der RA in Abhängigkeit vom Ratingen-Score (mit dem Ratingen-Score als quantitatives Maß) wurde als Zielphänotyp mittels Faktorenanalyse analysiert. Alle p-Werte der Regressionsanalyse wurden auch empirisch bezüglich eines bootstraps und einer Permutation kontrolliert.

Die Korrelation zwischen den Plasmakonzentrationen von ***MMP1*** und ***MMP-3*** mit dem Ratingen-Score wurde mittels Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman evaluiert.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der SSCP-Analyse in der 5´upstream Region von *MMP-3*

In 7 Fällen (1.7 %) der 411 untersuchten Proben konnte der ***MMP-3 5A/6A***-Polymorphismus nicht bestimmt werden. Damit verblieben 301 wertbare Patienten-Proben, davon 55 Männer und 247 Frauen. Die Allelfrequenzen und Genotypenverteilung des ***MMP-3 5A/6A***-Polymorphismus unterschieden sich nicht signifikant (p=0.93) zwischen Patienten und Kontrollen (Tab.2). Die Prüfung der Genotypenverteilung wies sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe entsprechend dem Hardy-Weinberg Gesetz ein stabiles Gleichgewicht auf.

Tabelle 1: Allel-und Genotypenverteilung des MMP-3 *5A/6A*-Polymorphismus bei Patienten und Kontrollen und in Abhängigkeit der Erkrankungsschwere

	MMP-3	Kontrollen		RA Gesamt		Milde RA		Schwere RA	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
Allele	**5A**	106	48.2	298	49.5	168	51.2	131	47.5
	6A	114	51.8	304	50.5	160	48.8	145	52.5
Gesamt		220	100	602	100	328	100	276	100
Genotypen	**5A/5A**	26	23.6	77	25.6	44	26.8	33	23.9
	5A/6A	54	49.1	144	47.8	80	48.8	65	47.1
	6A/6A	30	27.3	80	26.6	40	24.4	40	29
Gesamt		110	100	301	100	164	100	138	100

Der Vergleich der Häufigkeit der ***MMP-3*** Allele zeigte, dass das ***5A***-Allel etwas häufiger in der Gruppe der 164 leicht Erkrankten auftritt (51.2 versus 47.5% siehe Tab.2), als in der Gruppe der 138 schwer Betroffenen. Umgekehrt proportional verhält sich die Verteilung für das ***6A***-Allel. Diese Differenz in der Allelverteilung zwischen den beiden Gruppen ist nicht signifikant.

Die Analyse der Genotypenverteilung zwischen schwer und leicht Erkrankten zeigt, basierend auf einem Chi-Quadrat-Test mit p= 0.64, keine signifikante Assoziation zwischen Erkrankungsschwere und Genotyp des ***MMP-3 5A/6A***-Polymorphismus.

3.1.1 *MMP-3 5A/6A* Genotypverteilung in Abhängigkeit vom Geschlecht

Die Patienten bestanden zu 81,8% aus Frauen und 18,2% aus Männern, entsprechend der 4fachen Krankheitshäufigkeit des weiblichen Geschlechts. Die Alters- und Geschlechtsgematchte Kontrollgruppe besteht zu 80,9% aus Frauen und 19,1% aus Männern (Tab.3).

Die geschlechtsabhängige Verteilung der Genotypen des ***MMP-3 5A/6A***-Polymorphismus ist in der Gesamt-Gruppe der Patienten gleichmäßig verteilt, ebenso wie in der Kontrollgruppe (Tab.3).

Ein Vergleich der Genotypenverteilung bei Männern und Frauen in Abhängigkeit von der Erkrankungsschwere zeigt hier keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung (p=0.62).

Tabelle 2: Genotypenverteilung und Allelfrequenzen des MMP 3 *5A/6A*-Polymorphismus bei Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit vom Geschlecht

		Patienten				Kontrollen			
MMP-3 5A/6A		**Männer**		**Frauen**		**Männer**		**Frauen**	
Allele	**5A**	53	48%	246	49,8%	22	52%	84	47%
	6A	57	42%	248	50,2%	20	48%	94	53%
	Gesamt	110	100%	494	100%	42	100%	178	100%
Genotypen	**5A/5A**	14	25,5%	63	25,5%	7	33,3%	19	21,3%
	5A/6A	25	45,5%	120	48,6%	8	38,1%	46	51,7%
	6A/6A	16	29,1%	64	25,9%	6	28,6%	24	27%
	Gesamt	55	100%	247	100%	21	100%	89	100%

3.1.2 *MMP-3 5A/6A*-Polymorphismus und das „shared epitope“

Von dem Patienten-Pool der 308 Patienten wurde bei 112 Patienten (54 leicht Erkrankte und 58 schwer Erkrankte) das sog. „shared epitope“ (SE) bestimmt. Von 112 getesteten Patienten wiesen 64,3% das SE auf.

Ein gehäuftes Vorkommen der SE in Abhängigkeit vom Genotyp des ***MMP-3 5A/6A***-Polymorphismus war mit statistischen Methoden nicht nachweisbar. Allerdings ließ sich ein häufigeres Vorkommen des SE in der Gruppe schwer Erkrankten mit dem ***6A/6A*** Genotyp vermuten. Die Fallzahlen waren jedoch für einen signifkanten Unterschied zu gering.

3.1.4 Untersuchung der Assoziation des *MMP-3 5A/6A*-Polymorphismus mit klinischen Parametern

Eine Assoziation des ***MMP-3 5A/6A***-Polymorphismus mit klinischen Parametern wie Synovektomien, Rheumaknoten, erfolglose Basistherapien, Erkrankungsdauer in Jahren, Ratingenscore, Zahl der betroffenen Gelenke sowie das Alter wies keine statistische Signifikanz auf. Auch die laborchemischen Parameter wie CRP, BSG, IgM-Rheumafaktor, ***MMP-3*** und ***MMP-1*** Konzentration im Serum waren nicht signifikant mit dem ***5A/6A***-Polymorphismus assoziiert.

Tabelle 3:SE-Träger in Abhängigkeit der Erkrankungsschwere und dem MMP-3 *5A/6A*-Polymorphismus. n: 112

	Patienten			
MMP-3	**Shared epitope**			
	SE	**SE**	**Kein SE**	**Kein SE**
	Anzahl	**Prozent**	**Anzahl**	**Prozent**
5A/5A	15	13,4	11	9,8
5A/6A	34	30,4	20	17,9
6A/6A	23	20,5	9	8,0
Gesamt	72	64,3	40	35,7
Leichte RA				
5A/5A	8	14,8	7	13
5A/6A	14	25,9	11	20,4
6A/6A	8	14,8	6	11
Gesamt	30	55.6	24	44,4
Schwere RA				
5A/5A	7	12,1	4	6,9
5A/6A	20	34,5	9	15,5
6A/6A	15	25,9	3	5,2
Gesamt	42	72,4	16	27,6

3.1.5 *MMP-3 5A/6A*-Polymorphismus in Abhängigkeit vom Ratingenscore

Zwischen den ***MMP-3*** Genotypen und den radiologischen Daten besteht keine signifikante Assoziation. Dies betrifft sowohl die Röntgenprogression als auch die Absolutwerte des Ratingenscores (siehe Tab.5).

Tabelle 4: Assoziation zwischen den MMP-3 Genotypen und dem Ratingenscore; ns= nicht signifikant im Chi-Quadrat Test; Paramter (Mittlewert ± SD= Standardfehler des Mittelwerts)

MMP-3	Ratingenscore gesamt	Ratingenscore 1	Ratingenscore 2	Ratingenscore 3	Signifikanz
5A/5A	28.4 ± 3.4	12.9 ± 3	19.4 ± 2.2	29.2 ± 3	ns
5A/6A	34.7 ± 3	14.5 ± 2	24.1 ± 2.3	37.4 ± 3.5	ns
6A/6A	34.1 ± 4	16.3 ± 3	24.9 ± 3.3	34.6 ± 4.5	ns

3.2 Röntgenprogression

Der Median des Ratingenscores betrug bei 308 Patienten 25 mit einer jährlichen Progression von 1.73 (± 2.39). Das Fortschreiten der röntgenologischen Progression über die Zeit ist signifikant erhöht ($p<0.001$). Besonders zwischen dem Erkrankungsbeginn und der ersten Röntgenaufnahme (Median 3) zeigt sich eine signifikant höhere Progression als zwischen

dem Krankheitsbeginn und der 2. (Median 1.8) oder der 3. (Median 1.7) Röntgenaufnahme (Abb.12).

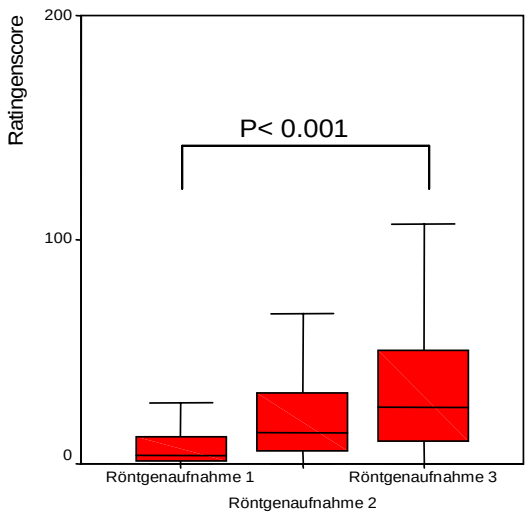


Abbildung 1: Ratingenscore im Verlauf von 3 Röntgenaufnahmen

3.3 Ergebnisse der SSCP-Analyse des *MMP-1 1G/2G* Polymorphismus

In der SSCP-Analyse des ***MMP-1 1G/2G***-Polymorphismus der 308 Patienten konnten 8 (2,6%) aus technischen Gründen nicht ausgewertet werden.

Die Verteilung der Allelhäufigkeit in der Kontrollgruppe ist mit 55% ***1G*** im Vergleich zu 51% in der Patientengruppe ausgeglichen. Ebenso sieht es mit der Allelverteilung des ***2G***-Allels aus, welches mit 45% in der Kontrollgruppe vertreten ist und mit 49% in der Patientengruppe. Die Allelverteilung entspricht sowohl für das ***1G***, als auch für das ***2G*** Allel der Normalverteilung nach Hardy-Weinberg und weist keine Signifikanz zwischen Gesunden und Erkrankten auf.

Der Vergleich zwischen der Gruppe der leicht mit der der schwer Erkrankten ergab ein häufigeres Auftreten des ***1G***-Allels bei leicht Erkrankten (54% versus 48%).

Diese Verschiebung zeichnet sich auch in der Analyse der Genotypen in Abhängigkeit der Erkrankungsschwere ab. Der ***1G/1G*** Genotyp in der Gruppe der leicht Erkrankten mit 28,2% und der ***2G/2G*** bei den schwer Erkrankten mit 27,7% tendenziell häufiger auf (siehe auch Tabelle 7). Der Chi-Quadrat Test innerhalb der Patientengruppe weist jedoch mit p= 0,356 keine signifikant unterschiedliche Genotypenverteilung auf. Der ***1G/1G***-Genotyp ist gegenüber dem ***2G/2G***-Genotyp bei Patienten und Kontrollen mit p= 0,015 signifikant häufiger.

Tabelle 5: Genotypenverteilung und Allelhäufigkeiten des MMP 1 *1G/2G* Polymorphismus; n = 110 Kontrollen und n = 300 Pat. sowie deren Subgruppen der Pat. mit milder RA n= 163 und schwerer RA n = 137

	MMP-1	Kontrollen		RA Gesamt		Milde RA		Schwere RA	
		Absolut	%	Absolut	%	Absolut	%	Absolut	%
Allelhäufig-keiten	1G	122	55	307	51	175	54	132	48
	2G	98	45	293	49	151	46	142	52
	Gesamt	220	100	600	100	336	100	274	100
Genotypen	1G/1G	34	30,9	79	26,3	46	28,2	33	24,1
	1G/2G	54	49,1	149	49,7	83	50,9	66	48,2
	2G/2G	22	20	72	24	34	20,9	38	27,7
	Gesamt	110	100	300	100	163	100	137	100

3.3.1 *MMP-1 1G/2G* Genotypverteilung in Abhängigkeit vom Geschlecht

Frauen weisen signifikant häufiger den homozygoten ***1G***-Genotyp (p=0.009) gegenüber Männern auf. Dabei ist jedoch die niedrige Fallzahl von 7 Männern mit ***1G/1G*** gegenüber 72 Frauen zu beachten. In der Kontrollgruppe mit der gleichen Geschlechtsverteilung (81% Frauen und 19% Männer) zeigte sich eine ausgeglichene Verteilung des ***1G/1G***-Genotyps. Hier wies der ***2G/2G***-Genotyp eine Häufung bei den Frauen (22,5%) im Vergleich zu den Männern (9,5%) auf. Zwischen den Patientengruppen mit leichter und schwerer Erkrankung zeigt sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des ***1G/1G***-Genotyps und seiner Verteilung zwischen Männern und Frauen. In beiden Gruppen zeigen Männer deutlich seltener den homozygoten ***1G***-Genotyp. Doch auch hier zeigt sich eine mit 3 bzw. 4 Männern sehr niedrige Fallzahl, verglichen mit den 43 bzw. 29 Frauen (siehe Tab. 7). Aus diesem Grund ist eine errechnete Signifikanz hier nicht zu werten.

Tabelle 6: Genotypen und Allelverteilung des MMP 1 *1G/2G* Polymorphismus in Abhängigkeit von der Schwere der Erkrankung und des Geschlechts

	Patienten				Kontrollen			
MMP-1	**Geschlecht**				**Geschlecht**			
	männlich		**weiblich**		**männlich**		**weiblich**	
1G/1G	7	12,7%	72	29,4%	7	33,3%	27	30,3%
1G/2G	37	67,3%	112	45,7%	12	57,2%	42	47,2%
2G/2G	11	20%	61	24,9%	2	9,5%	20	22,5%
Gesamt	55	100%	245	100%	21	100%	89	100%
Schwere Fälle								
1G/1G	3	11,1%	43	31,6%				
1G/2G	19	70,4%	64	47,1%				
2G/2G	5	18,5%	29	21,3%				
Gesamt	27	100%	136	100%				
Leichte Fälle								
1G/1G	4	14,3%	29	26,6%				
1G/2G	18	64,3%	48	44%				
2G/2G	6	21,4%	32	29,4%				
Gesamt	28	100%	109	100%				

3.3.2 *MMP-1* Polymorphismus und das „shared epitope“

Von den 300 auf ***MMP-1*** Polymorphismus untersuchten Patienten wurde von 112 Patienten das SE bestimmt. 54 davon gehörten zur Gruppe der leicht Betroffenen und 58 zur Gruppe der schwer Betroffenen (siehe Tab.9)

Es fanden sich in der Verteilung des SE bezüglich der Genotypen und der Krankheitsschwere keine signifikant unterschiedliche Häufigkeiten.

Tabelle 7: SE-Verteilung in Abhängigkeit vom MMP-1 *1G/2G* Polymorphismus

	Patienten			
MMP-1	**Shared epitope**			
	SE	**SE**	**Kein SE**	**Kein SE**
	absolut	**%**	**absolut**	**%**
1G/1G	17	23,6%	8	20%
1G/2G	35	48,6%	25	62,5%
2G/2G	20	27,8%	7	17,5%
Gesamt	72	100%	40	100%
Leichte RA				
1G/1G	7	23,3%	5	20,8%
1G/2G	16	53,3%	13	54,2%
2G/2G	7	23,3%	6	25%
Gesamt	30	100%	24	100%
Schwere RA				
1G/1G	10	23,8%	3	18,8%
1G/2G	19	45,2%	12	75%
2G/2G	13	31%	1	6,3%
Gesamt	42	100%	16	100%

3.3.3 Assoziation des *MMP-1* Genotyps mit der Röntgenprogression

Ein Vergleich der Progression des Ratingenscores mit den Genotypen des ***MMP-1 1G/2G***-Polymorphismus zeigt im Gesamtkollektiv eine ausgeglichene Progression für alle Genotypen. Abhängig von der Erkrankungsschwere zeigt der homozygote ***2G/2G*** Typ die Tendenz zur geringsten Progression in der Gruppe der Patienten mit milder RA, aber auch in der Gruppe mit erosiver RA weist dieser Genotyp den geringsten Endwert der Röntgenprogession auf (siehe Tab.9). Der homozygote ***1G/1G***-Genotyp tendiert zu einer stärkeren Röntgenprogression in beiden Gruppen. Statistisch zeigte sich keine signifikante Abhängigkeit der Genotypen mit der Röntgenprogression.

Tabelle 8: MMP 1 Genotypen in Abhängigkeit vom Ratingenscore

MMP-1	Ratingenscore 1	Ratingenscore 2	Ratingenscore 3
Gesamt			
1G/1G	6 ± 21,7	14 ± 27,1	23,5 ± 37,6
1G/2G	5 ± 25,9	13 ± 25,6	25 ±29,5
2G/2G	4 ± 26,5	15 ± 27,9	28,5 ± 33
leichte RA			
1G/1G	4 ± 5,2	8 ± 5,8	9 ± 6,5
1G/2G	3 ± 5,1	7 ± 6,7	10 ± 6,9
2G/2G	1,5 ± 5,1	6,5 ± 6	7 ± 7,5
schwere RA			
1G/1G	13 ± 28,7	39 ± 29,7	60 ± 33,1
1G/2G	12,5 ±34,6	29,5 ±30,7	50 ± 28,1
2G/2G	13 ±33	39 ± 29	44 ± 31,4

3.4 Haplotypenvergleich des MMP-1 und MMP-3 Polymorphismus

Ein Vergleich der Haplotypen des ***MMP-1 1G/2G***-Polymorphismus und des ***MMP-3 5A/6A-***Polymorphismus bei 299 Patienten und 110 Kontrollen zeigt, dass die verschiedenen Genotypen unterschiedlich miteinander assoziiert sind. Innerhalb der Patientengruppe zeigt sich eine statistisch signifikante Assoziation zwischen bestimmten ***MMP-1*** und ***MMP-3*** Allelen. Besonders die Kombination des ***1G*** (***MMP-1***) mit dem ***5A***-Allel (***MMP-3***) und das ***2G*** (***MMP-1***) mit dem ***6A***-Allel (***MMP-3***) treten signifikant häufiger auf ($p << 10^{-6}$). (Tab.10.) Diese Verteilung entspricht einem Linkage Disequilibrium zwischen beiden ***MMP***-Genen, einem so genannten Kopplungsungleichgewicht mit einem Linkage Disequilibrium Index D´ 0,45 für Patienten und Kontrollen.

Tabelle 9: Allelkombinationen des *1G/2G* (MMP-1) und *5A/6A* (MMP-3) Polymorphismus zwischen Patienten und Kontrollen in Absolutwerten und Prozenten

	MMP 3 bei Rheumatoider Arthritis						**Kontrollen MMP 3**					
	5A/5A		**5A/6A**		**6A/6A**		**5A/5A**		**5A/6A**		**6A/6A**	
MMP 1	abs	%	abs	3	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%
1G/1G	**39**	**13**	33	11	7	2,3	15	13,6	18	16,4	1	0,9
1G/2G	33	11	85	59	30	10	8	7,3	29	26,4	17	15,5
2G/2G	5	1,7	26	8,7	**41**	**13,7**	3	2,7	7	6,4	12	10,9
Gesamt	77	25,8	144	48,2	78	26,1	26	23,6	54	49,1	30	27,3

Zur weiteren Differenzierung wurden die Patienten in die Gruppen 1 und 2 entsprechend der Schwere der RA unterteilt. Hier zeigt sich, dass sowohl die Kombination ***1G/1G*** und ***5A/5A*** in beiden Gruppen deutlich häufiger vorkommen, als auch die Kombination des ***6A/6A*** und ***2G/2G***-Genotyp. In der Gruppe der schwer Erkrankten treten der ***6A/6A*** und ***1G/1G*** Genotyp sowie des ***2G/2G*** und ***5A/5A*** Genotyp häufiger gemeinsam auf als in der Gruppe der leicht Erkrankten. (siehe Tabelle 11)

Tabelle 10: Vergleich der Allelkombinationen des *1G/2G* (MMP-1) und *5A/6A* (MMP-3) Polymorphismus in Absolutwerten und Prozenten

Leichte RA	**MMP-3**					
MMP-1	**5A/5A**		**5A/6A**		**6A/6A**	
	abs	**%**	**abs**	**%**	**abs**	**%**
1G/1G	**25**	**15,4**	18	11,1	3	1,9
1G/2G	18	11,1	49	30,2	15	9,3
2G/2G	1	0,6	13	8	**20**	**12,3**
Gesamt	44	27,2	80	49,4	38	23,5
Schwere RA						
1G/1G	**14**	**10,1**	15	10,9	4	2,9
1G/2G	15	10,9	37	26,8	15	10,9
2G/2G	4	2,9	13	9,4	**21**	**15,2**
Gesamt	33	23,9	65	47,1	40	29

3.4.1 Regressionsanalyse des *1G-5A* Haplotyps

Die Mehrheit der Haplotypen entsprach entweder dem ***1G/5A***- Typ oder dem ***2G/6A***-Typ. Lediglich einige wenige Haplotypen wiesen die ***1G/6A*** oder ***2G/5A*** Kombination auf. Nur 84% der ***1G-5A*** Haplotypen sind auf demselben Chromosom lokalisiert. Da es nicht möglich ist exakt, zu berechnen wie viele Patienten den ***1G-5A*** Haplotypen aufweisen, wurde eine definierte quantitative Variable „geschätzte Zahl der ***1G-5A*** Haplotypen“ zur Erfassung der Haplotypen definiert. Die durchgeführte Regressionsanalyse zeigte eine hochsignifikante Korrelation zwischen dem Ratingenscore und der „geschätzten Zahl der ***1G-5A*** Haplotypen“ mit p= 0,0001. Weiterhin zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Ratingenscore und dem Interaktionsterminus „geschätzte Zahl der ***1G-5A***-Haplotypen x Krankheitsdauer“ p=0,0007 (Abb.13).

Insgesamt erklärt das Regressionsmodell 35% der Varianz des Ratingenscores.

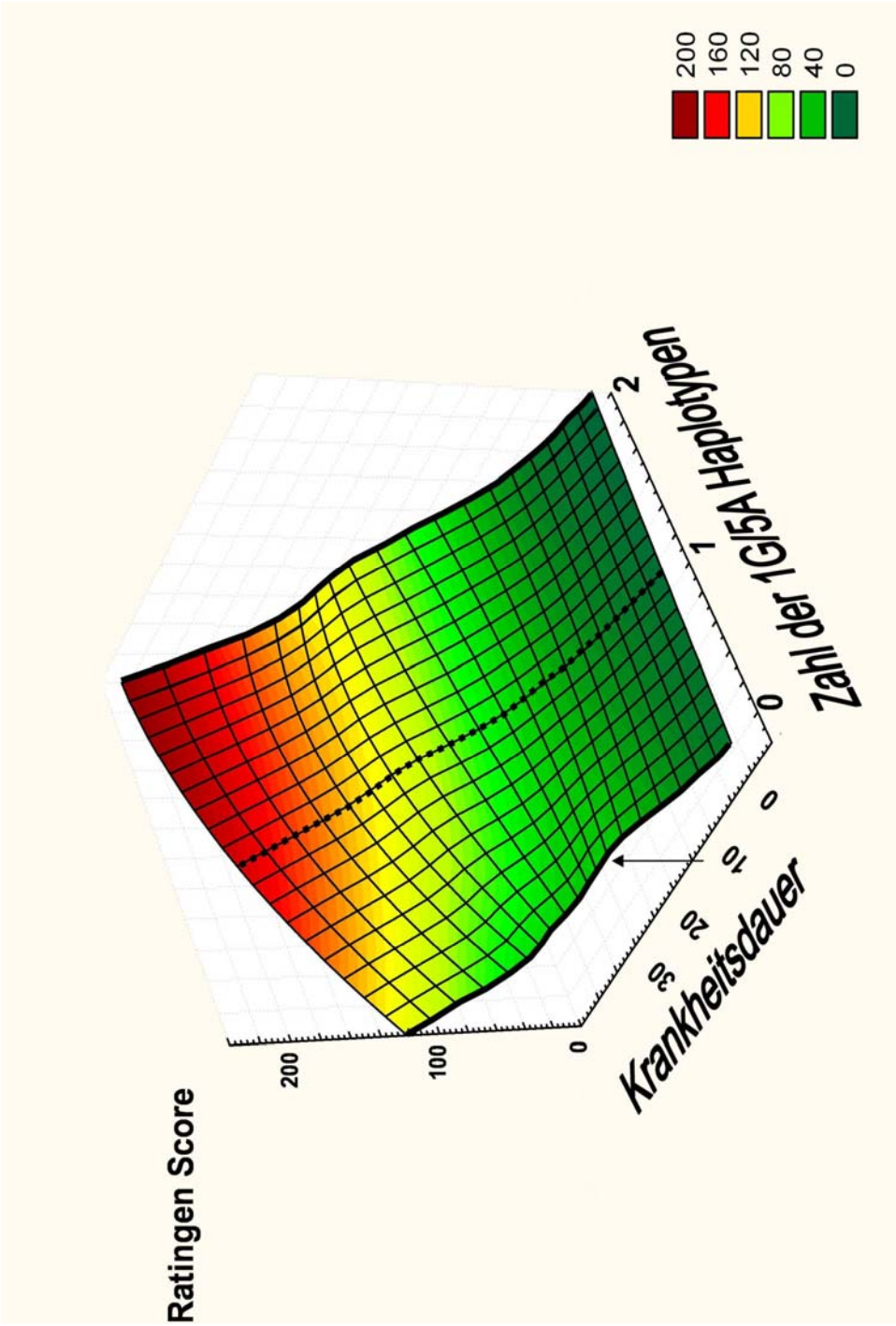


Abbildung 1: 3D-Oberflächen Diagramm mit dem Ratingenscore in Abhängigkeit der Krankheitsdauer und der Zahl der 1G- 5A Haplotpyen. Die schwarzen Linien repräsentieren Patienten mit null, einem oder zwei 1G-5A Haplotpyen. Die unterbrochene Linie zeigt Patienten mit einem 1G-5A Haplotyp als Näherungswert, da die exakte Zahl nicht berechnet werden kann. Der Pfeil zeigt den maximalen Anstieg des Ratingenscores nach 15 Jahren RA bei Patienten ohne 1G-5A Haplotyp.(Diagramm von Prof. Mueller-Mysok erstellt.)

3.4.2 Zeitabhängiger Verlauf des Ratingenscores in Abhängigkeit der Genotypen

Die Analyse des ***1G-5A***-Haplotyps zeigte einen phasischen Verlauf bezüglich des Krankheitsverlaufes der rheumatoiden Arthritis, gemessen am Ratingenscore. So weisen Patienten ohne den***1G-5A*** Haplotyp einen deutlich progredienteren Verlauf der RA in den ersten Erkrankungsjahren auf. Das Maximum ist nach 15 Jahren erreicht. Im Vergleich dazu entwickeln die für den ***1G-5A*** Haplotyp homozygoten Patienten erst nach 15 Jahren einen Verlauf der RA mit ausgeprägter Knochen-und Gelenkzerstörung (Abb.14).

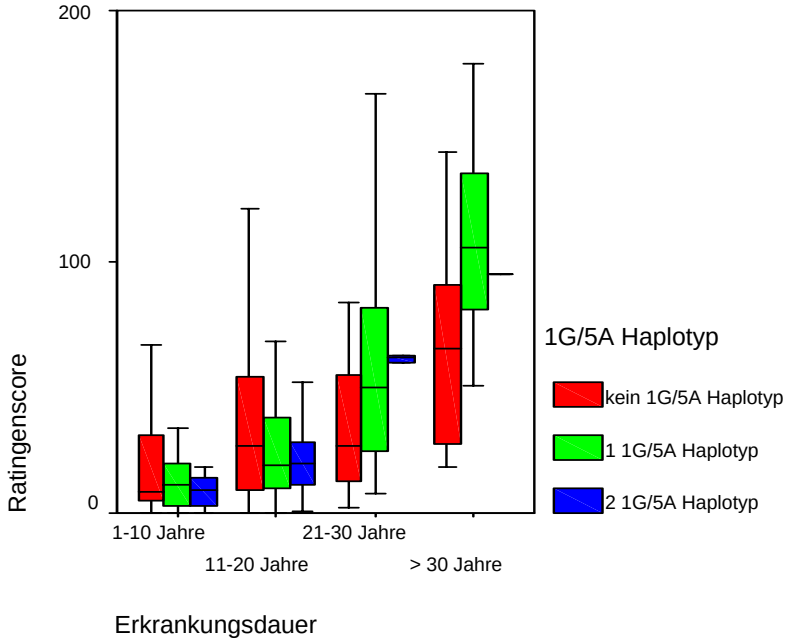


Abbildung 1: 1G/5A-Haplotyp in Abhängigkeit von der Erkrankungsdauer und dem Ratingenscore

3.5 Ergebnisse der Analyse des *MMP-1 C/T*- Polymorphismus

Der MMP-1 C/T-Polymorphismus konnte bei 301 Patienten sowie bei 106 Kontrollen bestimmt werden (siehe Tabelle 12).

In der Analyse des MMP-1 C/T-Polymorphismus tritt das T-Allel hochsignifikant häufiger auf als das C-Allel ($p<0.0001$). Dies trifft sowohl für die Kontrollen, als auch für die Patienten zu. Entsprechend zeigt sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Allelverteilung zwischen Patienten und Kontrollen ($p<0,626$).

Im Vergleich der Genotypen zwischen Kontrollen und Patienten, weisen 0.9% der Kontrollen gegenüber 6.6% der Patienten den homozygoten C/C-Genotyp auf. Homozygot für das T-Allel sind 61.1% der Kontrollen und 63.5% der Patienten. Der C/C-Genotyp tritt bei den Patienten signifikant häufiger auf als bei den Kontrollen ($p<0.027$).

Innerhalb der Patientengruppen zeigen sich keine signifikanten Genotypenverteilungen.

Tabelle 1: MMP-1 C/T Polymorphismus

	Kontrollen		RA Gesamt		Milde RA		Schwere RA	
Allele	**absolut**	**%**	**absolut**	**%**	**absolut**	**%**	**absolut**	**%**
C	42	19,8	130	21,6	65	20	106	23,5
T	170	80,2	472	78,4	261	80	211	76,5
Gesamt	212	100	602	100	326	100	317	100
Genotypen								
C/C	1	0,9	20	6,6	12	7,3	8	5,8
C/T	40	38	90	29,9	41	25,2	49	35,5
T/T	65	61,1	191	63,5	110	67,5	81	58,7
Gesamt	106	100	301	100	163	100	138	100

3.5.1 *C/T* Polymorphismus in Abhängigkeit vom Geschlecht

Bei den 330 Frauen (245 Patienten und 85 Kontrollen) und 76 untersuchten Männern (55 Patienten und 21 Kontrollen) zeigte sich eine ausgeglichene Genotypenverteilung des ***MMP-1 C/T***-Polymorphismus (siehe Tab.13).

Tabelle 2: MMP-1 C/T-Polymorphismus in Abhängigkeit des Geschlechts

		Patienten				Kontrollen			
MMP-1 C/T		**Männer**	**%**	**Frauen**	**%**	**Männer**	**%**	**Frauen**	**%**
Allelverteilung	**C**	21	19	108	22	8	19	34	20
	T	89	81	382	78	34	81	136	80
	Gesamt	110	100	490	100	42	100	170	100
Genotypen	**C/C**	4	7.3	16	6.5	0		1	1.2
	C/T	13	23.3	76	31	8	38.1	32	37.6
	T/T	38	69.1	153	62.5	13	61.9	52	61.2
	Gesamt	55	100	245	100	21	100	85	100

3.5.2 *MMP-1 C/T*-Polymorphismus und das SE in Abhängigkeit der Genotypen

Bei 112 Patienten wurde das SE bestimmt, hier wiesen 64.3% das SE auf. Im exakten Test nach Fisher zeigt sich keine Assoziation zwischen den ***MMP-1 C/T***-Genotypen und dem SE.

Tabelle 3: MMP-1 *C/T*-Polymorphismus und das SE

	Patienten			
	Shared epitope		Kein Shared epitope	
MMP-1 C/T	**absolut**	**%**	**absolut**	**%**
C/C	3	4.2	3	7.5
C/T	19	26.4	11	27.5
T/T	50	69.4	26	65
Gesamt	72	100	40	100
Leichte RA				
C/C	1	3.3	2	8.3
C/T	5	16.7	7	29.2
T/T	24	80	15	62.5
Gesamt	30	100	24	100
Schwere RA				
C/C	2	4.8	1	6.2
C/T	14	33.3	4	25
T/T	26	61.9	11	68.8
Gesamt	42	100	16	100

3.6 Ergebnisse der Analyse des *MMP-1 A/T*-Polymorphismus

Der ***MMP-1 A/T***-Polymorphismus konnte bei 295 Patienten und 62 Kontrollen bestimmt werden (siehe Tab.15).

Der ***MMP-1 A/T***-Polymorphismus zeigt eine leichte Häufung der ***T***-Allele sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Patientengruppen. Dies spiegelt sich auch in der Genotypenverteilung wieder. Ein statistischer Vergleich zwischen Patienten und Kontrollen sowie zwischen den unterschiedlich schwer erkrankten Patienten wies nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz eine ausgeglichene Genotypenverteilung auf.

Tabelle 4: Allel und Genotypenverteilung des MMP-1 *A/T*-Polymorphismus

MMP-1 A/T	Kontrollen		RA-Gesamt		Milde RA		Schwere RA	
Allele	**absolut**	**%**	**absolut**	**%**	**absolut**	**%**	**absolut**	**%**
A	50	40	260	44,1	147	46,5	113	41,2
T	74	60	330	55,9	169	53,5	161	58,8
Gesamt	124	100	590	100	316	100	274	100
Genotypen								
A/A	11	17,7	58	19,7	33	20,9	25	18,2
A/T	28	45,2	144	48,8	81	51,3	63	46
T/T	23	37,1	93	31,5	44	27,8	49	35,8
Gesamt	62	100	295	100	158	100	137	100

3.6.1 *MMP-1 A/T*-Polymorphismus in Abhängigkeit vom Geschlecht

Die Genotypen- und Allelverteilung des ***MMP-1 A/T*** Polymorphismus zeigt ein ausgewogenes Verhältnis in Abhängigkeit des Geschlechts. Auch in den Subgruppen der Patienten, den leicht und schwer Kranken zeigte sich keine signifikante Assoziation bezüglich der Geschlechtszugehörigkeit und des Genotypen.

Tabelle 5: *MMP-1 A/T*-Genotypen und Allelverteilung zwischen Patienten und Kontrollen in Abhängigkeit vom Geschlecht

		Patienten				Kontrollen			
MMP-A/T		**Männer**		**Frauen**		**Männer**		**Frauen**	
Allelvertei-lung	**A**	47	42.7	213	44.5	6	42.8	44	40
	T	63	57.3	265	55.5	8	57.2	66	60
	Gesamt	110	100	478	100	14	100	110	100
Genotypen	**A/A**	8	14.5	50	21	1	14.3	10	18.2
	A/T	31	56.4	113	47.2	4	57.1	24	43.6
	T/T	16	29.1	76	31.8	2	28.6	21	38.2
	Gesamt	55	100	239	100	7	100	55	100

3.6.2 *MMP-1 A/T*-Polymorphismus in Abhängigkeit vom SE

Es zeigt sich keine Korrelation eines ***MMP-1 A/T***-Genotyp, dem SE und der Schwere der Erkankung

Tabelle 6: MMP-1 A/T Polymorphismus in Abhängigkeit vom Shared epitope

	Shared epitope		Kein Shared epitpope	
MMP-1 A/T	**Absolut**	**%**	**Absolut**	**%**
A/A	15	20.8	4	10
A/T	37	51.4	27	76.5
T/T	20	27.8	9	22.5
Gesamt	72	100	40	100
Leichte RA				
A/A	6	20	3	12.5
A/T	17	56.7	15	62.5
T/T	7	23.3	6	25
Gesamt	30	100	24	100
Schwere RA				
A/A	9	21.4	1	6.3
A/T	20	47.6	12	75
T/T	13	31	3	18.8
Gesamt	42	100	16	100

3.7 Vergleich des *MMP-1 C/T* und *MMP-1 A/T*- Polymorphismus

Da beide Polymorphismen in unmittelbarer Nähe zueinander liegen (siehe Abb.8), wurde ermittelt, ob ein linkage Disequlibrium zwischen diesen beiden Polymorphismen besteht.

Tabelle 7: *MMP-1 C/T*-Polymorphismus in Abhängigkeit des *MMP-1 A/T* Polymorphismus bei Patienten und Kontrollen

	MMP 1 A/T bei Patienten						**Kontrollen MMP 1 A/T**					
	A/A		**A/T**		**T/T**		**A/A**		**A/T**		**T/T**	
MMP 1	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%
C/C	1	1.7	7	4.9	12	13.2	0	0	0	0	1	4.3
C/T	10	17.2	41	28.5	36	39.6	3	27.3	9	32.1	13	56.5
T/T	47	81	96	66.7	43	47.3	8	72.7	19	67.9	9	39.1
Gesamt	58	100	144	100	91	100	11	100	28	100	23	100

Ein Vergleich beider Polymorphismen mittels des ``Exakten Tests nach Fisher“ zeigte sich in der Patientengruppe eine hochsiginifikante Assoziation (p<0.0001). Diese Assoziation bezieht sich höchst wahrscheinlich auf den Haplotypen ***T (MMP-1 C/T)-A(MMP-1 A/T)***. Innerhalb der Kontrollgruppe welche aus technichen Gründen nur aus 63 Personen bestand, zeigt sich bei geringen Fallzahlen kein signifikant gehäuftes Auftreten eines Haplotypen (p=0.114). Es zeigt sich jedoch eine deutliche Tendenz, dass auch in dieser Gruppe der ***T(MMP-1 C/T)-A(MMP-1 A/T)*** Haplotyp gehäuft auftritt. Eine exakte Aussage ist aufgrund der kleinen Fallzahl der Kontrollen und aufgrund des Unsicherheitsfaktors bezüglich der heterozygoten Haplotypenbildung nicht möglich. Hierfür fehlten die spezifischen technischen Mittel für die weitere Analyse.

In Abhängigkeit der Erkrankungsschwere zeigte sich innerhalb der Gruppe der leicht Erkrankten eine signifikante Häufung des ***T (C/T)-A(A/T)***-Haplotypen (p=0.007). Die schwer Erkrankten wiesen keine signifikante Assoziation bezüglich der ***MMP-1 A/T*** und ***C/T***–Polymorphismen auf (p=0.068).

Tabelle 8: Genotypenvergleich zwischen MMP-1 A/T und C/T-Polymorphismus in Abhängigkeit der Erkrankungsschwere

	MMP-1A/T-Polymorphismus					
MMP-1	**A/A**		**A/T**		**T/T**	
Leichte RA	abs	%	abs	%	abs	%
C/C	1	3	5	6.2	6	14
C/T	3	9.1	20	24.7	16	37.2
T/T	**29**	**87.9**	56	69.1	21	48.8
Gesamt	33	100	81	100	43	100
Schwere RA						
C/C	0	0	2	3.2	6	12.2
C/T	7	28	21	33.3	21	42.9
T/T	18	72	40	63.5	22	44.9
Gesamt	25	100	63	100	49	100

3.7.1 *MMP-1 A-T*-Haplotyp in Abhängigkeit der Erkrankungsdauer

Es zeigte sich kein signifikant häufigeres Auftreten des ***A-T*** Haplotyps in Abhängigkeit der Erkrankungsdauer oder schwere der RA (Abb.15).

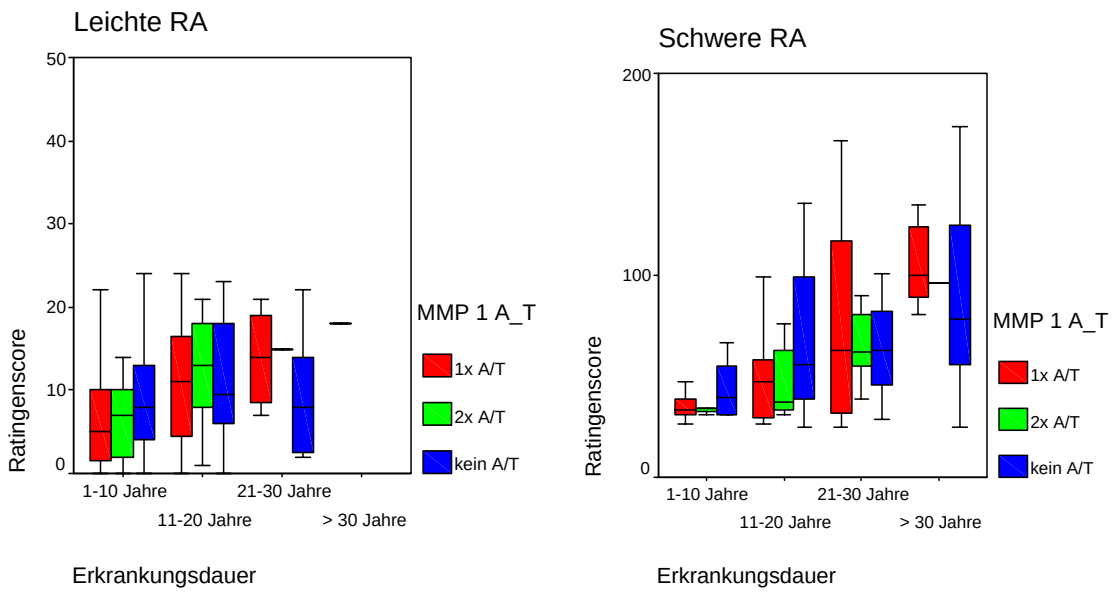


Abbildung 2: Auftreten des *A-T* Haplotpys in Abhängigkeit der Erkankrankunsdauer und Schwere in Form von Boxplots.

3.7.2 Vergleich des *MMP-1 A/T*-Polymorphismus mit dem *MMP-3 5A/6A*-Polymorphismus

Es zeigt sich keine signifikante Assoziation zwischen den Genotypen des ***MMP-1 A/T*** und ***MMP-3 5A/6A*** Polymorphismus

Tabelle 9:MMP-1 *A/T*-Polymorphismus versus MMP-3 *5A/6A*-Polymorphismus

	MMP 3 5A/6A bei Patienten						**Kontrollen MMP 3 5A/6A**					
	5A/5A		**5A/6A**		**6A/6A**		**5A/5A**		**5A/6A**		**6A/6A**	
MMP 1	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%
A/A	19	24.7	29	20.7	10	13	3	33.3	6	17.1	2	11.1
A/T	40	51.9	68	48.6	36	46.8	4	44.4	16	45.7	8	44.4
T/T	18	23.4	43	30.7	31	40.2	2	22.2	13	37.1	8	44.4
Gesamt	77	100	140	100	77	100	9	100	35	100	18	100

3.7.3 Vergleich der Ergebnisse des *MMP-1 A/T*-Polymorphismus mit dem *MMP-1 1G/2G*-Polymorphismus

Sowohl bei den 294 ausgewerteten Patienten, als auch bei den 62 Kontrollen zeigte sich eine hochsignifikante Häufung des ***MMP-1 A/A***-Genotyps mit dem homozygoten ***1G***-Genotyp zum Haplotypen ***MMP-1 A(A/T)-1G(1G/2G)***. Ebenso war eineHäufung des ***T(A/T)-2G(1G/2G)-***Haplotypen (p<0.000) bei den Kontrollen und bei beiden Patientengruppen zu beobachten (Abb.16,17).

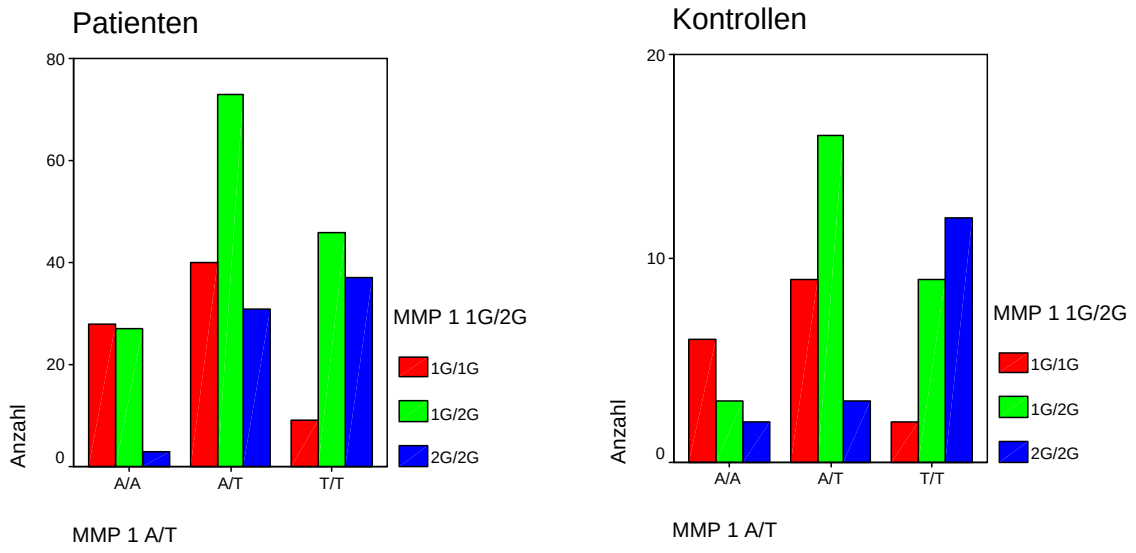


Abbildung 3: Genotypenverteilung bei Patienten und Kontrollen der MMP-1 1G/2G und MMP-1 A/T-Polymorphismen. Mit singifikanter Häufung des MMP-1 A(A/T)-1G(1G/2G) und T(A/T)-2G(1G/2G)-Haplotypen bei Patienten und Kontrollen.

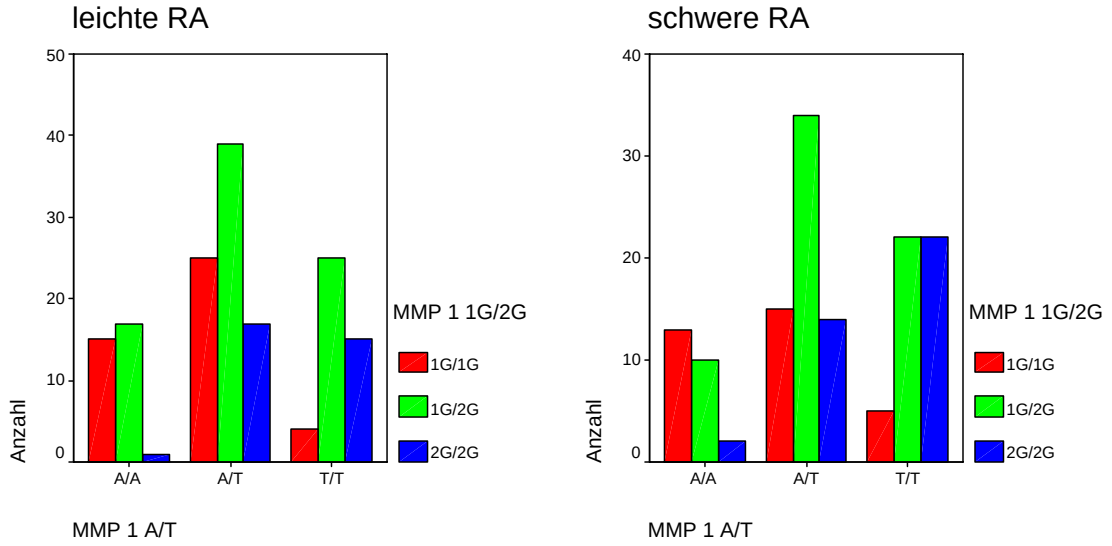


Abbildung 4: Genotypenverteilung bei schwer und leicht erkrankten Patienten mit den MMP-1 1G/2G und MMP-1 A/T-Polymorphismen. Mit signifikanter Häufung des MMP-1 A(A/T)-1G(1G/2G) und T(A/T)-2G(1G/2G)-Haplotypen bei schwer und leicht erkranten Patienten.

3.8 Vergleich der Ergebnisse des *MMP-3 5A/6A*-Polymorphismus mit dem *MMP-1 C/T* Polymorphismus

Ein Vergleich der Genotypen des ***MMP-3 5A/6A***-Polymorphismus versus dem ***MMP-1 C/T***-Polymorphismus zeigte keine signifikanten Assoziationen zwischen Patienten und Kontrollen.

Tabelle 10: MMP-1 C/T-Polymorphismus versus MMP-3 5A/6A -Polymorphismus

	MMP 3 5A/6A bei Patienten						**Kontrollen MMP 3 5A/6A**					
	5A/5A		**5A/6A**		**6A/6A**		**5A/5A**		**5A/6A**		**6A/6A**	
MMP 1	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%
C/C	5	6.5	11	7.7	4	5.3	/	/	1	1.9	/	/
C/T	21	27.3	36	25.2	30	39.5	7	28	21	40.4	12	41.4
T/T	51	66.2	96	67.1	42	55.3	18	72	30	57.7	17	58.6
Gesamt	77	100	143	100	76	100	25	100	52	100	29	100

3.8.1 Vergleich der Genotypen des *MMP-3 5A/6A*-Polymorphismus mit dem *MMP-1 C/T*-Polymorphismus in Abhängigkeit der Erkrankungsschwere

Ein Genotypenvergleich des ***MMP-3 5A/6A***-Polymorphismus mit dem ***MMP-1 C/T***-Polymorphismus in Abhängigkeit der Erkrankungsschwerere weist keine signifkanten Unterschiede auf (siehe Abb.18).

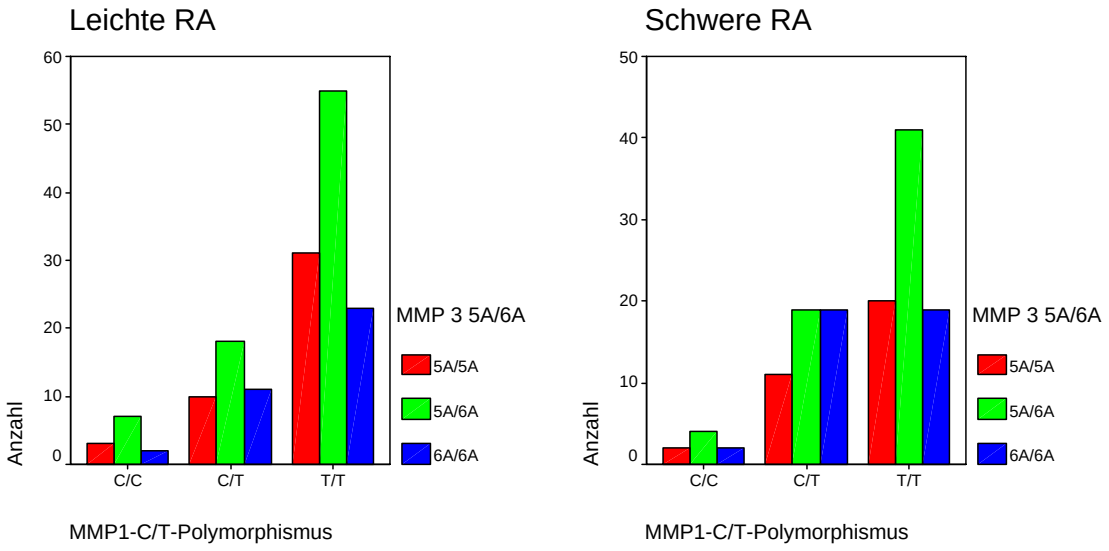


Abbildung 5: Genotyptenvergleich zwischen MMP-3 5A/6A und MMP-1 C/T-Polymorphismus in Abhängigkeit der Erkrankungsschwere.

3.8.2 Genotypenvergleich des *MMP-1 C/T* Polymorphismus mit dem *MMP-1 1G/2G*-Polymorphismus

Die Analyse der ***MMP-1 C/T*** und ***1G/2G***-Polymorphismen zeigte innerhalb der Patientengruppe eine signifikante Assoziation des ***MMP-1 T/T***-Genotyps mit dem ***MMMP-1 1G/1G***-Genotyp (p=0.003). In der Kontrollgruppe zeigt sich nach dem exakten Fisher Test keine signifikante Assoziation bei fehlenden Werten für den ***C/C-1G/1G*** und ***C/C-1G/2G*** Genotyp. (Tab.22)

Tabelle 11: Analyse des *MMP-1 C/T* mit dem *MMP-1 1G/2G*-Polymorphismus

	MMP 1 1G/2G bei Patienten						**Kontrollen MMP 1 1G/2G**					
	1G/1G		**1G/2G**		**2G/2G**		**1G/1G**		**1G/2G**		**2G/2G**	
MMP 1	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%
C/C	2	2.5	9	6.2	9	12.7	/	/	/	/	1	4.5
C/T	15	19	45	30.8	27	38	9	27.3	22	43.1	9	41
T/T	62	78.5	92	63	35	49.3	24	72.7	29	56.9	12	54.5
Gesamt	79	100	146	100	71	100	33	100	51	100	22	100

In Abhängigkeit der Erkrankungschwere zeigt sich eine signifikante Assoziation zwischen beiden Polymorphismen. In der Gruppe der schwer Erkrankten zeigte sich eine signifikante Häufung des ***2G/2G***-und ***C/T***-Genotyps der ***MMP-1*** Polymorphismen (p=0.014).

Tabelle 12: *MMP1-C/T*-versus *1G/2G*-Polymorphismus in Abhängigkeit der Erkrankungsschwere

	MMP-1 1G/2G-Polymorphismus					
MMP-1	**1G/1G**		**1G/2G**		**2G/2G**	
Leichte RA	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
C/C	1	2,2	6	7,4	5	15,2
C/T	9	19,6	22	27,2	8	24,2
T/T	36	78,2	53	65,4	20	60,6
Gesamt	46	100	81	100	33	100
Schwere RA						
C/C	1	3	3	4,5	4	10,5
C/T	6	18,2	24	36,4	19	50
T/T	26	78,8	39	59,1	15	39,5
Gesamt	33	100	66	100	38	100

3.9 Regressionsanalyse der klinischen und laborchemischen Daten

Die faktorielle Regressionsanalyse der erhobenen klinischen und laborchemischen Parameter der Patienten (siehe Tab. 1) zeigte eine signifikante Korrelation zwischen dem Ratingenscore und dem DAS (diease activity score) mit p= 0,0001, dem CRP (p=0,0053) und dem IgM Rheumafaktor (p< 0,0001). Weder die MMP Haplotypen noch das SE korrelierten mit dem DAS oder den übrigen klinischen und laborchemischen Parametern signifikant.

3.10 Regressionsanalyse des SE

Zwischen dem shared epitope und dem Ratingen-Score zeigt sich in der faktoriellen Regression eine signifikante Korrelation (p= 0,044). Das Vorhandensein des SE erklärt 29% der Varianzen des Ratingenscores, unabhängig der Lokalisation auf DR4. Die Assoziation des SE mit der Röntgenprogression ist vergleichbar mit dem Effekt des ***1G-5A*** Haplotyps. Der direkte Vergleich zwischen SE-positiven und SE-negativen Patienten durch Nichtparametrische Tests zeigen einen höheren Ratingenscore der SE-positiven Gruppe (p=0,026). Patienten, deren SE auf HLA DR4 liegt, haben keine höhere Röntgenprogression als die SE-positive Gesamtstichprobe.

4 Diskussion

Die ***MMP*** spielen eine wichtige Rolle bei Um -und Abbauvorgängen der extrazellulären Matrix, wie der Wundheilung, Angiogenese, Morphogenese und Wachstum. Zur Wahrung eines physiologischen Gleichgewichts auf dem schmalen Grat zwischen Überexpression oder Unterproduktion sind engmaschige Kontrollmechanismen nötig. Diese erfolgen auf der Stufe der Transkription durch Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine. Die proteolytische Aktivität der ***MMP*** im Gewebe wird durch die physiologischen Inhibitoren, die TIMP 1-4, reguliert (Nagase et al., 1999). Wird dieses Gleichgewicht gestört, führt dies zu unterschiedlichen pathologischen Zuständen. So kann eine Überexpression von ***MMP*** zu einem beschleunigten Abbau von extrazellulärer Matrix führen, wie bei Arthritiden, Tumorinvasion und Metastasierung (Murphy et al., 1992; Nagase et al., 1999). Andererseits führt eine verminderte Expression von ***MMP*** zur Akkumulation von Bindegewebe, wie bei der Systemischen Sklerose. TIMP haben im Tiermodell eine starke antierosive Wirkung zeigen können (Conway et al., 1995). Ein selektiver Kollagenase-Inhibitor wurde mittlerweile klinisch getestet, wird jedoch auf Grund von Nebenwirkungen nicht zur weiteren Anwendung kommen (Close et al., 2001). Aktuell wird an weiteren spezifischen Inhibitoren der ***MMP*** geforscht (Levin et al. 2004; Rutkauskaite et al., 2004; Klimiuk et al., 2004). Daher scheint es umso wichtiger, die Polymorphismen der MMP, die einen Einfluss auf die Regulation haben und damit die Progression der RA beeinflussen können, zu untersuchen.

Als Basis für die Beurteilung der Knochen- und Gelenkerosionen der Rheumatoiden Arthritis wählten wir die Röntgenaufnahme. Röntgenaufnahmen sind besonders innerhalb der Langzeitbeobachtung für die Bewertung des Gesamtschadens und damit der Schwere der Erkrankung wichtig. Hierfür gilt die Röntgenaufnahme als Goldstandard. (Brower et al., 1990). In den meisten Studien wird der Larsen-Score oder Sharp-Score verwendet. Wir entschieden uns jedoch für den Ratingen-Score, einen 38-Gelenke umfassenden Röntgenscore, der eine bessere Verlässlichkeit und Validität aufweist als die oben genannten Scores, weil er die Progression der Gelenkzerstörung auch in höheren Stadien gut erfasst (Rau et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde der mögliche Einfluss der wichtigsten genetischen MMP-Promotorpolymorphismen auf die Schwere der RA untersucht. Im Rahmen dieser Studie wurden der ***MMP-3 5A/6A*** Promotorpolymorphismus, die ***MMP-1 1G/2G***, ***A/T*** und ***C/T***-Polymorphismen analysiert.

4.1 Der Einfluss des *MMP-3 5A/6A*-Polymorphismus auf die RA

Die Allelverteilung unter den Patienten und Kontrollen waren sowohl das ***5A-Allel*** als auch für das ***6A-Allel*** gleichmäßig. Auch zwischen Männern und Frauen zeigte sich ein homogenes Verteilungsmuster der Allele und Genotypen des ***MMP-3*** Polymorphismus.
Interessanterweise zeigt sich nicht die erwartete Assoziation des ***5A*** oder ***6A-Allels*** mit der Erkrankungsschwere, obwohl ***MMP-3*** als die wichtigste Proteinase für den Knorpelabbau gilt und noch weitere ***MMP*** aktiviert. Constantin et al. 2002 konnte zwischen dem ***6A-Allel*** des ***MMP-3 5A/6A*** Promotorpolymorphismus und der Röntgenprogression der RA eine Assoziation nachweisen (Constantin et al., 2002b). Demnach wiesen die Patienten mit einem ***6A/6A*** Genotyp eine höhere Progression zu Beginn der Studie und nach 4 Jahren auf. Diese gegensätzlichen Ergebnisse lassen sich aufgrund unterschiedlicher Studienbedingungen erklären. So bezog Constantin et al. in seine Studie ausschließlich Patienten mit einer frühen Form der RA ein, deren Krankheitsverlauf über 4 Jahre beobachtet wurde, während die RA Patienten unserer Studie mindestens 4 Jahre an RA erkrankt waren. Auch die Anzahl der einbezogenen Patienten war in unserer Studie 3-mal so hoch.
Das SE, als Marker für einen destruierenden Verlauf der RA (Weyand et al., 1992; Weyand et al., 1998; Wagner et al., 1997) weist in der von uns durchgeführten Studie keine Korrelation zu den bestimmten ***MMP-3*** Genotypen auf.

4.2 Der Einfluss des *MMP-1 1G/2G*-Polymorphismus auf die RA

Die röntgenologische Progression der RA ist abhängig von der Erkrankungsdauer, mit dem ***MMP-1*** Polymorphismus assoziiert. So wiesen Patienten die seit höchstens15 Jahren an der RA erkrankt waren, mit einem homozygoten ***2G/2G***-Typ, einen signifikant höheren Ratingen-Score (p=0.019) auf. Die Patienten mit einem ***2G/2G***-Typ weisen nicht nur eine stärkere Gelenkzerstörung, sondern zudem noch eine stärkere Progression der Erkrankung (p=0.021), verglichen mit den Patienten die homozygot für das ***1G-Allel*** waren, auf. Dauert die Erkrankung jedoch länger als 15 Jahre, so sind diese Assoziationen genau umgekehrt und gelten dann für die homozygoten ***1G-Allel***-Träger.
Dieser Befund kann dahingehend interpretiert werden, dass die Patienten mit dem ***2G/2G***-Polymorphismus eine stärkere und frühere Progression der RA aufweisen, möglicherweise bedingt durch eine höhere transkriptionale Aktivität des ***2G-Allels***. Diese erklärt sich dadurch, dass durch die Insertion eines zusätzlichen ***G***-Nukleotids in den ***MMP-1*** Promoter eine Bindungsstelle für die Ets-Transkriptionsfaktoren in der Promotorregion entsteht, welche zu einer erhöhten ***MMP-1*** Expression der Fibroblasten, Synovialzellen, Chondrozyten oder Endothelialzellen führt (Rutter et al., 1998). Wyatt et al. untersuchte die ***MMP-1*** Expression in Fibroblasten in Abhängigkeit vom ***1G/1G*** oder ***2G/2G***-Genotyp. Es konnte keine signifikant

erhöhte ***MMP-1*** Expression des ***2G***-Typs nachgewiesen werden, wohl aber eine signifikant höhere Sensibilität für Wachstumsfaktoren und Zytokine, welche wiederum zu einer höheren ***MMP-1*** Expression führten (Wyatt et al., 2002).

Eine erhöhte ***MMP-1*** Produktion trägt maßgeblich zur Degradation extrazellulärer Matrix bei und unterstützt das erosive Pannuswachstum und somit die Gelenkerosion (Tetlow et al., 1998; Keyszer et al., 1999).

Die Patienten mit einem Deletions-***1G/1G*** Genotyp weisen eine schwächere Progression in den ersten 15 Krankheitsjahren auf. Im weiteren Krankheitsverlauf jedoch zeigen Patienten mit diesem Genotyp eine stärkere Progression verglichen mit dem ***MMP-1 2G/2G***-Genotypen auf.

Diese signifikante Korrelation des **MMP-1 1G/2G** Polymorphismus und dem Ratingen Score steht im Kontrast zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Constatin et al. (Constantin et al., 2002a). In der dortigen Studie wurde über eine fehlende Assoziation zwischen dem ***MMP-1 1G/2G*** Polymorphismus und der Röntgenprogression berichtet. In dieser Studie wurden 103 Patienten einbezogen, mit einer frühen Form der RA, die über einen Zeitraum von 4 Jahren beobachtet wurden. Unsere Studie untersuchte ein Patientenkollektiv von 308 Patienten, die seit mindestens 4 bis 44 Jahren an RA erkrankt waren. Die unterschiedlichen Ergebnisse beider Studien könnten in der Quantität und Qualität unterschiedlicher Studienbedingungen begründet liegen, denn auch Massaroti et al. 2002 fand in einer kleinen Studie mit 56 Patienten, dass das ***2G-Allel*** auf einen erosiveren Verlauf der RA hinweist (Massarotti et al., 2002).

Die Hypothese, dass durch diesen Polymorphismus eine veränderte transkriptionale Antwortmöglichkeit des ***MMP-1*** Promotors auch die klinische Erscheinung der RA beeinflusst, konnte in unserer Analyse bestätigt werden.

Das ***MMP-1*** eine wichtige Rolle als prognostischer Faktor der RA spielt zeigt, dass bei Patienten mit RA die ***MMP-1*** Protein-Konzentration sowohl im Plasma als auch in der Synovialflüssigkeit erhöht ist, verglichen mit Patienten mit Osteoarthritiden. Zudem korreliert die Höhe der Konzentration in der Synovialflüssigkeit mit dem Grad der synovialen Entzündungsreaktion (Matsuno et al., 2001; Keyszer et al., 1999; Yoshihara, 1995).

4.3 Linkage Disequilibrium zwischen *MMP-1 1G/2G*- und *MMP-3 5A/6A*-Polymorphismus

In der von uns durchgeführten Arbeit konnte erstmals ein signifikantes Kopplungsungleichgewicht, ein sog. Linkage Disequilibrium, zwischen ***MMP-1 1G/2G*** und dem ***MMP-3 5A/6A***-Polymorphismus nachgewiesen werden. Ein Linkage Disequilibrium zeigt eine nicht-zufällige Assoziation eines oder mehrer Allele, in Abweichung zu ihrer nach

dem Hardy-Weinberg-Äquilibrium erwarteten Frequenz. Ein Kopplungsungleichgewicht einzelner Marker oder ganzer Haplotypen korreliert gut mit der Nähe von Genen zueinander (Jorde et al., 2000). ***MMP-1*** und ***MMP-3*** liegen auf dem langen Arm von Chromosom 11 in der 11q22.3 Region als Cluster in einer 135 kb Region zusammen mit 5 anderen ***MMP*** (Abb.19) (Pendas et al., 1996). Der Abstand beider Polymorphismen beträgt 3,765 kb (Spurr et al., 1988).

Lokalisationen der MMP

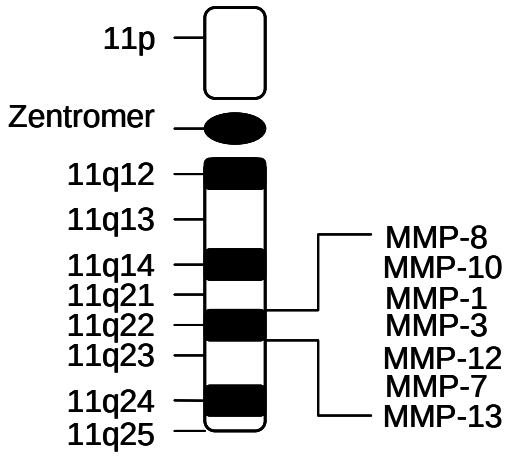


Abbildung 6: Kartierung des Chromosom 11 (modifiziert nach dem Gen Map Locus http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/185250)

Die Biologische Bedeutung dieses Linkage Disequilibrium ist noch unbekannt. Dieses Ergebnis unterstreicht jedoch die enge Wechselbeziehung beider Enzyme. So werden ***MMP-1*** und ***MMP-3*** häufig gemeinsam exprimiert und weisen ähnliche regulatorische Elemente in ihren Promotorregionen auf, wie die Ets-Bindungstelle oder AP-1 (White et al., 1997). Auch auf der Transkriptionsebene, auf der beide ***MMP*** reguliert werden, reagieren sie auf ähnliche regulatorische Elemente, wie die Aktivierung durch IL-1 oder die Aktivierung der pro-MMP durch Plasmin oder Trypsin (Quinones et al., 1989). ***MMP-3*** aktiviert zudem inaktives ***MMP-1*** und verstärkt die ***MMP-1*** Aktivität in vitro um das 12 fache (Murphy et al., 1987).

Trotz des Linkage Disequlilbriums zwischen ***MMP-1*** und ***MMP-3*** konnte kein Bezug der Polymorphismen zur Susceptibilität der RA aufgedeckt werden. Auch andere Studien konnten bisher keine ursächlichen Zusammenhänge der Erkrankung finden (Constantin et al., 2002a; Constantin et al., 2002b).

4.3.1 Bedeutung des *1G(MMP-1)-5A(MMP-3)* Haplotyps für die Gelenkerosionen der RA

Der von der mütterlichen bzw. väterlichen Seite vererbte Komplex gekoppelter Allele wird als Haplotyp bezeichnet. Der spezifische Haplotyp, welcher eine signifikante Assoziation mit dem Schweregrad der Rheumatoiden Arthritis zeigt, setzt sich aus zwei spezifischen Allelen (***1G*** und ***5A***) an zwei dimorphen gekoppelten Loci zusammen. Bei diesen dimorphen Loci handelt es sich um den ***MMP-3 5A/6A-***Promotorpolymorphismus und den ***MMP-1 1G/2G-***Polymorphismus. Diese Polymorphismen beeinflussen die biologische Aktivität des ***MMP-1*** bzw. ***MMP-3*** Gens.

Wir konnten erstmals eine signifikante Assoziation des ***1G-5A*** Haplotypen mit der Progression von Gelenkerosionen bei der Rheumatoiden Arthritis aufzeigen. Das Vorhandensein des homozygoten ***1G-5A*** Haplotypen ist mit einem protektiven Effekt bezüglich der Progression der RA für ungefähr 15 Jahre vergesellschaftet.

Diese Assoziation zwischen dem ***1G/5A*** Haplotyp und dem Ratingen Score bezüglich der Schwere der RA ist hochsignifikant und besitzt die gleiche Stärke wie die Assoziation zwischen der Schwere der RA und dem shared epitope. Interessant ist, dass die beschriebene Assoziation abhängig von der Erkrankungsdauer ist und somit einen phasischen Charakter aufweist. Dadurch haben sich zwei Patientengruppen die einen unterschiedlichen Progressionsverlauf der RA aufweisen herausgebildet. Wie das 3-D Diagramm (Abb.:14) zeigt, weisen Patienten, die keinen ***1G/5A*** Haplotypen aufweisen, eine deutliche Röntgenprogression in den frühen Jahren der RA auf, die nach ungefähr 15 Jahren wieder nachlässt. Im Gegensatz dazu steigt in der Gruppe mit 2 ***1G/5A*** Haplotypen die Röntgenprogression nach den ersten 15 Jahren beständig an. Diese zeitabhängige Assoziation ist hauptsächlich dem Einfluss des beteiligten ***MMP-1*** Polymorphismus zuzuschreiben.

Trotzdem ist der Einfluss des Linkage Disequilibriums zwischen ***MMP-1*** und ***MMP-3*** stärker als der Einfluss des ***MMP-1*** Polymorphismus alleine. Auch der wahrscheinlich deutlich schwächere Einfluss des ***MMP-3*** Polymorphismus ist bei der Interpretation dieses Linkage Disequilibrium mit einzubeziehen. Der Grund und die Bedeutung dieses Zusammenhangs sind zur Zeit noch unklar. Die Gelenkerosion ist von vielen verschiedenen Faktoren abhängig. Aus verständlichen Gründen ist es nicht möglich, die Einwirkung dieses genetischen Polymorphismus an unbehandelten Patienten zu beobachten. So zeigen Studien wie diese zum einen den Einfluss genetischer Faktoren auf die Entwicklung der RA, andererseits beziehen sie auch die DMARD Therapie mit ein. Zudem kann nur spekuliert werden, ob sich der Prozess der Gelenkzerstörung in frühen Stadien der RA von dem in der späten Phase der RA in seiner Pathophysiologie unterscheidet.

4.3.2 Die Bedeutung des *MMP-1 1G/2G* und des *MMP-3 5A/6A* Haplotyps für die RA

MMP spielen bei vielen biologischen Vorgängen und Erkrankungen eine wichtige Rolle. Da sich die ***MMP*** aufgrund ihrer Substratspezifität ergänzen, sind bei diesen komplexen pathologischen oder physiologischen Vorgängen meist verschiedene ***MMP*** gemeinsam beteiligt.

Besonders häufig wurde der Haplotyp ***1G (MMP-1)/5A (MMP-3)*** mit 36,4% und der Haplotyp ***2G (MMP-1)/6A (MMP-3)*** mit 35% gefunden, während die Haplotypen ***2G/5A*** mit 15.8% und ***1G/6A*** mit 12,8% deutlich seltener auftraten.

Erstmals konnte eine Assoziation zwischen dem ***1G/5A*** Haplotyp und der Gelenkerosion, gemessen nach dem Ratingen Score nachgewiesen werden.

Zusammenfassend sprechen unsere Ergebnisse für einen stärkeren Einfluss des ***MMP-1*** Polymorphismus auf die Röntgenprogression der RA, verglichen mit dem des ***MMP-3*** Polymorphismus. Dieses Ergebnis steht mit einer anderen Studie in Übereinkunft, die beschrieb, dass es eine Korrelation zwischen dem **MMP-1** und **MMP-3** Proteinspiegel in Patienten Seren und der Entzündungs- und Gelenkdestruktionsreaktion gab (Cunnane et al., 2001). Nur die **MMP-1** Spiegel korrelierten mit der Zahl der neuen Gelenkerosionen, nicht so die **MMP-3** Spiegel, welche eher mit den CRP Werten korrelierten. Von der Arbeitsgruppe Constatin et al. (Constantin et al., 2002b) liegen diesbezüglich keine vergleichbaren Ergebnisse vor.

Unsere Studie unterstreicht, dass die Verbindung zwischen genetischem Hintergrund und Krankheitsverlauf in verschiedenen Stadien der RA unterschiedlich ausgeprägt sein kann. Derartige Ergebnisse können nur anhand von Kohorten gewonnen werden, die über einen Zeitraum beobachtet wurden, lang genug, um die komplexe Wechselbeziehung zwischen genetischen und Umweltfaktoren darzustellen. Studien wie die unsere können helfen, neue Angriffspunkte für die Behandlung der RA-Patienten durch Proteaseinhibitoren zu finden.

4.4 Der Einfluß des *MMP-1 A/T*-Polymorphismus auf die RA

Durch die Analyse der 5`upstream Region von ***MMP-1*** entdeckte Thiry-Blaise et al. 1995 3 dimorphe Stellen oberhalb der Base -300, von denen 2 von uns untersucht wurden. Der ***MMP-1 A/T***- (-422) und der ***C/T***-Polymorphismus (-320). Die beiden Polymorphismen sind für unsere Studie deshalb so interessant, weil sich in ihrer unmittelbaren Nähe 3 wichtige, die Transkription regulierende Elemente befinden. Mutationen in unmittelbarer Umgebung dieser Regulatorregion könnten Einfluss auf die ***MMP-1*** Expression haben. Die These, dass eine Änderung der Nukleotidsequenz eine modulierende Wirkung auf die ***MMP-1*** Expression und damit auf die Schwere der RA haben könnte, konnte von uns nicht nachgewiesen werden. Die Allel- und Genotypenverteilung des ***MMP-1A/T*** Polymorphismus war zwischen Patienten

und Kontrollen ausgeglichen. Auch die Subgruppen der schwer und leicht erkrankten Patienten wiesen eine stabile Allel- und Genotypenverteilung auf. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem SE, der Röntgenprogression und dem ***MMP-1 A/T*** Polymorphismus. Vorhergehende Untersuchungen dieses Polymorphismus von anderen Arbeitsgruppen sind nicht bekannt.

4.5 Einfluss des *MMP-1 C/T*- Polymorphismus auf die RA

Ein weiterer analysierter ***MMP-1*** Promotorpolymorphismus ist der ***C/T*** Polymorphismus, der in der von Thiry-Blaise et al. 1995 beschriebenen Region bei der Base -320 liegt (Abb.23). Sowohl die 301 Patienten als auch die 106 Kontrollen wiesen in der Analyse des ***MMP-1 C/T*** Polymorphismus eine hochsignifikante Häufung des ***T-Allels*** auf ($p< 0.0001$). Das ***T- Allel*** scheint somit in der Bevölkerung generell häufiger vorzukommen. Der Genotypenvergleich zeigte jedoch ein signifikant häufigeres Auftreten des homozygoten ***C/C***-Genotyps bei RA Patienten($p< 0.027$). Es könnte daher also eine Assoziation zwischen dem Auftreten des ***C/C***-Genotyps und der RA zu geben. Interessanterweise gibt es keine Assoziation dieses Polymorphismus mit der Krankheitsschwere. Der ***MMP-1 C/T*** Polymorphismus liegt in unmittelbarer Nähe zweier cis-Elemente, welche unter anderem die Transkription des ***MMP***-Gens kontrollieren. An die Bindestelle für den AP-1 Faktor bindet das AP-1 Protein, ein Proteindimer aus Fos und Jun, den Produkten der Gene c-Fos und c-Jun. (Knippers et al., 2001) Ein weiteres Regulationselement ist das wenig bekannte PEA 3 Element, dessen Wirkungsweise nicht genau geklärt ist. Diese beiden Bindungstellen, sowie die TATA-Box liegen in unmittelbarer Nähe zum ***MMP-1 C/T*** Polymorphismus. (Thiry-Blaise et al., 1995; Mauviel et al., 1993) Der homozygote ***C/C***-Genotyp, könnte die eben beschriebenen Regulationsmechanismen beeinflussen. So könnte eine höhere ***MMP-1*** Expression zur Verstärkung von Matrixabbau und Knochenerosion führen. Da der Polymorphismus jedoch nicht mit der Schwere der RA assoziiert ist, bleibt diese Schlussfolgerung Spekulation. Hinweise, dass ***MMP1*** autoimmunologische Mechanismen, die als auslösend für die RA angesehen werden, beeinflussen könnte, finden sich in der Literatur nicht.

4.6 Die Bedeutung des *MMP-1 A/T* und *C/T* Haplotyps für die RA

Aufgrund der unmittelbaren Nähe der beiden Polymorphismen zueinander wurde geprüft, ob zwischen ihren Haplotypen und der Schwere der RA ein Zusammenhang besteht. Der nur 102 bp vom ***C/T*** Polymorphismus entfernt liegende ***MMP-1 A/T*** Polymorphismus, der den gleichen regulatorischen Kontrollmechanismen unterliegt, weist eine signifikante Assoziation

mit dem ***C/T*** Polymorphismus auf (p<0.0001). Diese Assoziation bezieht sich am ehesten auf den Haplotypen ***T (C/T)-A(A/T).***

In der aus technischen Gründen reduzierten Kontrollgruppe von 63 Personen zeigt sich dagegen keine signifikante Haplotypenbildung (p=0.114). Weiterhin scheint sich abzuzeichnen, dass der vermutete ***MMP-1 T (C/T)-A(A/T)*** Haplotyp in der Gruppe der leicht Kranken signifikant gehäuft auftritt (p=0.007), besonders in den ersten 10 Erkrankungsjahren (p=0.022). Aufgrund der relativ kleinen Kontrollgruppe sind zu diesem Polymorphismus weitergehende Untersuchungen notwendig.

4.7 Die Bedeutung des *MMP-1 A/T* und *1G/2G* Haplotyps für die RA

Es wurde getestet, ob der für die Schwere der RA bedeutsame ***MMP-1 1G/2G*** Polymorphismus in Zusammenhang mit dem ***MMP-1 A/T*** Polymorphismus steht. Sowohl in der Patientengruppe (n=294), als auch in der Kontrollgruppe (n=62) zeigte sich eine signifikante Häufung des ***MMP-1 A(A/T)-1G(1G/2G)*** Haplotypen (p<0.000). Umgekehrt proportional hierzu wiesen sowohl Kontrollen als auch Patienten eine signifikante Häufung des ***T(A/T)-2G(1G/2G)*** Haplotypen (p<0.000) auf. Da die Häufung beider Haplotypen sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Patienten auftritt, kann nicht davon ausgegangen werden, dass diese Haplotypen einen Einfluß auf die RA haben.

4.8 Andere genetische Polymorphismen in Assoziation mit der Inzidenz und Schwere der RA

Die Analyse der ***MMP*** Promotorpolymorphismen hat gezeigt, dass auf molekulargenetischer Ebene ein Polymorphismus bzw. ein daraus entstehender Haplotyp signifikant mit der Progression der RA assoziiert sein kann, wobei der genaue Mechanismus noch unbekannt ist. Die Regulation der ***MMP*** erfolgt auf der Stufe der Transkription und wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Zu den wichtigsten Faktoren gehören die Zytokine wie TNF-α, Il-1, Il-4, Il-6 und Il-10 und ihre Rezeptoren. Polymorphismen dieser Gene könnten für die Krankheitsentstehung und den Progress der RA von Bedeutung sein. TNF-α führt zur Induktion der Il-1 und -6 Bildung, der Makrophagenaktivierung, der Apoptose sowie der Aktivierung der ***MMP***. TNF-α vermittelt seine Wirkung auf zellulärer Ebene durch zwei spezifische Zelloberflächenrezeptoren R1(p55) und R2(p75). Beide Rezeptoren weisen eine lösliche und eine membrangebundene Form auf. TNF-R1 führt neben der Aktivierung von Kinasen zur Apoptose. TNF-R2 aktiviert Nuklear Faktor kappa B (NFκB) als Schlüsselfaktor für die transkriptionelle Hochregulation proinflammatorischer Zytokine (Bazzoni et al., 1996). In den letzten Jahren wurden 12 TNFα- Polymorphismen entdeckt und analysiert, ebenso einige TNFα-Rezeptorpolymorphismen (Zeggini et.al., 2002). In zahlreichen Studien zur Assoziation der TNFα- Polymorphismen mit der Inzidenz und Schwere der RA, zeigten sich

widersprüchliche Ergebnisse (Field; 2001; Zeggini et.al., 2002; Allen, 1999). Einige Arbeitsgruppen konnten signifikante Assoziationen zwischen TNFα-Polymorphismen und der Schwere der RA nachweisen (Brinkman et al., 1997; Cvetkovic et al., 2002; van Krugten et al., 1999; Waldron-Lynch et al., 2001). In den meisten Studien jedoch konnten diese Assoziationen nicht nachgewiesen werden (Barton et al., 2004; Seki et al., 1999; Vinasco et al., 1997; Yen et al., 2001; Brinkman et al., 1997; Lacki et al., 2000; Field et al., 1997; Low et al., 2002). Neben unterschiedlichen Studienbedingungen ist eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse, dass die TNFα- Polymorphismen keine eigenen funktionalen Effekte aufweisen, sondern dass diese nur im Zusammenhang mit dem Linkage Disequilibrium mit dem HLA-Allelen stehen. Das HLA-DR4 Allel ist signifikant mit der Inzidenz, der Schwere der RA und einer höheren TNFα-Produktion assoziiert (Bouma et al., 1996; Ota et al., 2001). Polymorphismen des TNF 1 Rezeptors zeigen keine Assoziation mit der Inzidenz der RA (Miterski et al.2004; Barton et al., 2001). Es besteht aber eine Assoziation zwischen dem TNF-Rezeptor II und der RA (Barton et al., 2001; Dieude et al., 2002).

Signifikante und nicht signifikante Assoziationen sämtlicher Polymorphismen von ***MMP***, Zytokinen, Chemokinen und deren Rezeptoren sind einzeln und im Zusammenhang zu analysieren ob eine Wirkung auf die Transkriptionsleistung in der Entzündungskaskade der RA vorliegt. Die Wirkung der Haplotypen auf die Inzidenz und Schwere der RA wird in Zukunft helfen diese multifaktorielle Erkrankung besser zur verstehen und individuelle Therapiekonzepte einzusetzen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der ***MMP-1 1G/2G*** Promotorpolymorphismus mit der Progression der RA in Abhängigkeit von der Erkrankungsdauer assoziiert ist. So weisen Patienten, die homozygote ***2G***-Allelträger sind, in den ersten 15 Erkrankungsjahren eine stärkere Progression auf, während homozygote ***1G***-Allelträger nach 15 Jahren ein deutliches Fortschreiten der RA aufweisen. Das ***2G***-Allel führt auf der Transkriptionsebene zu einer höheren Sensibilität für Zytokine und Wachstumsfaktoren und kann so möglicherweise für das Fortschreiten der RA in den ersten Krankheitsjahren verantwortlich sein.

Die Analyse des ***MMP-3 5A/6A*** Polymorphismus zeigte keine Assoziation mit der Erkrankungsschwere der RA.

Weitere Analysen der in unmittelbarer Nachbarschaft liegenden Polymorphismen auf dem langen Arm von Chromosom 11 konnten erstmals ein Linkage Disequilibrium zwischen dem ***MMP-1 1G/2G*** und ***MMP-3 5A/6A*** Polymorphismus zeigen. Darüberhinaus wurde die

Assoziation des ***1G-5A*** Haplotypen mit der Progression der RA in Abhängigkeit der Erkrankungsdauer nachgewiesen. Der ***1G-5A*** Haplotyp ist mit einem protektiven Effekt bezüglich der Progression der RA in den ersten 15 Jahren assoziiert. Diese hochsignifikante Assoziation ist in ihrer Bedeutung mit der Assoziation des SE und der Schwere der RA gleichzusetzen.

Es zeigt sich, dass die Verknüpfung eines Haplotypen mit der Röntgenprogression stärker ist als der einzelner Polymorphismen und dass dieser Einfluß von der Krankheitsphase abhängig sein kann.

MMP- Gene sind damit wertvoll für prognostische Aussagen zum Krankheitsverlauf. Die verbesserten Möglichkeiten der Analyse von multiplen Polymorphismen mittels Chip-Technologie werden in den nächsten Jahren noch weitere Gene identifizieren, die ähnliche prognostische Eigenschaften besitzen. Dennoch werden genetische Analysen für den einzelnen Patienten nur einen Teil der Prognose vorhersagen können, da therapeutische und möglicherweise auch Umweltfaktoren den Verlauf nachhaltig verändern können.

6 Literaturverzeichnis

Aho K, Koskenvuo M, Tuominen J, Kaprio J:
Occurence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins.
J Rheumatol 13 (1986) 899-902

Albani S, Carson DA, Roudier J, :
Genetic and enviromental factors in the immune pathogenesis of rheumatoid arthritis.
In: Rheumatic disease clinics of North America.
Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo (1992) S. 719-728

Allen RD:
Polymorphism of the human TNFα promotor-random variation or functional diverstity?
Mol Immunol 36 (1999)1017-1027

Arnett FC, Edworthy SM, et al.:
The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum 31 (1988) 315-324.

Baas F, Bikker H, van Ommen GJB, de Vijlder JJM:
Unusual scarcity of restriction site polymorphism in the human thyroglobulin gene. A linkage study suggesting autosomal dominance of a defective thyroglobulin allele.
Human Genet 67 (1984) 301-305

Barton A, John S, Ollier WER, Silman A, Worthington J:
Association between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor II, but not tumor necrosis factor I, in Caucasians.
Arthritis Rheum. 44 (2001) 61-65

Barton A, Platt H, Salway F, Symmons D, Barret E, Bukari M, Lunt M, Zeggini E, Eyre S, Hinks A, Tellam D, Brintnell B, Ollier W, Worthington J, Silman A
Polymorphism in the tumor necrosis factor gene are not associated with severity of inflammatory polyarthritis.
Ann rheum Dis. 63 (2004) 280-284

Bazzoni F, Beutler B.:
The tumor necrosis factor ligand and receptor families.
N Engl. J Med. 334 (1996) 1717-1725

Bouma G, Crusius JBA, Pool MO, Kolkman JJ, con Blomberg BME, Kostense PJ et al.:
Secretion of tumour necrosis factor α and lymphotoxin α in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammmatory bowl disease.
Scand J Immunol 43 (1996) 456-463

Bläß S, Engel JM, Burmester GR:
The immunologic homunculus in rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum 42 (1999) 2499-2506

Brennan, FM, Browne, KA, et al.:
Reduction of serum matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 3 in rheumatoid arthritis patients following anti- tumour necrosis factor-alpha (cA2) therapy.
Br J Rheumatol 36(1997) 643-650

Brinkmann BM, Huizinga TW, Kurban SS, van der Velde EA, Schreuder GM, Hazes JM, Breedveld FC, Verweij CL:
Tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: assoziation with susceptibility to, or even severity of, disease ?
J Rheumatol 36 (1997) 516-521

Brower AC:
Use of radiograph to measure the course of rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum 33 (1990) 316-324

Burmester GR, Locher P, Koch B, Winchester RJ, Dimitriu-Bona A, Kalden JR,Mohr W:
The tissue architecture of synovial membranes in inflammatory and noninflammatory joint diseases.
Rheumatology Int. 3 (1983) 173-181

Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulie P, Nourhashemi F, Enault G, Abbal M, Constantin A, Laroche M, Mazieres B:
Interleukin-1 beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurence and severity of rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum 42 (1999) 1093-1100

Case JP, Lafyatis R, Remmers EF, Kumkumian GK, Wilder RL:
Transin/stromelysin expression in rheumatoid synovium. A transformation- associated metalloproteinase secreted by phenotypically invasive synoviocytes.
Am J Pathol 135 (1989) 1055-1064.

Close, DR:
Matrix metalloproteinase inhibitors in rheumatic diseases.
Ann Rheum Dis 60 (2001) 62-67

Combe B, Dougados M, Goupille P, Cantagrel A, Eliaou JF, Sibilia J, Meyer O, Sany J, Daures JP, Dubois A:
Prognostic factors for radiographic damage in early rheumatoid arthritis: a multiparameter prospective study.
Arthritis Rheum 44 (2001) 1736-1743.

Constantin A, Lauwers-Cances V, Navaux F, Abbal M, van Meerwijk J, Mazieres B, Cambon-Thomsen A, Cantagrel A:
Collagenase-1 (MMP-1) and HLA-DRB1 gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: a prospective longitudinal study.
J Rheumatol 29 (2002a) 15-20.

Constantin A, Lauwers-Cances V, Navaux F, Abbal M, van Meerwijk J, Mazieres B, Cambon-Thomsen A, Cantagrel A:
Stromelysin 1 (matrix metalloproteinase 3) and HLA-DRB1 gene polymorphisms: Association with severity and progression of rheumatoid arthritis in a prospective study.
Arthritis Rheum 46 (2002b) 1754-1762.

Conway JG, Wakefield JA, Brown RH, Marron BE, Sekut L, Stimpson SA, McElroy A, Menius JA, Jeffreys JJ, Clark RL:
Inhibition of cartilage and bone destruction in adjuvant arthritis in the rat by a matrix metalloproteinases inhibitor.
J Exp Med 182 (1995) 449-457

Cornelis F, Faure S, Martinez M, Prud´homme JF, Fritz P, Dib C, Alves H, Barrera P, de Vries N, Balsa A:
New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome-wide linkage study.
Proc. Natl Acad. Sci. USA 95 (1998) 10746-10750

Cunnane G, Fitzgerald O, Beeton C, Cawston TE, Bresnihan B:
Early joint erosions and serum levels of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 3, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum 44 (2001) 2263-2274.

Cvetkovic JT, Wallberg-Jonsson S, Stegmayr B, Rantapaa-Dahlqvist S, Lefvert AK.:
Susceptibility for and clinical manifestations of rheumatoid arthritis are associated with polymorphisms of the TNF-alpha, Il-1beta and Il-1Ra genes.
J Rheumatol. 29 (2002) 212-219

Dieude P, Petit E, Cailleau-Moindrault S, Osorio J, Pierlot C, Martinez M, Faure S, Alibert O, Lasbleiz S, De Thoma C, Bardin T, Prum B, Cornelis F, European Consortium on Rheumatoid Arthritis Families:
Association between tumor necrosis factor receptor II and familial, but not sporadic, rheumatoid arthritis: evidence for genetic heterogenety.
Arthritis Rheum. 46 (2002) 2039-2044

Fassbender HG, Gay S:
Synovial processes in rheumatoid arthritis.
Scand J Rheumatol Suppl 76 (1988) 1-7

Fehr K, Miehle W, Schattenkircher M, Tillmann K.:
Ätiologie und Pathogenese der chronischen Polyarthritis.
In: Rheumatologie in Klinik und Praxis
Georg Thieme Stuttgart, New York 1989 7.1-7.68

Field M, Gallagher G, Eskdale J, McGarry F, Richards SD, Munro R et al.:
Tumor necrosis factor locus polymorphisms in rheumatoid arthritis.
Tissue Antigens 50 (1997) 303-307

Field M:
Tumor necrosis factor polymorphisms in rheumatic diseases
QJ Med 94 (2001) 237-246

Firestein GS:
Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors?
Arthritis Rheum 39 (1996) 1781-1790.

Garrod AB.:
Treatisie on Gout
3rd ed. Walton & Maberly, London 1876

Gay S, Gay RE, Koopman WJ:
Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction ?
Ann Rheum Dis 1 (1993) 39-47

Ghilardi G, Biondi ML, Mangoni J, Leviti S, DeMonti M :
Matrix metalloproteinase-1 promotor polymorphism 1G/2G is correlated with colorectal cancer invasivness.
Clin Cancer Res 7 (2001) 2344-2346

Goronzy JJ, Weyand CM:
T cells in rheumatoid arthritis: paradigms and facts.
Rheum Dis Clin North Am 21 (1995) 655-674

Gravallese EM, Darling JM, Ladd AL, Katz JN, Glimcher LH:
In situ hybridisation studies of stromelysin and collagenase messenger RNA expression in rheumatoid synovium.
Arthritis Rheum 34 (1991) 1076-1084

Green MJ, Gough AK, Devlin J, Smith J, Astin P, Taylor D, Emery P:
Serum MMP-3 and MMP-1 and progression of joint damage in early rheumatoid arthritis.
Rheumatology (Oxford) 42 (2003) 83-88.

Gregersen PK:
Genetics of rheumatoid arthritis: confronting complexitiy.
Arthritis Res. 1 (2000) 37-44

Hardy HG.:
Mendelian proportions in a mixed population.
Science 28 (1908) 49-50

Harris ED, Kelly WN, Ruddy S, Sledge C:
Textbook of Rheumatology: Pathogenesis, clinical features and managment of rheumatoid arthritis.
3rd ed., WB Saunders, Philadelphia (1989) S.943-955

Ishiguro N, Ito T, Obata K, Fujimoto N, Iwata H:
Determination of stromelysin-1, 72 and 92 kDa type IV collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-2 in synovial fluid and serum from patients with rheumatoid arthritis.
J Rheumatol 23 (1996) 1599-1604

Ito A and Nagase H:
Evidence that human rheumatoid synovial matrix metalloproteinase 3 is an endogenous activator of procollagenase 1.
Arch Biochem Biophys 267 (1989) 211-216

Joos L, He JQ, Shepherdson MB, Connett JE, Anthonisen NR, Pare PD, Sandford AJ:
The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. Hum Mol Genet. 5 (2002) 569-76. Erratum in: Hum Mol Genet. 7 (2003):803-4.

Jorde LB:
Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes.
Genome Res 10 (2000) 1435-1444.

Kanamori Y, Matsushima M, Minaguchi T, Kobayashi K, Sagae S, Kudo R, Terakawa N, Nakamura Y:
Correlation between expression of the matrix metalloproteinase-1 gene in ovarian cancers and an insertion/deletion polymorphism in its promoter region.
Cancer Res 59 (1999) 4225-4227.

Keyszer G, Lambiri I, Nagel R, Keysser C, Keysser M, Gromnica-Ihle E, Franz J, Burmester GR, Jung K:
Circulating levels of matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1), and MMP-1/TIMP-1 complex in rheumatic disease. Correlation with clinical activity of rheumatoid arthritis versus other surrogate markers.
J Rheumatol 26 (1999) 251-258.

Khani-Hanjani A, Lacaille D, Hoar D, Chalmers A, Horsman D, Anderson M, Balshaw R, Keown PA:
Association between dinucleotide repeat in non-coding region of interferon-gamma gene and susceptibility to, and severity of, rheumatoid arthritis.
Lancet 356 (2000) 820-825.

Kingsley G, Panayi GS:
Joint destruction in rheumatoid arthritis: biological bases.
Clin Exp Rheumatol 17 (1997) 3-14

Klimiuk PA, Sierakowski S, Domyslawska J, Chwiecko J:
Effekt of repeated infliximab therapie on serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with rheumatiod arthritis.
J Rheumatol 31 (2004) 238-242

Knippers R.:
Molekulare Genetik
Georg Thieme Stuttgart, New York 2001 7-15

Konttinen YT, Ainola M, Valleala H, Ma J, Ida H, Mandelin J:
Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis.
Ann Rheum Dis 58 (1999) 691-697

Korman AJ, Boss JM, Spies T, Sorrentino R, Okada K, Strominger JL:
Genetic complexity and expression of human class II histocompatibility genes.
Immunol. Rev. 85 (1985) 45-86

Krause A, Kamrad T, Burmester GR:
Potential infecitous agents in the induction of arthritides.
Curr Opp Rheumatol 8 (1996) 203-209

Van Krykten MV, Huizinger TW, Kaijzel ER, Zanelli E, Drossers-Bakker KW:
Association of TNF +489 polymorphisms with susceptibility and radiographic damage in rheuamtoid arthritis.
Genes Immun. 1 (1999) 91-96

Laki JK, Moser R, Korczowska I, Mackiewicz S, Muller W.
TNF-alpha gene polymorphism does not affect the clinical and radiological outcome of rheumatoid arthritis.
Rheumatol Int. 19 (2000) 137-140

Lawrence JS.:
Prevalence of rheumatoid arthritis.
Ann rheum. Dis. 20 (1961) 11-17

Levin JI:
The design and synthesis of aryl hydroxamic acid inhibitors of MMPs and TACE.
Curr Top Med Chem 4 (2004) 1289-1310

Low AS, Gonzalez-Gay MA, Akil M, Amos RS, Bax DE, Cannings C, et al.:
TNF + 489 polymorphism does not contribute to sussceptibility to rheumatoid arthritis.
Clin Exp Rheumatol. 20 (2002) 829-832

MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, Silman AJ:
Characterizing the quantitatives genetic contribution to rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum 30 (2000) 1205-1213

Masi AT:
Incidence of rheumatoid arthritis: so the observed age-sex interaction pattern support a role of androgenic-anabolic steroid deficiency in its pathogenesis?
Br J Rheumatol 33 (1994) 697-699

Massarotti M, Marchesoni A, Biondi ML, Marasini B:
Polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter gene and severity of rheumatoid arthritis.
J Rheumatol 29 (2002) 2241; author reply 2242.

Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S:
Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification.
FASEB J. 12 (1998)1075-95

Matsuno H, Yudoh K, Watanabe Y, Nakazawa F, Aono H, Kimura T:
Stromelysin-1 (MMP-3) in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis has potential to cleave membrane bound Fas ligand.
J Rheumatol 28 (2001) 22-28

Mauviel A, Qiu Y, Deng W, Evans CH, Uitto J:
Transcriptonal interactions of transforming growth-factor-beta with pro-inflammatory cytokines.
Curr Biol 3 (1993) 822-831

Miehle W:
Rheumatoide Arthritis: Diagnose und Therapie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1999) S. 10-40

Migita K, Miyashita T, Ishibashi H, Maeda Y, Nakamura M, Yatsuhashi H, Ida H, Kawakami A, Aoyagi T, Kawabe Y, Eguchi K.:
Suppressive effect of leflunomide metabolite (A77 1726) on metalloproteinase production in IL-1beta stimulated rheumatoid synovial fibroblasts.
Clin Exp Immunol. 3 (2004) 612-6

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF :
A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.
Nucleic Acids Res 16 (1988) 1215

Miterski B, Drynda S, Böschow G, Klein W, Oppermann J, Kekow J, Epplen JT:
Complex genetic predisposition in adult and juvenile rheumatiod arthritis.
BMC Genetics 5 (2004) 2-16

Montgomery AM, DeClerck YA, Langley KE, Reisfeld RA, Mueller BM:
Melanoma-mediated dissolution of extracellular matrix: contribution of urokinase-dependent and metalloproteinase-dependent proteolytic pathways.
Cancer Res 53 (1993) 693-698

Murphy G and Docherty AJ:
The matrix metalloproteinases and their inhibitors.
Am J Respir Cell Mol Biol 7 (1992) 120-125.

Murphy G, Cockett MI, et al.:
Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes.
Biochem J 248 (1987) 265-268.

Nagase H and Woessner JF Jr.:
Matrix metalloproteinases.
J Biol Chem 274 (1999) 21491-21494.

Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K, Sekiya T:
Rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction.
Genomics 5 (1989) 874-879

Ota M, Katsuyama Y, Kimura A, Tsuchiya K, Kondo M, Naruse T, et al.:
A second susceptibilitiy gene for developing rheumatoid arthritis in the human MHC is localised within a 70 kb interval telomeric of the TNF genes in HLA class III region.
Genomics 71 (2001) 263-270

Pendas AM, Santamaria I, Alvarez MV, Pritchard M, Lopez-Otin C:
Fine physical mapping of the human matrix metalloproteinase genes clustered on chromosome 11q22.3.
Genomics 37 (1996) 266-268.

Posthumus MD, Limburg PC, Westra J, van Leeuwen MA, van Rijswijk MH :
Serum matrix metalloproteinase 3 in early rheumatoid arthritis is correlated with disease activity and radiological progression.
J Rheumatol 27 (2000) 2761-2768.

Powell WC, Matrisian LM:
Complex roles of matrix metalloproteinases in tumor progression
Curr Top Microbiol Immunol 213 (1996) 1-21

Quinones S, Saus J, Otani Y, Harris ED Jr, Kurkinen M:
Transcriptional regulation of human stromelysin.
J Biol Chem 264 (1989) 8339-8344.

Rau R, Wassenberg S, Herborn G, Stucki G, Gebler A:
A new method of scoring radiographic change in rheumatoid arthritis.
J Rheumatol 25 (1998) 2094-2107.

Ribbens C, Andre B, Jaspar JM, Kaye O, Kaiser MJ, De Groote D, Malaise MG :
Matrix metalloproteinase-3 serum levels are correlated with disease activity and predict clinical response in rheumatoid arthritis.
J Rheumatol 27 (2000) 888-893.

Roberts L, McColl GJ:
Tumor necrosis factor inhibiton: risks and benefits in patients with rheumatoid arthritis.
Internal Medicine Journal 34 (2004) 687-693

Rothschild B, Turner K, DeLuca MA:
Symmetrical erosive periphereal polyarthritis in the late arachaic period of Alabama.
Science 241 (1988) 1498-1502

Rutkauskaite E, Zacharias W, Schedel J, Muller-Lachner U, Mawrin C, Seemayer CA, Alexander D, Gay RE, Aicher WK, Michel BA, Gay S, Pap T:
Ribozymes that inhibit the production of matrix metalloproteinase 1 reduce the invasivness of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts.
Arthritis Rheum 50 (2004) 144-156

Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, Brinckerhoff CE:
A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription.
Cancer Res 58 (1998) 5321-5325.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA:
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science 239 (1988) 487-491

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR:
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc Natl Acad Sci U S A 74 (1977) 5463-5467

Sasaki S, Iwata H, Ishiguro N, Obata K, Miura T:
Detection of stromelysin in synovial fluid and serum from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis.
Clin Rheumatol 13 (1994) 228-233.

Seki N, Kamizono S, Yamada A, Higuchi T, Matsumoto H, Niiya F et al.:
Polymorphisms in the 5`-flanking region of tumor necrosis factor-alpha gene in patients with rheumatoid arthritis.
Tissue Antigens 54 (1999) 194-197

Shingu M, Nagai Y, Isayama T, Naono T, Nobunga M, Nagai Y:
The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells.
Clin Exp Immunol 94 (1993) 145-149

Spurr NK, Gough,AC, Gosden J, Rout D, Porteous DJ:
Restriction fragment length polymorphism analysis and assignment of the metalloproteinases stromelysin and collagenase to the long arm of chromosome 11.
Genomics 2 (1988) 119-127

Stachan T, Read AP:
Molekulare Humangenetik.
Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxfort (1996) 154-157

Stransky G, Vernon J, Aicher WK, Moreland LW, Gay RE, Gay S:
Virus-like particles in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis.
Br J Rheumatol 32(1993) 1044-1048

Tetlow LC and Wooley DE:
Comparative immunolocalisation studies of collagenase I and collagenase 3 production in the rheumatoid lesion, and by human chondrocytes and synoviocytes in vitro.
Br J Rheumatol 37 (1998) 64-70.

Thiry-Blaise LM, Taquet AN, Reginster JY, Nusgens B, Franchimont P, Lapiere CM:
Investigation of the relationship between osteoporosis and the collagenase gene by means of polymorphism of the 5'upstream region of this gene.
Calcif Tissue Int 56 (1995) 88-91.

Tomita, T, Nakase, T, et al.:
Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum 46(2002) 373-378.

van der Heijde DMFM, van Riel PL, van Leeuwen MA, van 't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB:
Prognostic factors for radiographic damage and physical disability in early rheumatoid arthritis: a prospective follow up studie of 147 patients.
Br J Rheumatol 31 (1992) 519-525

van Meurs J, van Lent P, Holthuysen A, Lambrou D, Bayne E, Singer I, van den Berg W:
Active matrix metalloproteinases are present in cartilage during immune complex-mediated arthritis: a pivotal role for stromelysin-1 in cartilage destruction.
J Immunol 163 (1999) 5633-5639.

Vinasco J, Beraun Y, Nieto A, Fraile A, Mataran L, Pareja E et al.:
Polymorphisms ath the TNF loci in rheumatoid arthritis.
Tissue Antigens 49 (1997) 74-78

Vingsbo-Lundberg C, Nordquist N, Olofsson P, Sundvall M, Saxne T, Pettersson U, Holmdahl R:
Genetic control of arthritis onset, severity and chronicity in a model for rheumatoid arthritis in rats.
Nat Genet 20 (1998) 401-404.

Wagener C.
Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumoren
2. Auflage
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York (1999) S.279-291

Wagner U, Kaltenhauser S, Sauer H, Arnold S, Seidel W, Hantzschel H, Kalden JR, Wassmuth R:
HLA markers and prediction of clinical course and outcome in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 40 (1997) 341-351.

Walakovits LA, Moore VL, Bhardwaj N, Gallickl GS, Lark MW:
Detection of stromelysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and posttraumatic knee injury.
Arthritis Rheum 23 (1992) 35-42

Waldron-Lynch F, Adams C, Amos C, Zhu DK, McDermott MF, Shanahan F et al.:
Tumor necrosis factor 5` promoter single nucleotide polymorphisms influence susceptibility to rheumatoid arthritis (RA) in immunogenetically defined mulitplex RA families.
Genes Immun. 2 (2001) 82-87

Weyand CM, Goronzy JJ:
Disease mechanisms in rheumatoid arthritis: gene dosage effect of HLA-DR haplotypes. J Lab Clin Med 124 (1994) 335-338

Weyand CM, McCarthy TG, Goronzy JJ:
Correlation between disease phenotype and genetic hertogenety in rheumatoid arthritis.
J Clin Invest 95 (1995) 2120-2126

Weyand CM, Hicok KC, Conn DL, Goronzy JJ:
The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis.
Ann Intern Med 117 (1992) 801-806.

Weyand CM, Schmidt D, Wagner U, Goronzy JJ:
The influence of sex on the phenotype of rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum 41 (1998) 817-822.

White LA, Maute C, Brinckerhoff CE:
Ets sites in the promotor of the matrix metalloproteinases collagenase (MMP-1) und Stromelysin (MMP-3) are auxiliar elements that regulate basal and phorbol-induced transcription.
Connect Tissue Res 36 (1997) 321-335

Woods R and Rothschild B:
Population analysis of symmetrical erosive arthritis in Ohio Woodland Indians.
J Rheumatol 15 (1988) 1258-1263

Wolfe F, Kleinheksel SM, Khan MA:
Familial vs sporadic rheumatoid arthritis: a comparision of the demographic and clinical characteristics of 956 Patients.
J Rheumatol 15 (1988) 400-404.

Wyatt CA, Coon CI, Gibson JJ, Brinckerhoff CE:
Potential for the 2G single nucleotide polymorphism in the promoter of matrix metalloproteinase to enhance gene expression in normal stromal cells.
Cancer Res. 24 (2002) 7200-2.

Yamanaka H, Matsuda Y, Tanaka M, Sendo W, Nakajima H, Taniguchi A, Kamatani N:
Serum matrix metalloproteinase 3 as a predictor of the degree of joint destruction during the six months after measurement, in patients with early rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum 43 (2000) 852-858.

Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM:
Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression.
J Biol Chem 271 (1996) 13055-13060.

Yen Jh, Chen CJ, Tsai WC, Lin CH, Ou TT, Wu CC et al.:
Tumor necrosis factor promotor polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis in Taiwan.
J Rheumatol 28 (2001) 1788-1799

Yoshihara Y, Obata K, Fujimoto N, Yamashita K, Hayakawa T, Shimmei M:
Increased levels of stromelysin-1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in sera from patients with rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum 38 (1995) 969-975.

Zeggini E, Thomson W, Kwiatkowski D, Richardson A, Allier W, Donn R, :
Linkage and association studies of single-nucleotide polymorphism-tagged tumor necrosis factor haplotypes in juvenile oligoarthritis.
Arthritis Rheum 46 (2002) 3304-3311

Zhu Y, Spitz MR, Lei L, Mills GB, Wu X:
A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances lung cancer susceptibility.
Cancer Res. 21 (2001) 7825-9

7 Thesen

1. Die ***Rheumatoide Arthritis*** (RA) ist eine schubweise auftretende chronisch entzündliche Gelenkerkrankung mit progredientem Krankheitsverlauf. Sie kann sich auch extraartikulär manifestieren. Die RA betrifft 1% der Weltbevölkerung.

2. ***Matrixmetalloproteinasen (MMP)*** spielen in der Entzündungskaskade der RA eine wichtige Rolle. Durch ihre proteolytische Aktivität führen sie zum Matrixabbau mit Knorpel- und Knochenzerstörung. Besonders ***MMP-1*** und ***MMP-3*** sind wichtige Kanditatengene für die Progression der RA.

3. Der ***MMP-3 5A/6A***, ***MMP-1 1G/2G***, ***MMP-1 A/T*** und ***MMP-1 C/T*** Polymorphismus wurden bei Patienten mit schwerer und leichter RA und bei Gesunden analysiert.

4. Der ***MMP-1 1G/2G***- Promotorpolymorphismus ist mit der Progression der RA in Abhängigkeit der Erkrankungsdauer assoziiert. Der ***2G/2G***-Genotyp weist in den ersten 15 Erkrankungsjahren eine stärkere Progression der RA auf. Der homozygote ***1G***-Allelträger zeigt nach 15 Erkrankungsjahren einen deutlichen Fortschritt der RA.

5. Der ***MMP-3 5A/6A***- Polymorphismus zeigt keine Assoziation mit der Erkrankungschwere der RA.

6. Es konnte erstmals ein *Linkage Disequilibrium* zwischen dem ***MMP-1 1G/2G*** und ***MMP-3 5A/6A*** Polymorphismus nachgewiesen werden. Es handelt sich um die Assoziation des ***1G-5A*** Haplotypen mit der Progression der RA.

7. Der ***1G-5A*** Haplotyp ist mit einem protektiven Effekt bezüglich der Progression der RA in den ersten 15 Jahren assoziiert. Diese hochsignifikante Assoziation ist in ihrer Bedeutung mit der Assoziation des SE mit der Schwere der RA gleichzusetzen.

8. Eine Assoziation zwischen dem ***MMP-1 A/T*** und ***MMP-1 C/T*** Polymorphismus und der Erkrankungsschwere der RA konnte nicht nachgewiesen werden.

Lebenslauf

Name:	Nadine Lechtenböhmer
Geburtsdatum,-ort:	14.01.1977 in Neuss
Familienstand	ledig
Schulausbildung	
1983-1987	Städt. Gemeinschaftsgrundschule in Krefeld-Fischeln
1987-1988	Maria-Sybilla-Merian Gymnasium in Krefeld-Fischeln
1988-1996	Städt. Gymnasium Thomaeum in Kempen
1996	Abitur
Studium	
10/1996-10/1998	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
09/1998	Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung
10/1998-10/1999	Weiterführung des Studiums an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
08/1999	1. Staatsexamen
10/1999-05/2003	Weiterführung des Studiums an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
03/2002	2. Staatsexamen
15.04.2002 bis 16.03.2003	Praktisches Jahr 1. Tertial: *Klinik für Unfallchirurgie*, Berufsgenossenschaftliche Kliniken Bergmannstrost, Halle/Saale 2. Tertial: *Klinik für Innere Medizin*, Klinik für Gastroenterologie und Rheumatologie Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 3. Tertial: *Klinik für Dermatologie und Venerologie*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
05/2003	3. Staatsexamen
Klinische Ausbildung	11/2003- 10/2004 Ärztin im Praktikum in der Berufsgenossenschaftlichen Klinik Bergmannsheil in der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie in Bochum Seit 10/2004 Assistenzärztin in der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie in der Berufsgenossenschaftlichen Klinik Bergmannsheil in Bochum

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angaben der Quellen gekennzeichnet.
Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Bochum, den 1.8.2005

Nadine Lechtenböhmer

Danksagungen

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. G. Keyßer möchte ich mich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und vor allem für sein Engagement bei dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Hansmann danke ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten des Humangenetischen Instituts, wodurch exzellente Arbeitsbedingungen bestanden, die diese Arbeit erst möglich machten.

Frau Dr. Sylvia Dörr danke ich für die ausgezeichnete Einarbeitung in die molekularbiologischen Methoden, für die Zeit, die sie sich immer nahm, wenn ich Hilfe benötigte, sowie für das angenehme Arbeitsklima im Labor.

Außerdem möchte ich allen hier nicht namentlich aufgeführten Mitarbeitern des Institutes für Humangenetik und medizinische Biologie danken, welche für meine Fragen stets ein offenes Ohr hatten.

Herrn Prof. Rau aus Ratingen danke ich für die Bereitstellung der Patientendaten, der Blutproben und der Röntgenbefundung, sowie der freundlichen Zusammenarbeit.

Für die statistische Berechnung des Linkage Disequilibriums des MMP-3 5A/6A und MMP-1 1G/2G Polymorphismus und der graphischen Darstellung sei Herrn Prof. Müller-Mysok ganz herzlich gedankt.

Bei Herrn Prof. Haerting möchte ich mich herzlich für die statistische Beratung bedanken.

Herrn Dr. Kaltenborn danke ich für die freundliche Zusammenarbeit bei den Sequenzanalysen.