

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für  
Kinder- und Jugendmedizin  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



Direktor: Prof. Dr. med. Dieter Körholz

**Promoter Polymorphismen der Metalloproteinasen 1 und 3 bei Patienten  
mit juveniler idiopathischer Arthritis**

**Dissertation**

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

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Tessa Wegmann

geboren am 19.12.1978 in Freiburg i. Br.

Betreuer: Prof. Dr. med. Gerd Horneff

Gutachter:

Prof. Dr. med. Gerd Horneff (Bonn)

Prof. Dr. med. Christoph Baerwald (Leipzig)

Prof. Dr. med. Gernot Keyßer

23.11.2006

02.07.2007 □ □

**urn:nbn:de:gbv:3-000012081**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000012081>]



**Zielsetzung:** Die Untersuchung, über den Einfluss der verschiedenen Genotypen der Metalloproteinasen 1 und 3 bei der Entstehung entzündlicher Gelenkveränderungen im Rahmen der JIA.

**Methoden:** Die Genotypen der beiden Metalloproteinasen wurden mit Hilfe der DNA Analyse, PCR und DNA Sequenzierung sichtbar gemacht. Es wurden 145 Patienten mit einer JIA und 244 gesunde Kontrollpersonen auf das Auftreten der verschiedenen Genvariationen hin untersucht. Diese Ergebnisse wurden mit den typischen klinischen Symptomen der JIA (Gelenkschwellung, radiologische Veränderungen, CRP-, BSG Erhöhung), weiteren Merkmalen zur Einschätzung der jeweiligen Krankheitsaktivität (Anzahl der eingenommenen Medikamente) und den Immunmarkern (ANA, HLA, DR, RF) in Bezug gebracht und hinsichtlich einer Korrelation analysiert.

**Ergebnisse:** Bei der Verteilung der genetischen Polymorphismen und der Allelfrequenzhäufigkeit bestand kein Unterschied zwischen den unabhängigen Gruppen der Patienten und Kontrollen. Bedeutend war die deutliche Assoziation des MMP1 2G/ MMP3 6A Allels und einer Gelenkschwellung. Die statistische Auswertung der übrigen erhobenen Parameter und klinischen Merkmale resultierte nicht in einem relevanten Zusammenhang zu den MMP Polymorphismen.

**Zusammenfassung:** Das MMP1 2G/ MMP3 6A Allel korreliert deutlich mit einer Gelenkschwellung. Im Gegensatz dazu zeigen die radiologischen Veränderungen keinen Zusammenhang zu den MMP Polymorphismen.

Wegmann, Tessa: Promoter Polymorphismen der Metalloproteinasen 1 und 3 bei Patienten mit juveniler idiopathischer Arthritis. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 52 Seiten, 2006

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1 Einleitung</b>	1
1.1 Definition JIA	1
1.2 Subtypen	1
1.3 Ätiologie	2
1.4 Immunologie der JIA	3
1.5 Metalloproteinasen	4
1.6 MMP Polymorphismus	5
1.7 Gelenkpathogenese	6
1.8 Röntgenologische Veränderungen	6
1.9 Prognose	7
1.10 Ziel der Arbeit	8
<b>2 Materialien und Methoden</b>	8
2.1 Materialien und Geräte	8
2.2 Chemikalien und Substanzen	9
2.3 Blutabnahme	10
2.4 DNA Isolierung	10
2.5 PCR zur Herstellung des MMP Produktes	10
2.6 Gelextraktion und Aufreinigung der Proben	11
2.7 Sequenzier-PCR Reaktion	12
2.8 Fällung	13
2.9 Sequenzier Reaktion	13
<b>3 Ergebnisse</b>	14
3.1 Häufigkeitsverteilung der JIA-Typen	14
3.2 Genanalyse	14
3.3 Genetik der Polymorphismen	15
3.4 Verteilung der Polymorphismus Häufigkeiten	18

3.5 Anzahl geschwollener Gelenke	19
3.6 Medikamente	20
3.7 CRP, BSG	22
3.8 Antigen, Antikörper	23
3.9 Röntgenbefunde	24
<b>4 Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>28</b>
4.1 Vorhaben	28
4.2 Hypothesen	28
4.3 Häufigkeiten	29
4.4 Klinische Symptome	30
4.4.1 Gelenkschwellung	30
4.4.2 CRP, BSG	31
4.4.3 Immunmarker	32
4.5 Medikamente	32
4.6 Röntgenbefunde	32
4.7 Zusammenfassung	33
<b>5 Literatur</b>	<b>34</b>
<b>6 Thesen</b>	<b>51</b>

## Symbole und Abkürzungen

Abb	Abbildung
ANA	Anti-nukleäre Antikörper
bp	Basenpaare
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CD (4+)	Cluster of differentiation
CRP	C-reaktives Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HLA	Human Leucocyte Antigen
HWS	Halswirbelsäule
IL	Interleukin
ILAR	International League of Associations for Rheumatology
JIA	juvenile idiopathische Arthritis
KDa	Kilo Dalton
LDH	Laktatdehydrogenase
LJ	Lebensjahr
MHC	major histocompatibility complex
MMP	Matrix Metalloproteinasen
MS	Morgensteifigkeit
NO	Stickstoffmonoxid
PCR	polymerase chain reaction
RF	Rheumafaktor
SNPs	single nucleotide polymorphisms
Taq	Thermus aquaticus Polymerase
Timps	tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF	tumor necrosis factor
UV	Ultraviolett

# 1 Einleitung

## 1.1 Definition JIA

Mit einer Prävalenz von 50-100/100 000 Kinder ist die juvenile idiopathische Arthritis die häufigste chronische rheumatische Erkrankung im Kindesalter (Lipnick et al., 1991). Die typischen Beschwerden äußern sich in Schwellung, Schmerzen, Steifigkeit und Bewegungseinschränkung der betroffenen Gelenke und extraartikulären Symptomen wie Fieber, Uveitis und Tenosynovitis.

Die Diagnose steht für Gelenkentzündungen bei Kindern, jünger als 16 Jahre, die länger als 6 Wochen persistieren, nachdem andere Ursachen ausgeschlossen wurden.

Die Klassifikation (nach aktuellen ILAR-Klassifikationskriterien (International League of Associations for Rheumatology) Hofer et Southwood, 2002)) erfolgt klinisch in eine der 7 Untergruppen anhand der Anzahl und Lokalisation der betroffenen Gelenke und des Vorhandenseins extraartikulärer Organmanifestationen.

## 1.2 Subtypen

Subtypen der juvenilen idiopathischen Arthritis		Gelenkbefall	Alter, Häufigkeit	Laborwerte	Extraartikuläre Manifestation
Typ 1	Systemische Arthritis (Still-Syndrom)	Jeder Befallstyp	15%, jedes Alter, beginnt oft vor 6.LJ, ♀=♂	CRP↑ BSG↑	Fieber, Exanthem, Hepatomegalie, Splenomegalie, Perikarditis, Pleuritis, Vaskulitis, Minderwuchs
Typ 2	seronegative Polyarthrit	symmetrisch, >4 Gelenke, Hand-, Fingergelenk-(z.B. DIP) beteiligung	30%, beginnt um das 8.LJ, ♂=♀	RF neg.	Subfebrile Temperaturen, Tenosynovitis, Uveitis, Vaskulitis
Typ 3	seropositive Polyarthrit	(alle Gelenke, besonders kleine),	10%, beginnt nach 10.LJ	RF pos.	Subfebrile Temperaturen,

		siehe z.B. Typ 2			Tenosynovitis, Episkleritis, Vaskulitis, Rheumaknoten
Typ 4a	Frühkindliche Oligoarthritis	Asymmetrisch, Oligoarthritis der unteren Extremität (Sprung-, Kniegelenk)	30-40%, beginnt um 5.LJ, bei ♀ doppelt so häufig als bei ♂	ANA pos. (70%)	Chronische Uveitis
Typ 4b	Extended Oligoarthritis	nach 6 Monaten > 4 Gelenke, Einschluss von Kiefer, - Hüftgelenk möglich	30- 40%,beginnt um 5.LJ, ♀>♂	ANA pos.	Chronische Uveitis
Typ 5	Arthritis und Enthesitis	Asymmetrische Oligoarthritis der unteren Extremität	10.LJ., ♂>♀	HLA B27 pos.	Enthesitis, akute Uveitis
Typ 6	Psoriasis und Arthritis, daktylitisches Befallsmuster	(Finger im Strahl)	5-10%, vor dem 16.LJ	ANA und HLA B27 pos.	Psoriasis, Uveitis
Typ 7	Nicht klassifizierbar				

**Tabelle 1: Klassifikation der JIA Subtypen**

### 1.3 Ätiologie

Die Ätiologie der JIA ist nach wie vor ungeklärt (Lang et al., 1990). Die Assoziation mit bestimmtem HLA Antigenen, die Infiltration der betroffenen Gelenke mit Lymphozyten und der Nachweis von Autoantikörpern deuten an, dass autoimmune Mechanismen der Pathogenese dieser Erkrankung zugrunde liegen (Fernandez Vina et al., 1994). Die von



Fernandez Vina erwähnten HLA Marker und Autoantikörper werden bei der JIA als wichtige Descriptoren herangezogen: der wiederholte Nachweis von Rheumafaktoren, der Nachweis von HLA B27 und von antinukleären Antikörpern.

Da sich kein klassischer Mendelscher Erbgang nachweisen lässt, scheint die genetische Disposition durch die Interaktion mehrerer Gene (Epistasie) im Zusammenspiel mit Infektionen, Traumata, Stresssituationen und autoimmunologischen Prozessen zur Krankheitsmanifestation zu führen.

#### **1.4 Immunologie der JIA**

Durch das Immunsystem ist der Körper in der Lage, spezifisch auf Fremdstoffe (z.B. Bakterien, Viren) zu reagieren. Diese werden nach Aufnahme (Phagozytose) in die Zelle (z.B. Makrophagen, Monozyten) und Fragmentierung als Antigenpeptid, gemeinsam mit HLA Markern (Human Leucocyte Antigen Klasse I oder II) an der Oberfläche dieser Zellen präsentiert.

Spezialisierte Lymphozyten (T-, B-Lymphozyten) sind nach ihrer Reifung (Prägung) in den sekundären lymphatischen Organen (Tonsillen, Lymphknoten, Peyer Plaques, Milz, Thymus), in der Lage, auf diese Antigen Präsentation zu reagieren.

Lymphozyten haben die Möglichkeit als:

- \* T-Killer-Zellen die Elimination viral infizierter Zellen über ein Lyse der Zellmembran der Zielzelle, einer anschließenden Apoptosis und der Liberation von zytotoxischen Interleukinen (z.B. TNF  $\beta$ ) zu fördern.

- \* T-Helfer-Zellen unterstützen diesen Prozess durch eine weitere Freisetzung von Interleukinen und durch die Aktivierung von B-Lymphozyten, die über eine Differenzierung zu Plasmazellen die Antikörper Produktion steigern.

Im ersten Fall führt dies zur Freisetzung von spezifischen Zytokinen (Interleukine, Interferone, Wachstumsfaktoren, Monokine). Zytokine (Eiweißmoleküle; lösliche Glykoproteine) dienen den Immunzellen als Transmitter, über die sie miteinander "kommunizieren". Sie haben proinflammatorische und immunregulatorische Funktionen; weiterhin dienen sie als Wachstumsfaktoren und unterstützen Reparaturmechanismen von Gewebeschädigungen.

Durch diese Zytokine stimuliert, werden Entzündungsvorgänge angeregt, die in einer vermehrten Produktion von Akute-Phase-Proteinen, Proliferation von B-Lymphozyten, Aktivierung von Granulozyten und Osteoklasten resultieren und eine starke Aktivierung von Fibroblasten bewirken. Von diesen Fibroblasten werden, angeregt durch Zytokine destruktive Metalloproteinasen (MMPs) gebildet, die potente Knorpeldestruktoren darstellen. Zytokine, sezerniert von aktivierten mononukleären Zellen, werden somit verantwortlich gemacht, nicht nur dafür, die lokale und systemische Entzündung zu initiieren und aufrecht zu erhalten, sondern auch für eine Gewebedestruktion (Lipnick et al., 1991).

### **1.5 Metalloproteinasen**

Die Homöostase der extrazellulären Matrix ist ein sensibles Gleichgewicht zwischen Aufbau und Abbau. Dieses wird aufrechterhalten von der Interaktion zwischen Metalloproteinasen und deren spezifischen Hemmstoffen (Tissue inhibitor of metalloproteinases; Timp) (Spurbeck et al., 2002).

Als Matrixmetalloproteinasen wird eine Gruppe zinkhaltiger Enzyme bezeichnet, die mindestens eine Komponente der extrazellulären Matrix spalten (Martisian LM, 1990). Ihre Regulation, die auf Transkriptionsebene stattfindet, wird durch Wachstumsfaktoren und Zytokine kontrolliert. Sie werden als inaktive Zymogene sezerniert und durch proteolytische Abspaltung einer Prodomäne aktiviert. Einmal freigesetzt können die MMPs nur durch hohe Mengen von Tissue Inhibitors of MMPs (TIMPs) gehemmt werden. MMP spielen eine wichtige Rolle im Bindegewebestoffwechsel und beim Umbau des Gelenkknorpels (Laufer et al., 2002).

In Bezug auf die JIA sind die Metalloproteinasen 1 und 3 von besonderer Bedeutung.

Typ 1 Kollagenase (MMP 1, 57/ 52 kDa) ist die am meisten verbreitete Kollagenase. Durch die Spaltung von Gelatinen und interstitiellem Kollagen Typ 1, 2 und 3 ist sie am Abbau von artikulärem Knorpel beteiligt (Constantin et al., 2002).

Stromelysin 1 (MMP 3, 50/ 48 kDa) mit der größten Substratspezifität von allen MMPs kann Fibronectin, Laminin, Kollagen Typ 4 und Knorpel Proteoglykane destruieren (Quinones et al., 2002).

Durch den Abbau von essentiellen Bestandteilen (hyaliner Gelenkknorpel: Glykosaminoglykane, Hyaluronsäure, Proteoglykane, Typ II Kollagen) tragen die

Metalloproteinasen zu einer Knorpel- und im weiteren Verlauf auch zu einer Knochenzerstörung bei.

MMP 1 und MMP 3 sind involviert in entzündliche und destruktive Vorgänge (Andreacos et al., 2003).

## **1.6 MMP Polymorphismus**

Von Rutter et al., 1998 wurde ein MMP 1 Promoter Polymorphismus an der Stelle -1607 bp beschrieben: „Ein Guanin Insertions-/ Deletions Polymorphismus in der Promotor Sequenz des MMP 1 Genes beeinflusst die Transkription desselben: der 2 G (Insertions Typ) Promotor führt zu einer größeren Kollagenaseaktivität als der 1 G (Deletions) Typ. Diese Überexpression von MMP 1 ist assoziiert mit verschiedenen pathologischen Bedingungen einschließlich einer irreversiblen Destruktion von Knorpel, Sehnen und Knochen, und dem Abbau von Kollagen Typ 1 und 3.“

Laut Wyatt et al., 2002 gibt es Hinweise darauf, dass der MMP 1/ 2G Polymorphismus das Potential eines Individuums erhöht, mit einer gesteigerten MMP 1 Expression als Antwort auf Zytokine und Wachstumsfaktoren zu reagieren.

In der Synovialflüssigkeit findet sich eine erhöhte MMP 1 Aktivität. Dieser Befund korreliert zur inflammatorischen Aktivität bei der JIA (Peake et al., 2005).

Zu dem MMP 3 Polymorphismus äußerten sich unter anderem Szylo et al., 2002: Der Insertions/ Deletions Polymorphismus (MMP 3 5A/ 6A) lokalisiert in der Promoter Region an der Stelle -1171 bp mag eine funktionelle Bedeutung in der Regulation seiner Expression haben. Der 6A-6A Genotyp hängt zusammen mit erhöhten Pro MMP 3 Serum Werten (Mattey et al., 2004).

Gattorno et al., 2002 kommt nach Messungen des Serum und der Synovialflüssigkeit mit ELISA zu dem Ergebnis, dass die MMP 3-Serumkonzentrationen bei Patienten mit einer aktiven oligo-, oder polyartikulären JIA deutlich höher sind, als bei inaktiven Patienten oder gesunden Kontrollen.

## **1.7 Gelenkpathogenese**

Die chronische Reizung der Synovia durch die pathologische Aktivierung des Immunsystems führt zu einer Entzündung der Gelenkinnenhaut, einer Synovialitis. Diese äußert sich in einer übermäßigen Produktion von Synovia (Gelenkflüssigkeit), die mit einer schmerzhaften Schwellung des Gelenkes einhergeht. Die chronisch entzündliche, in schleichenden Krankheitsschüben rezidivierende Synovitis zerstört die Oberfläche des Gelenkknorpels mit oft pannusartigem Überwachsen durch die verdickte Synovialis. Im Verlauf kommt es zu einer Elastizitätsminderung der Gelenkkapsel und einer Verdickung des Bindegewebes. Die Ernährung, Gleitfähigkeit und Beweglichkeit des Gelenkes ist nicht mehr vollständig gewährleistet.

MMPs tragen durch ihre Fähigkeit Knorpel und Knochen zu zersetzen zu diesen krankhaften Veränderungen bei.

## **1.8 Röntgenologische Veränderungen**

Der röntgenologischen Bildgebung kommt in der akuten Erkrankungsphase eine rein differentialdiagnostische Bedeutung zu. Wenn die pathologischen Vorgänge und entzündlichen Veränderungen im Gelenk jedoch eine chronische Form annehmen, können 3-6 Monate nach Krankheitsbeginn aufgrund einer Veränderung der Gelenkstrukturen, in Form von Wachstums-, Form und Entwicklungsstörungen im Röntgenbild sichtbar werden.

Sie sind als Weichteilschwellung, als intra-, und periartikuläre Volumenzunahme, Gelenkspaltverschmälerung, Erosionen, Osteoporose und apophysischem Knochenaufbau zu erkennen.

Im weiteren Verlauf kommen Usuren, später Subluxationen und Deviationen der betroffenen Gelenke hinzu. Auch eine vorzeitige Ossifikation knorpeliger Anteile und somit ein verfrühter Schluss der Epiphysenfugen kann beobachtet werden.

## 1.9 Prognose

Aussagen über die Prognose können nur eingeschränkt getroffen werden.

Die Prognose der verschiedenen JIA Subgruppen wird bestimmt durch die Intensität und die Progredienz der systemischen und artikulären Entzündungsreaktionen, die für die Entwicklung chronischer Gelenk- und Organschäden und irreversibler Sekundärveränderungen (z.B. Gelenkkontrakturen und Deformitäten) verantwortlich sind. Die Langzeitprognose ist innerhalb der verschiedenen Krankheitsentitäten sehr unterschiedlich.

Typ	Remission	erosive Veränderungen	Funktionseinschränkungen
1	50%	45%	45%
2	30%	50-60%	50-55%
3	10%	70-80%	70%
4	80%	15-20%	25-30%
4a	10%	15-20%	25-30%
5	10%	5-50%	40-50%
6	k.A.	k.A.	k.A.

**Tabelle 2: Langzeitprognose der verschiedenen JIA Subtypen**

(nach Minden K., Epidemiologische Aspekte entzündlich- rheumatischer Erkrankungen im Kindesalter), 2002

Die Lebensqualität der erkrankten Kinder wird zu einem Teil durch die Gelenkbeschwerden und zu einem weiteren Teil durch die extraartikulären Manifestationen wie Fieber und Uveitis bestimmt. Weiterhin wird sie beeinflusst durch die Tatsache, dass die Kinder häufig eine Vielzahl von Medikamenten (nicht steroidale Antirheumatika (Indometazin, Naproxen, Diclofenac, Ibuprofen, Acetylsalicylsäure, Meloxicam); Basistherapeutika (Chloroquin, Sulfasalazin, Gold, D-Penicillinamin); Immunsuppressiva (Methotrexat, Azathioprin, Ciclosporin A, Leflunomid, Cyclophosphamid); TNF- $\alpha$  Hemmstoffe (Etanercept, Adalimumab, Infliximab) und Cortison (Prednisolon)) einnehmen, und teilweise unter nicht unerheblichen Nebenwirkungen (Magengeschwüre, Übelkeit, Erbrechen, Immunschwäche, Gewichtszunahme, Osteoporose etc.) leiden müssen.

## 1.10 Ziel der Arbeit

MMP 1 und MMP 3 spielen als destruktive Proteasen eine entscheidende Rolle bei degenerativen Veränderungen. Diese sind von Bedeutung in der Pathogenese der juvenilen idiopathischen Arthritis.

Da einerseits gezeigt werden konnte, dass Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in der Promoter Region mit einer höheren Transkription einhergehen (Ghilardi et al., 2001, Rutter et al., 1998, Matthey et al., 2004, Wyatt et al., 2002, Szylo et al., 2002) und andererseits, dass im Serum erhöhte Metalloproteinasen bei Patienten mit einer juvenilen idiopathischen Arthritis mit einer erhöhten Konzentration und somit verstärkten Wirkung von MMPs assoziiert sind (Gattorno et al., 2002, Ribbens et al., 2002, Cunnane et al., 2001, Peake et al., 2005), soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob bei JIA Patienten im Promoter der Metalloproteinase 1 bzw. Metalloproteinase 3 genetische Unterschiede zu gesunden Kontrollpersonen bestehen, und ob diese genetischen Varianten mit dem Nachweis einer verstärkten Krankheitsaktivität der JIA assoziiert sind.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien und Geräte

Color Style Writer 2400

Color Style Writer Ink cartridge

Genetic analyzer 310

Abi Prism

Handschuhe Kimberly Clark Safe Skin

USA

Hera safe

Heraeus Instruments, Kendro

Laboratory Products

Mastercycler personal

Eppendorf

Mikrowelle

Bosch

Pipetten

Eppendorf Research

Pippettenspitzen Art 100 E

Molecular Bio Products

Power Macintosh G3 Power PC

Macintosh

Power Pac 200

Bio Rad

Sony Multiscan 100 ES	Trinitron
UV Lampe	
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wage	Sartorius
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products

## 2.2 Chemikalien und Substanzen

AE Buffer 60 ml	Qiagen, Hilden, D
Agarose-Pulver	Bio Rad Laboratories
AL Buffer	Qiagen, Hilden, D
AW Buffer AW1/2	Qiagen, Hilden, D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
Buffer Thermophilic DNA	Promega, USA
DNA Sequenzing Kit	Applied Biosystems, CA
DNA Qiagen Kit	Applied Biosystems, CA
DNTP	Invitrogen, USA
EDTA	Labor Halle
Ethanol 96%	Roth, D
Ethidiumbromid	Sigma, USA
Glycerin	Merck, Darmstadt, D
HPLC-Grade Wasser	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Isopropanol	Roth, D
Loading Buffer	Labor intern
MgCL <sub>2</sub>	Promega, USA
NaoAC 3 M	Labor Halle, D
PE Buffer	Qiagen, Hilden, D
Primer	Bio Source
Protease	Qiagen, Hilden, D
QG Buffer	Qiagen, Hilden, D
Taq DNA Polymerase	Promega, USA
Xylencyanol	Merck, Darmstadt, D

### **2.3 Blutabnahme**

Aus dem Vollblut der insgesamt 389 (145 Patienten, 244 Kontrollen) Personen wurde die DNA isoliert, um sie anschließend weiter analysieren zu können. Alle Patienten, deren Eltern und die gesunden Kontrollpersonen wurden über den Verwendungszweck der Blutproben aufgeklärt und waren einverstanden mit der Teilnahme an der Studie. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg geprüft und anerkannt.

### **2.4 DNA Isolierung**

Mit dem Prinzip der Isolierung konnte aus den Blutproben die DNA gewonnen werden. Zur Eiweißverdauung wurden 20µl Protease in ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen gegeben. Hinzu pipettierte man 200µl der Blutprobe. Nachdem 200µl AL Puffer zugegeben war, wurde die Probe für 15 s gevortext und anschließend für 10 min. bei 56 Grad Celsius inkubiert. Sobald die Proben gut aufgelöst waren, und eine gelbliche Farbe angenommen hatten, wurden sie kurz (ca.60 Sekunden) zentrifugiert. Zur Fällung der DNA wurden 200µl 96% Ethanol zugefügt, anschließend wurden die Proben nochmals gevortext und zentrifugiert. Diese Mischung wurde auf eine Spin Column Säule gegeben und bei 10000 U 2 min zentrifugiert. Danach wurden die Proben in 2 Durchgängen mit jeweils 500µl AW1 Puffer und AW2 Puffer, nach jeweils 2 minütigem Zentrifugieren gewaschen. Als letzten Schritt wurden 200µl AE Puffer auf die Säulen gegeben und die Proben nach einer Inkubationszeit von 5 min weitere 2 min zentrifugiert.

Die gewonnenen DNA-Proben konnten so präpariert zur Ansetzung einer PCR benutzt werden.

### **2.5 PCR zur Herstellung des MMP-Produktes**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist seit ihrer Invention 1983 aus der Forschung nicht mehr wegzudenken. Sie stellt eine Methode zur Vervielfältigung der genetischen Grundbausteine, der Nukleinsäuren dar. Das geschieht nach dem Prinzip der Replikation (Verdopplung), wie es auch in dem lebenden Organismus in der Zelle vor sich geht.



Bis 1988 war die sehr thermolabile DNA-Polymerase der limitierende Faktor der PCR. Heute steht die hitzeunempfindliche Taq-Polymerase (Taq-Polymerase ist die DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*, dem es seinen Namen verdankt. Sie ist außerordentlich hitzebeständig, da das Bakterium in Geysiren in über 100 °C lebt, und wird zur DNA-Replikation mittels Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt.) zur Verfügung, die auch bei Temperaturen von bis zu 92° Grad die Sequenz replizieren kann.

Um die PCR anzusetzen, wurde vorab ein Mastermix vorbereitet. Da pro Durchgang 24 Proben bearbeitet wurden, bot sich diese Methode an, um eine Standardisierung gewährleisten zu können, und die Pipettierschwankungen möglichst gering zu halten.

Pro Probe wurden benötigt:

- 28,7µl Wasser HPLC Grade
- 5µl Puffer
- 4µl MgCl<sub>2</sub>
- 1µl dNTP
- je 1µl 25 mmol Primer
  - MMP 1 forward 5'-CCCTCTTGAACCTCACATGTTATG-3'
  - MMP 1 reverse 5'-ACTTTCCTCCCCTTATGGATTCC-3'
  - MMP 3 forward 5'-TCCTCATATCAATGTGGCCAAA-3'
  - MMP 3 reverse 5'-CGGCACCTGGCCTAAAGAC-3'

Zu diesem Ansatz, der nun pro Probe einen Mastermix von 41µl ergab, wurden 9µl isolierte DNA gegeben. Der Ansatz wurde zur besseren Durchmischung noch einmal gevortext, und kurz (ca.60 Sekunden) zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in die PCR Maschine verbracht und durchliefen die 30 Zyklen in einer Zeit von ca. 2 h.

## **2.6 Gelextraktion und Aufreinigung der Proben**

Das PCR-Produkt ließ sich am besten in einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel sichtbar machen, in dem die Banden möglichst scharf bei der erwarteten Lauflänge auftreten sollten. Da die Hintergrundverfärbung unerwünschter Sequenzen fehlte, waren die Banden gut zu erkennen. Durch diesen Vorgang wurde das Produkt von übrigen Stoffen, wie den Primern, dem Puffer und den Desoxynucleotiden befreit.

Um die DNA Banden sichtbar zu machen, musste ein Gel bereitgestellt werden. Dieses wurde aus 1,4 g Agarose Pulver, 75 ml TAE Puffer und 1,7µl Ethidiumbromid hergestellt.

Die Proben wurden jeweils mit 6µl Loading Buffer markiert, je eine Probe in eine der 10 Taschen des Gels pipettiert und durchliefen eine Elektrophorese bei 140 V über 25 min. Unter der UV-Lampe konnte das Ergebnis gut beurteilt werden. Die Banden, die die zu erfüllenden Kriterien, nämlich keine Doppelbanden, auf der richtigen Höhe und genügende Intensität erfüllten, schnitt man mit dem Skalpell aus und gab sie in vorbereitete Eppendorf Röhrchen. Das zuvor festgestellte Leergewicht der Eppendorfgefäße wurde von dem aktuellen Gewicht der Gefäße (mit den Gelausschnitten) abgezogen, um so das Reingewicht der Probe zu erhalten. Daraufhin gab man das 3-fache des Gewichtes der Probe an QG Puffer zu. Die Proben wurden bei 50° 10 min inkubiert. Nachdem das Gel ordentlich aufgelöst war, gab man das einfache Gewicht der Probe an Isopropanol zu, vermischte die Flüssigkeiten durch kurzes Vortexen und pipettierte die Proben auf passende Spin Column Säulen. Diese wurden 2 min bei 13000 U zentrifugiert, der Überstand ausgeschüttet, und nochmals mit 500µl QG Puffer versehen. Nach weiteren 2 min in der Zentrifuge wurden 750µl PE Puffer zugegeben, und nach 5 min Inkubation zentrifugiert. Als letzten Schritt wurden 10µl Wasser HPLC-Grade auf die Membranen der Säulen gegeben, und nach einer 2 minütigen Einwirkdauer wurden die Proben ein weiteres Mal zentrifugiert.

Nach dieser Aufreinigung waren die Proben befreit von den Zusätzen der PCR und konnten nun für den zweiten Zyklus benutzt werden. In der folgenden PCR wurde das Sequenzierprodukt hergestellt.

## **2.7 Sequenzier-PCR-Reaktion**

Die zweite PCR-Reaktion diente zur linearen Vermehrung des zu untersuchenden Basenabschnittes. Durch Zugabe nur eines Primers wurde diese Vervielfältigung ermöglicht. Weiterhin konnten die Basen durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert werden, und so in der später folgenden Sequenzierung sichtbar gemacht werden.

Wieder ist ein Mastermix vorbereitet worden. Diesmal wurden pro Probe.

- 0,5µl Primer (MMP 1 forward oder reverse; MMP 3 forward oder reverse)
- 4µl Fluoreszenzmix und
- 5µl Wasser HPLC-Grade

als Ansatz hergestellt und zu 0,5µl der aufgereinigten DNA gegeben.

Wiederum wurden die Proben zur besseren Verteilung der verschiedenen Chemikalien gevortext und zentrifugiert. Das Sequenzier Programm der PCR Maschine sah 40 Zyklen vor und dauerte ca. 2,5 h.

An diesen Schritt schloss sich ein weiterer Reinigungsschritt, die Fällung an.

## **2.8 Fällung**

Um die Proben von den Überständen aus der vorangegangenen Reaktion zu befreien, wurde eine Fällung vorgenommen. Dafür füllte man jede einzelne Probe mit 1µl 3 molarem NaOAc pH 4,6 und 25µl 100 % Ethanol auf. Nach 15 min Inkubation wurden die Proben 15 min bei 13.000 RPM zentrifugiert. Der sich bildende Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen, und die Proben mit 25µl 70 % Ethanol versetzt. Nach weiteren 5 min Zentrifugation wurde nochmals der Überstand abgenommen. Zur vollständigen Reinigung wurde ein letztes Mal zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, die Proben 1 h unter dem Abzug zum Abtrocknen gebracht und anschließend in 10µl Wasser HPLC-Grade aufgelöst. Die so aufbereiteten und markierten Proben konnten dann für die Sequenzier Reaktion eingesetzt werden.

## **2.9 Sequenzier Reaktion**

Mit Hilfe der Sequenzierreaktion war es möglich, die vorab mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Basen sichtbar zu machen. Die Proben wurden mit Wasser HPLC-Grade verdünnt, in einem Verhältnis 12µl DNA zu 8µl Wasser, was einem Gesamtansatz von 20µl entsprach. Die Gefäße wurden in vorher festgesetzter Reihenfolge in einen speziellen Sequenzier Block gestellt und in dem Sequenziergerät platziert. Im Computer wurden die Proben der Reihenfolge in dem Block entsprechend eingegeben und exakt benannt um Verwechslungen zu vermeiden. Jede einzelne Probe wurde von einer Kapillare des Abi Prism 310 Sequenziergerätes angezogen. Sie durchlief während ca. einer Stunde einen mit einem Fenster versehenen dünnen Draht. An der durchsichtigen Stelle detektierte ein Laser die Banden, denen jeweils eine Fluoreszenzfarbe zugeordnet war. Die Reihenfolge der Nukleotide wurde an Hand der Farbsignale aufgeschlüsselt und konnte anschließend auf einem farbigen Ausdruck sichtbar gemacht werden. Auf diesem Weg erhielt man die genaue Basenfolge des

gewünschten DNA Abschnittes und konnte etwaige genetische Varianten (z.B. Deletion/Insertion) erkennen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Häufigkeitsverteilung der JIA-Typen

In die Studie aufgenommen wurden ausschließlich Kinder mit einer juvenilen idiopathischen Arthritis die nach klinischen und labormedizinischen Gesichtspunkten diagnostiziert wurde. Alle Patienten und ihre Eltern wurden über den Inhalt der Studie aufgeklärt und erst nach ihrem Einverständnis in das Projekt eingeschlossen.

Die Verteilung der Kinder in den verschiedenen JIA Subgruppen ergab sich wie folgt:

JIA Typen	Gesamt (n=145)
1	6,5% (n=9)
2	32,7% (n=47)
3	6,5% (n=9)
4	20,7% (n=30)
4a	9,3% (n=14)
5	16,4% (n=24)
6	7,9% (n=12)

**Tabelle 3: Darstellung der Häufigkeitsverteilung in den JIA Subgruppen**

#### 3.2 Genanalyse

Nachdem die Blutproben der 389 Personen (Patienten n=145/ Kontrollen n=244) gesammelt waren, und die DNA mit dem DNA Qiagen Kit isoliert war, wurden die Proben mit den etablierten Methoden aus Kapitel 2 aufgearbeitet und sequenziert. Durch die Sequenzieranalyse des gewünschten DNA Teilstückes gelang die genaue Identifizierung der DNA Sequenz und somit auch des Polymorphismus. Der Polymorphismus betraf bei beiden Enzymen die Promoterregion. Diese liegen auf dem Chromosom 11q22.3; der MMP 1

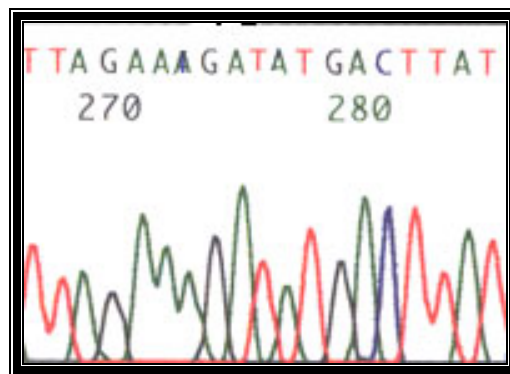
Polymorphismus an der Stelle -1607 bp und der MMP 3 Polymorphismus an der Stelle -1171 bp. Untersucht wurde hinsichtlich des Auftretens einer Punktmutation.

Diese trat auf in Form einer Deletion (Mutation, bei der Nukleotide aus der DNA Sequenz gelöscht werden); entweder in Form einer Einzelstrang oder einer Doppelstrang Deletion.

### 3.3 Genetik der Polymorphismen

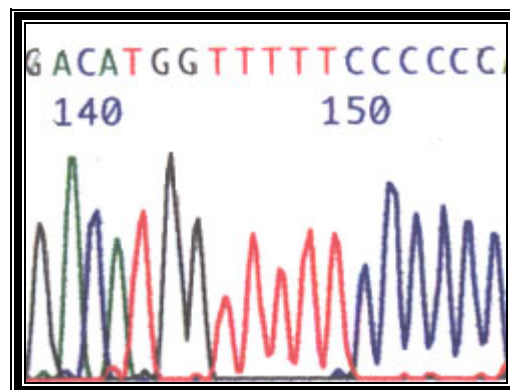
Die Genanalyse ergab drei Möglichkeiten:

- Doppelstrang Deletion; Homozygotie



MMP 1 1G-1G

Abbildung 1: MMP 1 Doppelstrang Deletion (GAAAG)

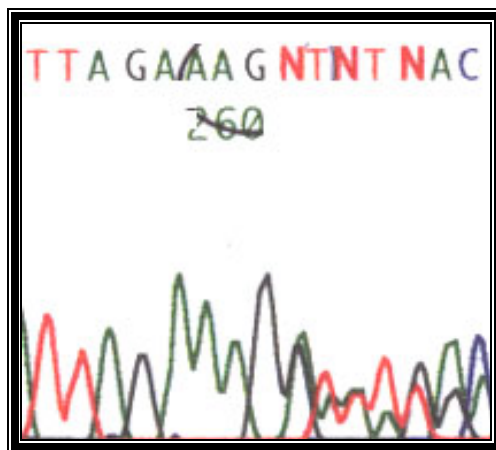


MMP 3 5T-5T

Abbildung 2: MMP 3 Doppelstrang Deletion (GTTTTT)

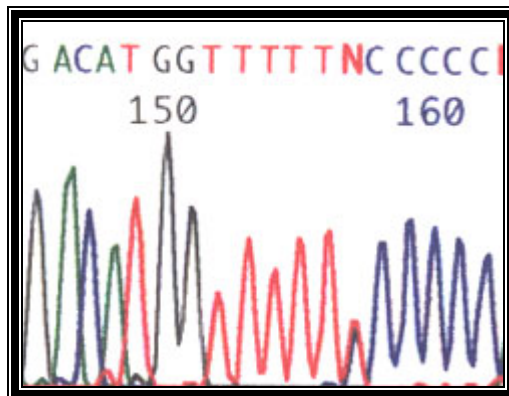
Fehlen des zweiten G (MMP 1)/ sechsten T (MMP 3) auf beiden homologen Chromosomen (Deletion auf beiden Chromosomensträngen).

- Einzelstrang Deletion; Heterozygotie



MMP 1 1G-2G

Abbildung 3: MMP 1 Einzelstrang Deletion (GAAAGN)

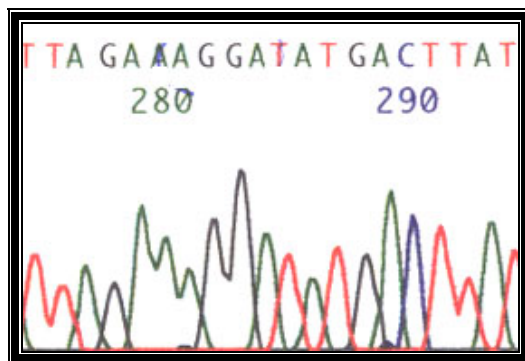


MMP 3 5T-6T

Abbildung 4: MMP 3 Einzelstrang Deletion (GTTTTN)

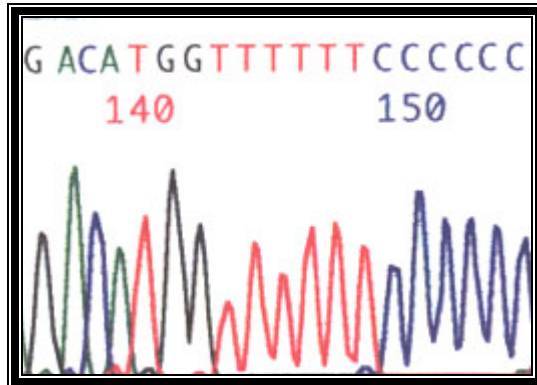
Deletion auf nur einem der beiden Chromosomen (Rasterverschiebung)

- Wildtyp, keine Deletion



MMP 1 2G-2G

Abbildung 5: MMP 1 Wildtyp (GAAAGGA)



MMP 3 6T-6T

Abbildung 6: MMP 3 Wildtyp (GTTTTTTC)

Wildtyp (keine Punktmutationen). Es liegen zwei G/ sechs T vor.

### 3.4 Verteilung der Polymorphismus Häufigkeiten

Ziel war eine genaue Diskriminierung der DNA Polymorphismen und eine Zuteilung jedes Patienten und jeder Kontrollperson zu einer der drei Möglichkeiten (Doppelstrang Deletion, Einzelstrang Deletion, Wildtyp) des Metalloproteinase 1 bzw. 3 Promoter Polymorphismus, bzw. Allel 2G/ 6T vorhanden ja oder nein. Anschließend wurden die genetischen Varianten mit verschiedenen Subtypen der JIA in Bezug gesetzt um evtl. Zusammenhänge oder eine auffällige Verteilung aufzudecken. Die statistische Auswertung der Polymorphismushäufigkeiten ergab die folgenden Werte:

<b>MMP 1</b>	<b>Patienten</b>	<b>Kontrollen</b>	
<b>1G 1G</b>	n=41 (28,5%)	n=63 (25,8%)	p>0,05
<b>1G 2G</b>	n=66 (45,8%)	n=119 (48,8%)	p>0,05
<b>2G 2G</b>	n=38 (26,4%)	n=62 (25,4%)	p>0,05

<b>MMP 3</b>	<b>Patienten</b>	<b>Kontrollen</b>	
<b>5T 5T</b>	n=31 (21,5%)	n=62 (25,4%)	p>0,05
<b>5T 6T</b>	n=69 (47,9%)	n=115 (47,1%)	p>0,05
<b>6T 6T</b>	n=44 (30,6%)	n=67 (27,5%)	p>0,05

**Tabelle 4: Auftreten der drei verschiedenen genetischen Varianten der beiden Metalloproteinase in den Gruppen Patienten/ Kontrollen ( $\chi^2$  Test p>0,05)**

Zusätzlich zu dem Genotyp wurden die Allelfrequenzen der Polymorphismen berechnet. Es wurden der Genotyp MMP 1 1G-1G gegenübergestellt den Genotypen 1G-2G/ 2G2G; weiterhin die MMP 3 Genotypen 5T-5T versus 5A-6T/ 6T-6T.



Bei der Korrelation mit den Allelfrequenzen resultierten folgende Werte:

<b>MMP 1</b>	<b>Patienten</b>	<b>Kontrollen</b>	
<b>Allel 2G nein</b>	148 (51,1%)	245 (50,2%)	p>0,05
<b>Allel 2G ja</b>	142 (48,9%)	243 (49,8%)	p>0,05

<b>MMP 3</b>	<b>Patienten</b>	<b>Kontrollen</b>	
<b>Allel 6T nein</b>	131 (45,5%)	239 (48,9%)	p>0,05
<b>Allel 6T ja</b>	157 (54,5%)	249 (51,1%)	p>0,05

**Tabelle 5: Häufigkeiten der Allele 2G/ 6T in der Patienten und Kontroll Gruppe ( $\chi^2$  Test p>0,05)**

Sowohl die Verteilung der genetischen Varianten als auch der Allelfrequenzen unterschied sich nicht in den beiden unabhängigen Gruppen der Patienten und Kontrollen. Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens der MMP 1 bzw. 3 Polymorphismen in den beiden Gruppen.

### **3.5 Anzahl geschwollener Gelenke**

Als Indikator einer floriden Entzündung wurde die Gelenkschwellung dokumentiert.

Geschwollen waren 0-32 Gelenke, wobei jedoch die meisten Kinder Schwellungen in 0-7 Gelenken hatten (Mittelwert  $4,6 \pm SD 6,7$ ).

Die Mittelwerte in der Gruppe Schwellung wurden mit den beiden unabhängigen Gruppen Allel vorhanden (MMP 1 2G/ MMP 3 6A) oder nicht vorhanden mit Hilfe des t-Testes verglichen.

	MMP 1 Allel		
	0 (n=32)	1 (n=76)	
<b>Mittelwert ± SD</b>	3,7 ± 4,8	6,8 ± 7,5	p<0,05

**Tabelle 6: Darstellung des Mittelwertes der geschwollenen Gelenke mit Blick auf das MMP 1 2G Allel (0=nicht vorhanden, 1= vorhanden) (t-Test p=0,031)**

	MMP 3 Allel		
	0 (n=25)	1 (=85)	
<b>Mittelwert ± SD</b>	3,6 ± 3,3	6,8 ± 7,6	p<0,05

**Tabelle 7: Mittelwerte der geschwollenen Gelenke in Bezug auf das MMP 3 6T Allel (t-Test p=0,043)**

Als Resultat des t-Testes wurde ersichtlich, dass ein signifikanter Unterschied besteht zwischen den Gruppen MMP 1 2G Allel vorhanden (1G-2G/ 2G-2G) oder nicht vorhanden (1G-1G) (t-Test p=0,031) in Bezug auf die Anzahl der geschwollenen Gelenke. Dies lässt erkennen, dass ein Verhältnis bestehen muss zwischen einer Gelenkschwellung und mindestens 2G auf einem Chromosom (1G-2G oder 2G-2G) an der Stelle -1607bp.

Eine ähnliche Signifikanz resultierte bei der Berechnung der MMP 3 Genotypen: eine Korrelation zwischen 5T-5T und 5T-6T/ 6T-6T (t-Test p=0,043). Auch in dem Fall des MMP 3 Polymorphismus ist die höhere Anzahl geschwollener Gelenke verknüpft mit 6T auf einem (5T-6T) oder auf beiden Chromosomen (6T-6T).

### 3.6 Medikamente

Zur Beurteilung des Schweregrades der rheumatischen Erkrankung wurde zusätzlich die Anzahl der bisher eingenommenen Medikamente (NSAR, Basismedikamente, Immunsuppressiva, TNF- $\alpha$  Blocker, Cortisonpräparate) unter der Annahme, dass die Anzahl der bislang verordneten Medikamente zur Therapierefraktarität korreliert, ermittelt.

Bislang verordnet wurden 0-8 Medikamente.

Die Darstellung der Verteilung der eingenommenen Medikamente lässt sich unten stehender Abbildung entnehmen.

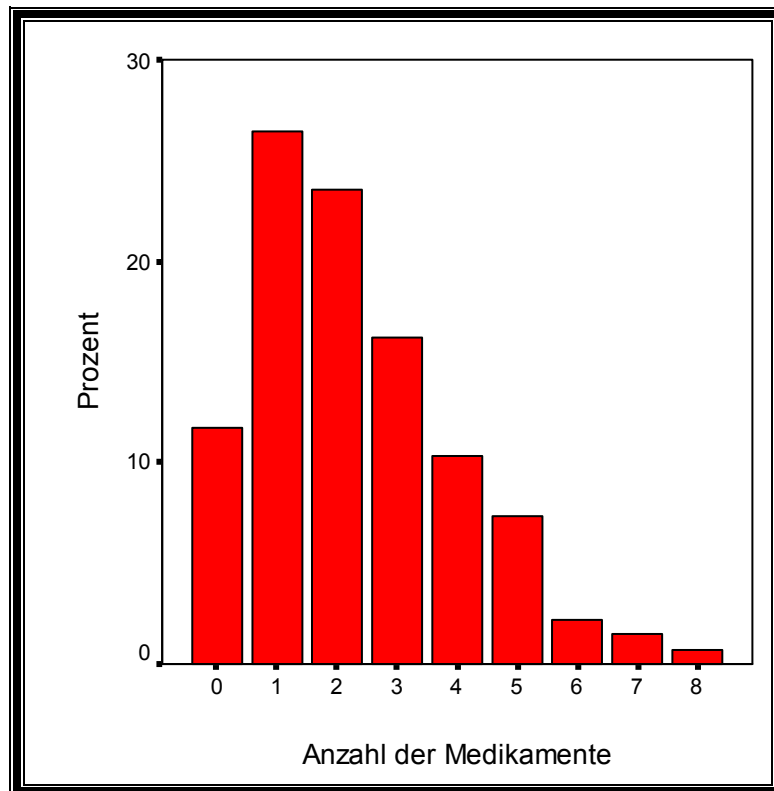


Abbildung 7: Prozentuale Verteilung der verordneten Medikamente

	MMP 1 Allel	
	0 (n=38)	1 (n=98)
<b>Mittelwert ± SD</b>	1,9 ± 1,5	2,5 ± 1,8

Tabelle 8: Der Mittelwert der notwendigerweise eingenommenen Medikamente im Zusammenhang mit dem MMP 1 2G Allel (t-Test>0,05)

	<b>MMP 3 Allel</b>	
	<b>0 (n= 29)</b>	<b>1 (n=109)</b>
<b>Mittelwert ± SD</b>	2,1 ± 1,6	2,4 ± 1,7

**Tabelle 9: Ergebnisse des t-Testes, MMP 3 6T Allel bezogen auf den Mittelwert der verordneten Medikamente (p>0,05)**

Mit dem Ergebnis des t-Testes ist kein signifikanter Unterschied zwischen dem Mittelwert der eingenommenen Medikamente und dem Vorhandensein des 2G/ 6T Allels nachgewiesen.

### **3.7 CRP, BSG**

Um die Polymorphismen mit klinischen und laborchemischen (CRP, BSG) Werten in Bezug setzen zu können, wurden bei allen Patienten Laborparameter untersucht, die eine Entzündungsreaktion reflektieren. Ausgewertet wurden die jeweiligen CRP und BSG Werte zum aktuellen Zeitpunkt der Untersuchung des Gelenkbefundes und der Blutabnahme zur DNA Sequenzierung.

Die klinischen Merkmale wurden zur statistischen Auswertung in Gruppen aufgeteilt:

CRP und BSG Werte wurden in erhöhte (CRP > 5 mg/dl, BSG > 20 mm/h; Gruppe 1) und nicht erhöhte (CRP ≤ 5 mg/dl, BSG ≤ 20 mm/h; Gruppe 0) unterschieden.

Die Auswertung zeigte bei 46,0% der Patienten keine Erhöhung und bei 54,0% der Patienten eine Erhöhung der CRP Werte. Im Gegensatz dazu hatten 22,0% der Kinder keine Blutsenkungsbeschleunigung, bzw. 78,0 % der Kinder eine Blutsenkungsbeschleunigung.

Vergleiche der CRP und BSG Werte bezogen auf die Allele ergaben mit einem  $\chi^2$  von p>0,05 keinen signifikanten Unterschied in den Gengruppen.

	MMP 1 Allel		Total	MMP 3 Allel		Total	
	0	1		0	1		
CRP ≤ 5mg/l	18 (30,0%)	42 (70,0%)	60	12 (20,0%)	48 (80,0%)	60	p>0,05
CRP > 5mg/l	20 (27,4%)	53 (72,6%)	73	17 (23,3%)	56 (76,7%)	73	p>0,05
BSG ≤ 20mm/h	7 (24,1%)	22 (75,9%)	29	7 (24,1%)	22 (75,9%)	29	p>0,05
BSG > 20mm/h	30 (29,1%)	73 (70,9%)	103	22 (21,4%)	81 (78,6%)	103	p>0,05
<b>Total</b>	75	190	265	58	207	265	

**Tabelle 10: Korrelation von erhöhten bzw. nicht erhöhten CRP/ BSG Werte mit den MMP 1/ MMP 3 Allelen ( $\chi^2$  Test p>0,05)**

### 3.8 Antigen, Antikörper

Des Weiteren wurden die Bedeutung von Rheumafaktor, HLA B27, ANA und HLA DR4 untersucht.

Die Ergebnisse sind folgender Tabelle zu entnehmen:

	MMP 1 Allel		Total	MMP 3 Allel		Total	
	0	1		0	1		
RF+	2 (20,0%)	8 (80,0%)	10	2 (20,0%)	8 (80,0%)	10	p>0,05
RF-	30 (29,1%)	73 (70,9%)	103	24 (23,3%)	79 (76,7%)	103	p>0,05
HLA+	13 (32,5%)	27 (67,5%)	40	8 (20,0%)	32 (80,0%)	40	p>0,05
HLA-	21 (23,9%)	67 (76,1%)	88	19 (21,6%)	69 (78,4%)	88	p>0,05
ANA+	13 (26,0%)	37 (74,0%)	50	14 (28,0%)	36 (72,0%)	50	p>0,05
ANA-	23 (28,4%)	58 (71,6%)	81	14 (17,3%)	67 (82,7%)	81	p>0,05
DR4+	5 (29,4%)	12 (70,6%)	17	1 (5,9%)	16 (94,1%)	17	p>0,05
DR4-	28 (31,5%)	61 (68,5%)	89	24 (27,0%)	65 (73,0%)	89	p>0,05
<b>Total</b>	135	343	478	106	372	478	

**Tabelle 11: 2G/ 6T Allel im Zusammenhang zu den Autoantikörper sowie Nachweis von HLA und DR 4 ( $\chi^2$  Test p>0,05)**

Eine Korrelation zwischen dem Vorliegen der Allele und den Parametern Rheumafaktornachweis, ANA-Positivität, Nachweis von HLA DR 4 fand sich nicht.

### 3.9 Röntgenbefunde

Röntgenbilder und die dazugehörigen Befunde der besonders betroffenen Gelenke wurden zur Beurteilung einer etwaigen erosiven Veränderung des Gelenkknorpels herangezogen.

Die Röntgenbefunde wurden ebenfalls in positiv (Erosionen) Gruppe 1 und negativ (keine Erosionen) Gruppe 0 unterteilt.

Bei 69,7% der Kinder waren in den Röntgenbildern keine, bei 30,3 % der Kinder waren erosive Veränderungen sichtbar.

Die Einteilung in Patienten ohne Veränderungen (Gruppe 0) und Patienten mit erosiven Veränderungen (Gruppe 1) im Gelenk mit Blick auf die MMP Allel Häufigkeiten ergab folgendes:

	MMP 1 Allel			
Gelenk	0	1	Total	
0	25 (37,3%)	50 (66,7%)	75	p>0,05
1	6 (20,0%)	24 (80,0%)	30	p>0,05
Total	31	74	105	

**Tabelle 12: Gelenkveränderungen in 2 Gruppen (0=keine, 1=Veränderungen) in Bezug zu dem MMP 1 2G Allel ( $\chi^2$  Test, p>0,05)**

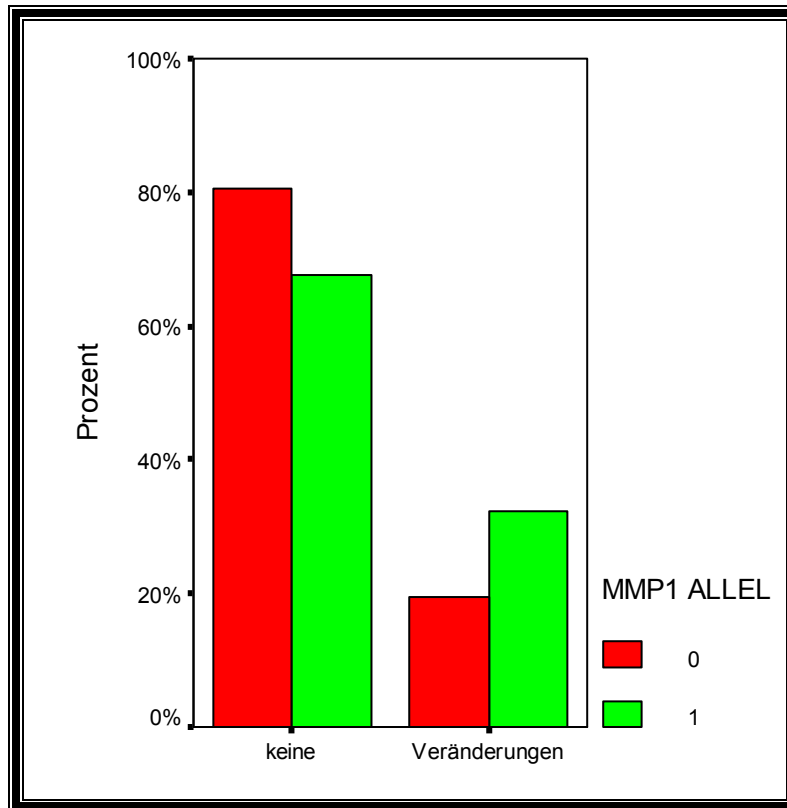
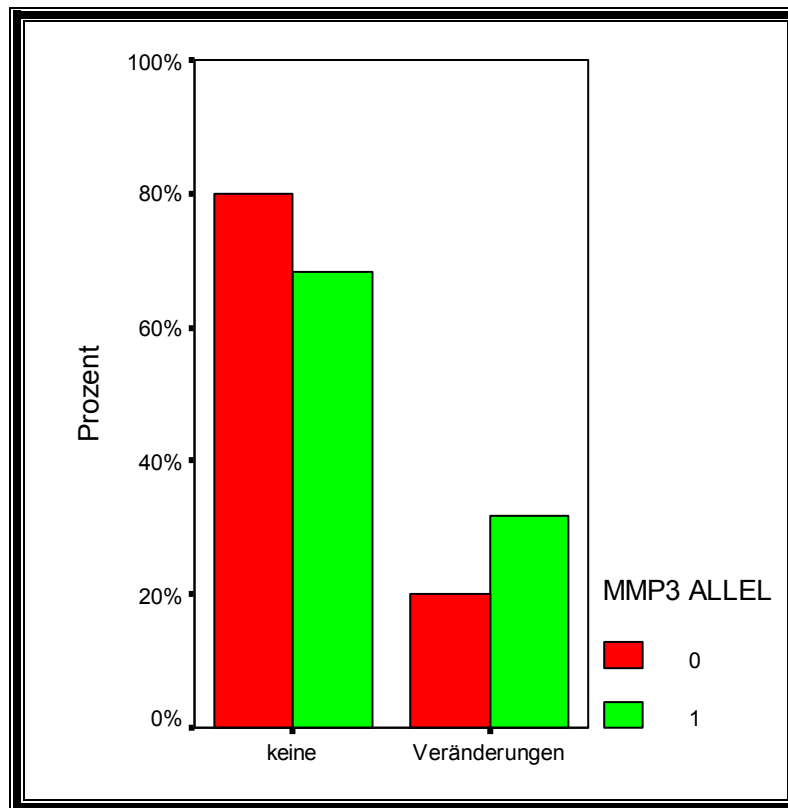


Abbildung 8: Darstellung der radiologischen Veränderungen mit Blick auf das MMP 1 Allel ( $\chi^2$  Test,  $p>0,05$ )

Gelenk	MMP 3 Allel		Total	
	0	1		
0	20 (26,3%)	56 (73,7%)	76	$p>0,05$
1	5 (16,1%)	26 (83,9%)	31	$p>0,05$
<b>Total</b>	25	82	107	

Tabelle 13: Erosive Veränderungen mit Blick auf das MMP 3 6T Allel ( $\chi^2$  Test,  $p>0,05$ )



**Abbildung 9: MMP 3 Allel und radiologische Veränderungen ( $\chi^2$  Test,  $p > 0,05$ )**

Dieses Ergebnis, sowohl in der MMP 1 als auch in der MMP 3 Gruppe erwies sich im  $\chi^2$ -Test als nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

Die radiologischen Befunde in den Röntgenbildern wurden zusätzlich zu der oben aufgeführten Graphik noch in den JIA Subtypen hinsichtlich ihres Auftretens untersucht.

Dieses Ergebnis ist der folgenden Tabelle zu entnehmen.



<b>JIA</b>	<b>Keine</b>	<b>Erosive Veränderungen</b>	<b>Total</b>
<b>1</b>	5 (83,3%)	1 (16,7%)	6
<b>2</b>	21 (56,8%)	16 (43,2%)	37
<b>3</b>	2 (28,6%)	5 (71,4%)	7
<b>4a</b>	25 (89,3%)	3 (10,7%)	28
<b>4b</b>	1 (20,0%)	4 (80,0%)	5
<b>5</b>	21 (77,8%)	6 (22,2%)	27
<b>6</b>	8 (88,9%)	1 (11,1%)	9
<b>Total</b>	83 (69,7%)	36 (30,3%)	119

**Tabelle 14: Darstellung der Gelenkveränderungen in den jeweiligen JIA Subgruppen ( $\chi^2$  Test,  $p > 0,05$ )**

Die durchschnittliche Erkrankungsdauer der Kinder lag bei 75,078 Monaten, mit einem Minimum von 5,1 und einem Maximum von 241,5 Monaten.

Die Auswertung und Darstellung der Häufigkeiten der klinischen und laborchemischen Parameter in Bezug auf die einzelnen JIA Subtypen ergab aufgrund der teilweise zu kleinen Patientenzahlen kein statistisch valides Ergebnis. Somit konnte eine genaue Auswertung mit Blick auf die einzelnen Subgruppen nicht erfolgen, sondern nur hinsichtlich der Gesamtheit der Patienten.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Vorhaben**

Die genetischen Grundlagen der juvenilen idiopathischen Arthritis bleiben nur unvollständig verstanden.

Hinsichtlich der Rolle des Immunsystems hatte man sich bislang auf die Genetik der HLA Klassen konzentriert. Ziel dieser Arbeit war es, die genetischen Grundlagen des Matrix Metalloproteinase Promoter Polymorphismus (MMP 1/ MMP 3) zu charakterisieren und sie mit den Subtypen und klinischen Symptomen der JIA in Bezug zu bringen. Die erarbeiteten Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt und mit denen anderer Autoren verglichen.

### **4.2 Hypothesen**

Vor Beginn der Arbeit war eine Korrelation von einem der Polymorphismen mit einer erhöhten Krankheitsaktivität oder einem Einfluss auf die Knorpel,- und Knochendestruktion vermutet worden.

Von anderen Autoren war über einen Polymorphismus der MMP 1 und 3 Promoter Region mit den Folgen einer Veränderung der Transkription berichtet worden. Rutter et al., 1998 schrieb über den MMP 1 Promoter Polymorphismus: „ Die Steigerung der Transkription ist abhängig von 2G an der Stelle -1607 bp. Laut Rutter kann die Kombination aus MMP 1 Polymorphismus und spezifischen Interleukinen die Transkription dramatisch steigern und auf diesem Weg zu einem vermehrten Abbau von Extrazellulärmatrix führen.

Die Enzymaktivität von MMP 1 und 3 korreliert signifikant mit der Makrophagen Infiltration und dem Grad der Entzündung (Gattorno et al., 2002).

Laut Matsuyama T. (1999) sind die MMP 3 Aktivitäten bei JIA Patienten mit Arthritis deutlich höher als bei Patienten ohne Arthritis.

Diese Aussagen lassen einen Zusammenhang der Polymorphismen mit einer veränderten Expression und verstärkten proinflammatorischen Aktivität der Metalloproteinase vermuten. Gekennzeichnet sind jene Metalloproteinase durch ihre Fähigkeit extrazelluläre Matrix abzubauen. Als Folge der pathologischen Transkription aufgrund des Promoter

Polymorphismus lag ein gestörter Abbau von Kollagenen und Proteoglykanen nahe. Dies spielt bei der JIA in Form von chronischen Knorpel-, und Knochenschäden eine große Rolle.

### 4.3 Häufigkeiten

Die Häufigkeitsverteilung der einzelnen JIA Gruppen unter den Patienten entsprechen Literaturangaben, nach denen der Typ 2 (32,7% in vorliegender Arbeit) und Typ 4a (20,6%) die häufigsten sind. Das Geschlechterverhältnis beträgt in dieser Studie 60,1% Mädchen und 39,9% Jungen.

Es kann somit von einer repräsentativen Verteilung der Subtypen und der Geschlechtsverteilung in der Patientenpopulation in vorliegender Promotionsarbeit ausgegangen werden.

Zur Kontrolle der relativen Häufigkeiten in der Bevölkerung der drei verschiedenen Genotypen und der Allelfrequenzen wurde das Blut von 244 gesunden, über den Verwendungszweck der Blutprobe aufgeklärten Personen (57,0% Frauen, 43,0% Männer) analysiert. Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe eines SPSS Programmes hinsichtlich ihrer Bedeutung untersucht.

Der t-Test wurde verwendet um 2 unabhängige Gruppen hinsichtlich eines Mittelwertes zu vergleichen. Der  $\chi^2$  Test, um 2 unabhängige Gruppen in Bezug auf relative Häufigkeiten zu untersuchen.

Nach der statistischen Auswertung kann festgestellt werden, dass für die Genotypen der MMP 1 und MMP 3 Promoter Region in den beiden unabhängigen Bevölkerungsgruppen der Patienten und Kontrollen kein Unterschied hinsichtlich der Verteilung besteht ( $\chi^2$  Test  $p > 0,05$ ). Die Häufigkeiten der Genotypen unterscheiden sich nur unwesentlich, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die an der JIA erkrankten Kinder kein gehäuftes Auftreten eines bestimmten Genotyps aufweisen. Ein sehr ähnliches Verteilungsmuster in den untersuchten Gruppen zeigen auch die Allelfrequenzen, sodass auch hier kein relevanter Unterschied besteht. Zu dem gleichen Ergebnis kommt Constantin et al., in seinen Arbeiten 2002 und 2003 über die MMP 1 und MMP 3 Polymorphismen in Bezug auf die rheumatoide Arthritis: „Allel Häufigkeiten und Genotyp Frequenzen unterscheiden sich nicht zwischen Patienten und Kontrollen.“ Das Auftreten der Erkrankung ist nicht mit einem bestimmten Genotyp assoziiert.

## 4.4 Klinische Symptome

### 4.4.1 Gelenkschwellung

Die typischen Symptome der JIA wurden in Form der Gelenkschwellung bei jedem Kind erhoben, dokumentiert und statistisch ausgewertet

Es resultierte eine deutliche Verbindung zwischen der Anwesenheit des 2G Allels in der MMP 1 Promoter Region (t-Test,  $p=0,031$ ) und der Anwesenheit des MMP 3 6T Allels (t-Test,  $p=0,043$ ) und der Anzahl geschwollener Gelenke.

Die Kinder mit einer Schwellung in einem oder mehreren Gelenken wiesen signifikant häufiger den 2G/ 6T Typ (heterozygot oder Wildtyp) auf, als Kinder ohne.

Die Gelenkschwellung ist als Reaktion auf eine im Gelenk ablaufende Entzündung zu sehen.

Zu dieser Entzündung kommt es aufgrund einer Interaktion zwischen aktivierten Lymphozyten und Monozyten, Makrophagen und synovialen Fibroblasten. Neben IL-1 und IL-6 wird auch der TNF- $\alpha$  gebildet. IL-1 ist verantwortlich für die Aktivierung verschiedener Metalloproteinasen, die chondro-, und osteolytische Effekte vermitteln. Zusätzlich sind sowohl TNF- $\alpha$  als auch IL-1 in der Lage spezifische TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinase) zu hemmen und so indirekt die Knorpelschädigung zu unterstützen (Laufer et al., 2002).

Eine erhöhte lokale Produktion von proinflammatorischen Zytokinen scheint für die artikuläre Manifestation der JIA mit verantwortlich zu sein (Kutukculer et al., 1998).

Patienten mit einer JIA haben im synovialen Gewebe hauptsächlich eine Expression von proinflammatorischen Zytokinen mit einer Verminderung der antiinflammatorischen (Harjack et al., 2000).

Aufgrund der beschriebenen MMP Promoter Polymorphismen kommt es in Folge der Zytokinstimulation zu einer gesteigerten Enzymaktivität der MMPs (Wyatt et al., 2002, Szylo et al., 2002, Matthey et al., 2004).

Ghilardi et al., veröffentlichte 2001 eine Arbeit in der er feststellte, dass es aufgrund eines einzelnen Guanin Insertions Polymorphismus (1G/ 2G) in der MMP 1 Promoter Region zu einer Erhöhung der Transkriptionsaktivität kommt und daraus eine verstärkte lokale Enzymexpression resultiert.

In seiner Arbeit über MMP 1 und 3 Aktivitäten im Serum und in der Synovialflüssigkeit von JIA Patienten stellte Peake et al., 2005 fest, dass die gemessenen MMP 1 und 3 Konzentrationen erhöht waren und mit der Anzahl aktiver Gelenke korrelierten.

Betrachtet man die Ergebnisse aus vorliegender Promotionsarbeit, zusammen mit den Kommentaren von Ghilardi und Peake erscheinen das 2G und das 6T Allel als bedeutende Faktoren in dem JIA assoziierten Gelenkbefall.

Die gesteigerte Transkription aufgrund der Polymorphismen und die konsekutive erhöhte lokale Aktivität der Metalloproteinase 1 führt zu einer lokalen Entzündung mit den typischen Zeichen Tumor, Rubor, Dolor und Functio laesa.

Der resultierte Zusammenhang zwischen dem Vorkommen des 2 G/ 6T Allels bei den an einer JIA erkrankten Kindern und der persistierenden Gelenkschwellung als Zeichen einer gesteigerten lokalen inflammatorischen Aktivität verstärken den Verdacht, dass dem MMP 1/ 3 Promoterpolymorphismus in der multifaktoriellen Genese der JIA eine wichtige Rolle zukommt.

Da die Verteilung der Polymorphismen und der Allelfrequenzen der Patienten sich nicht von der der Kontrollen unterscheidet, scheinen die Polymorphismen jedoch keine direkte Rolle hinsichtlich der Krankheitsentstehung zu spielen, sondern vielmehr bei einer bereits vorhandenen Disposition zu rheumatischen Erkrankungen mit konsekutivem Gelenkbefall zu einer verstärkten Krankheitsaktivität zu führen.

#### **4.4.2 CRP, BSG**

Die über die klinischen Symptome hinaus erhobenen laborchemischen Parameter (CRP, BSG) wurden ebenfalls auf einen Zusammenhang mit den Allelen hin untersucht. Hieraus ergab sich keine signifikante Korrelation ( $\chi^2$  Test,  $p > 0,05$ ).

In seiner Arbeit (Peake et al., 2005) wurde eine Korrelation zwischen MMP 1/ 3 Werten und Entzündungsparametern bei der JIA nachgewiesen. In dieser Studie wurden die MMP 1 und 3 Konzentrationen (gemessen mit ELISA) mit den Entzündungsparametern korreliert.

Gattorno et al., veröffentlichte 2002 eine Arbeit in der er ebenfalls die Expression und somit die Konzentration der Metalloproteinasen 1 und 3 im synovialen Gewebe in Beziehung setzte zum Grad der Entzündung. Dieser gelangte auch zu dem Ergebnis, dass bei der JIA die Expression von MMP 1 und 3 im Gewebe deutlich mit der Entzündung korrelierte.

In vorliegender Doktorarbeit wurden jedoch die Allelfrequenzen mit der Krankheitsaktivität in Bezug gesetzt. Hieraus resultierte, im Vergleich zu oben zitierten Arbeiten kein signifikantes Ergebnis.

Die Annahme, ein veränderter Promoter aufgrund eines Polymorphismus mit konsekutiv gesteigerter Enzymexpression würde mit erhöhten Entzündungsparametern korrelieren, lässt sich an Hand der vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigen.

#### **4.4.3 Immunmarker**

Des Weiteren sind bei allen Kindern die immunologischen Marker RF, ANA, HLA B 27, DR 4 auf ihr Vorhandensein hin untersucht und mit den MMP Allelfrequenzen korreliert worden. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen diesen oder einem bestimmten Genotyp ( $\chi^2$  Test,  $p>0,05$ ).

#### **4.5 Medikamente**

Als weiteres Kriterium einer erhöhten Krankheitsaktivität wurde die Anzahl der verordneten und eingenommenen Medikamente herangezogen. Der Verdacht, dies würde mit einem vermehrten Auftreten einer der Polymorphismen zusammenhängen, bestätigte sich nicht. Mit einem t-Test  $p>0,05$  konnte keine Korrelation nachgewiesen werden.

#### **4.6 Röntgenbefunde**

Die Röntgenbefunde der erkrankten Gelenke wurden ebenfalls auf einen Bezug zu den Allelfrequenzen hin analysiert.

Als Folge der chronischen Entzündungsreaktion kommt es bei einigen Patienten zu im Röntgenbild sichtbaren Veränderungen. Die Metalloproteinasen mit ihrer Fähigkeit extrazelluläre Matrix abzubauen, standen im Verdacht aufgrund pathologischer Prozesse im Gelenk vermehrt zu solchen Veränderungen (z.B. Gelenkspaltverschmälerungen, Usuren und Knochenerosionen) zu führen. Die Auswertung der Röntgenbilder (keine Veränderungen und sichtbare Veränderungen) mit Blick auf die Genotypen und Allelfrequenzen ergaben dennoch

keinen Hinweis in diese Richtung. Mit einem  $\chi^2$  Test  $p > 0,05$  (MMP 1 und 3) konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis muss jedoch kritisch betrachtet werden, da sich bei der Befundung der Bilder einige Probleme ergaben.

Im Gegensatz zu den anderen klinischen Befunden wurden die Bilder von verschiedenen Radiologen begutachtet, was einen direkten Vergleich erschwerte.

Es war nicht bei allen Kindern möglich, nach einer bestimmten Krankheitsdauer (z.B. 5, 10 Jahre) den Gelenkstatus sichtbar zu machen, sodass über eine etwaige Progredienz der radiologischen Veränderungen nur schwer eine Aussage getroffen werden konnte.

Die Anzahl der Kinder in einigen der JIA Gruppen war teilweise zu klein, sodass eine valide statistische Auswertung mit Blick auf die einzelnen Krankheitsentitäten nicht gemacht werden konnte, sondern nur auf die Gesamtheit der JIA Patienten. Ob nach einer Verbesserung der oben genannten Gründe nicht doch eine signifikante Korrelation zwischen den MMP Polymorphismen und einer radiologischen Progression bestehen würde, kann somit nicht endgültig ausgeschlossen werden.

#### **4.7 Zusammenfassung**

Forre et al äußerte über die JIA 2002 folgendes: die Interaktion zwischen verschiedenen Genen scheint notwendig zu sein für die Entstehung der Krankheit. Die Kenntnis über die involvierten Gene würde helfen die molekularen Mechanismen zu verstehen und hätte eventuell Konsequenzen für die Prognose und Therapie. Die JIA ist assoziiert mit signifikanten und konstanten Serum Veränderungen von inflammatorischen Zytokinen (Mangge et al., 1995).

Aufgrund der Ergebnisse aus vorliegender Arbeit kann man festhalten, dass mit der Analyse der Genetik des Metalloproteinase 1 und 3 Promoter Polymorphismus ein weiteres Puzzleteil in der multifaktoriellen Ätiologie des JIA assoziierten Gelenkbefalles gefunden worden ist.

Zusammen mit anderen Imbalancen der involvierten Transmitter (TNF, IL, Timp) erzeugen sie ein proinflammatorisches Milieu in dem betroffenen Gelenk, und führen so zu chronischen Störungen der Gelenkflächen und letztendlich zu Funktionsstörungen.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Alexander JP, Acott TS: involvement of the erk map kinase pathway in tnf alpha regulation trabecular matrix metalloproteinases and timp. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44 (2003) 164-169
2. Al-Matar MJ, Petty RE, Tucker LB, Malleson PN, Schroeder ML, Cabral DA: the early pattern of joint involvement predicts disease progression in children with oligoarticular (pauciarticular) juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46(10) (2002) 2708-15
3. Andreakos E, Smith C, Kiriakidis S, Monaco C, de Martin R, Brennan FM, Paleolog E, Feldmann M, Foxwell BM: heterogeneous requirement of ikk kinase 2 for inflammatory cytokine and matrix metalloproteinase production in rheumatoid arthritis: implications for therapy. *Arthritis Rheum* 48(7) (2003) 1901-12
4. Archambault J, Tszaki M, Herzog W, Banes AJ: stretch and interleukin-1beta induce matrix metalloproteinases in rabbit tendon cells in vitro. *Ortop Res* 20(1) (2002) 36-9
5. Archambault JM, Elfervig-Wall MK, Tszaki M, Herzog W, Banes AJ : rabbit tendon cells produce mmp-3 in response to fluid flow without significant calcium transients. *Biomech* 35(3) (2002) 303-9
6. Arihiro S, Ohtani H, Hiwatashi N, Torii A, Sorsa T, Nagura H.: vascular smooth muscle cells and pericytes express mmp-1, mmp-9, timp-1 and type 1 procollagen in inflammatory bowel disease. *Histopathology* 39(1) (2001) 50-9
7. Bai G, Howell DS, Howard GA, Roos BA, Cheung HS: basic calcium phosphate crystals up-regulate metalloproteinases but down-regulate tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in human fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage* 9(5) (2001) 416-22



8. Barron KS, Decunto CL, Montalvo JE, Orson FM, Lewis DE: abnormalities of immunoregulation in juvenile rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* 16(7) (1989) 940-948
9. Battista Di JA, Pelletier JP, Zafarullah M, Fujimoto N, Martel-Pelletier J.: coordinate regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase expression in human synovial fibroblasts. *Rheumatol Suppl* 43 (1995) 123-8
10. Benedetti De F, Pignatti P, Gerloni V, Massa M, Sartirana P, Caporali R, Montecucco CM, Cort A, Fantini F, Martini A.: differences in synovial fluid cytokine levels between juvenile and adult rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 24(7) (1997) 1403-9
11. Benedetti De F, Pignatti P, Bernasconi S, Gerloni V, Matsushima K, Caporali R, Montecucco CM, Sozzani S, Fantini F, Martini A : interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with juvenile rheumatoid arthritis. relations to onset types, disease activity, and synovial fluid leukocytes. *J Rheumatol* 26(2) (1997) 425-31
12. Benedetti De F, Pignatti P, Gerloni V, Massa M, Sartirana P, Caporali R, Montecucco CM, Corti A, Fantini F, Martini A: differences in synovial fluid cytokine levels between juvenile and adult rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 24 (1997) 1403-1409
13. Beertsen W, Holmbeck K, Niehof A, Bianco P, Chrysovergis K, Birkedal-Hansen H, Everts V: on the role of mt1-mmp, a matrix metalloproteinase essential to collagen remodelling, in murine molar eruption and root growth. *Eur J Oral Sci* 110(6) (2002) 445-51
14. Bernbeck R, Dahmen G: *Kinderorthopädie*. 3. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1983, S. 355-360
15. Brennan FM, Browne KA, Green PA, Jaspar JM, Maini RN, Feldmann M: 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(6) (1997) 643-50

16. Brostrom E, Haglund-Akerlind Y, Hagelberg S, Cresswell AG: gait in children with juvenile chronic arthritis. timing and force parameters. *Scand J Rheumatol* 31(6) (2002) 317-23
17. Brown DG, Edwards NL, Greer JM, Longley S, Gillespy T, Panush RS: magnetic resonance imaging in patients with inflammatory arthritis of the knee. *Clin rheumatol* 9(1) (1990) 73-83
18. Cha HS, Ahn KS, Jeon CH, Kim J, Song YW, Koh EM: influence of hypoxia on the expression of matrix metalloproteinase-1,-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Clin Exp Rheumatol* 21(5) (2003) 593-8
19. Charmley P, Nepom BS, Concannon P: hla and t cell receptor  $\beta$ -chain dna polymorphisms identify a distinct subset of patients with pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 37(5) (1994) 695-701
20. Chikanza IC: neuroendocrine immune features of pediatric inflammatory rheumatic disease. *Ann N Y Acad Sci* 22 (1999) 71-82
21. Chini L, Bardare M, Cancrini C, Angelini F, Mancina L, Cortis E, Finocchi A, Riccardi C, Rossi P: evidence of clonotypic pattern of t-cell repertoire in synovial fluid of children with juvenile rheumatoid arthritis at the onset of the disease. *Scand J Immunol* 56(5) (2002) 512-7
22. Choi EY, Kim D, Hong BK, Kwon HM, Song YG, Byun KH, Park HY, Whang KC, Kim HS: upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (emprin) and gelatinases in human atherosclerosis infected with chlamydia pneumoniae: the potential role of chlamydia pneumoniae infection in the progression of atherosclerosis. *Exp. Mol. Med.* 31 (2002) 391-400
23. Choy EHS, Panayi GS: cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 344(12) (2001) 907-916
24. Constatin A, Lauwers-Cances V, Navaux F, Abbal M, Meerwijk van A, Mazieres

B, Combon-Thomsen A, Cantagrel A: collagenase-1 (mmp-1) and hla-drb1 gene polymorphism in rheumatoid arthritis: a prospective longitudinal study. *The Journal of Rheumatology* 29(1) (2001) 15-20

25. Constatin A, Lauwers-Cances V, Navaux F, Abbal M, Meerwijk van A, Mazieres B, Combon-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* 48 (9) (2003) 2695-6

26. 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(10) (2001) 2263-74

27. Date Y, Seki N, Kamizono S, Higuchi T, Hirata T, Miyata K, Ohkuni M, Tatsuzawa O, Yokota S, Joo K, Ueda K, Sasazuki T, Kimura A, Itoh K, Kato H: identification of a genetic risk factor for systemic juvenile rheumatoid arthritis in the 5`- flanking region of the tnf alpha gene and hla genes. *Arthritis Rheum* 42(12) (1999) 2577-82

28. Dequeker J, Mardjuadi A: prognostic factors in juvenile chronic arthritis. *Rheumatol* 9(6) (1982) 909-15

29. Fernandez-Vina M, Fink AW, Stastny P: hla associations in juvenile arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*12 (1994) 205-214

30. Fernandez-Vina M, Fink CW, Stastny P: hla antigens in juvenile arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 33(2) (1990) 1787-1793

31. Field M, Gallagher J, Eskdale J, McGarry F, Richards D, Munro R, Oh HH, Campbell C: tumor necrosis factor locus polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 50 (1997) 303-307

32. Fink CW, Fernandez-Vina M, Stastny P: clinical and genetic evidence that juvenile arthritis is not a single disease. *Pediatric Rheumatology* 42(5) (1995) 1155-1169

33. Forre O, Smerdel A: genetic epidemiology of juvenile idiopathic arthritis. *Scand J Rheumatol* 31(3) (2002) 123-8
34. Freemont AJ, Hampson V, Tilman R, Goupille P, Taiwo Y, Hoyland JA: gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific. *Ann Rheum Dis* 56(9) (1997) 542-9
35. Gare BA, Fast A: epidemiology of juvenile chronic arthritis in southwest sweden: a 5-year prospective population study. *Pediatrics* 90(6) (1992) 950-958
36. Gattorno M, Facchetti P, Ghiotto F, Vignola S, Buoncompagni A, Prigione I, Picco P, Pistoia V: synovial fluid t cell clones from oligoarticular juvenile arthritis patients display a prevalent th1/th0-type-pattern of cytokine secretion irrespective of immunophenotype. *Clin Exp Immunol* 109(1) (1997) 4-11
37. Gattorno M, Vignola S, Falcini F, Sabatini F, Buoncompagni A, Simonini A, Picco P, Pistoia V: serum and synovial fluid concentrations of matrix metalloproteinases 3 and its tissue inhibitor 1 in juvenile idiopathic arthritides. *J Rheumatol* 29(4) (2002) 826-31
38. Gattorno M, Gerloni V, Morando A, Comanducci F, Buoncompagni A, Picco P, Fantini F, Pistoia V, Gambini C: synovial membrane expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor 1 in juvenile idiopathic arthritides. *J Rheumatol* 29(8) (2002) 1774-9
39. Ghilardi G, Biondo ML, Mangoni J, Leviti S, Demonti M, Guagnelli E, Scorza R: matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism 1g/2g is correlated with colorectal cancer invasiveness. *Clin Cancer Res.* 7(8) (2001) 2344-6
40. Glass DN, Giannini EH: juvenile rheumatoid arthritis as a complex genetic trait. *Arthritis and Rheumatism* 42(11) (1999) 2261-2268
41. 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

42. Grom AA, Giannini EH, Glass DN: juvenile rheumatoid arthritis and the trimolecular complex (hla, t cell receptor, and antigen). *Arthritis and Rheumatism* 37(5) (1994) 601-607
43. Harjacek M, Diaz-Cano S, Alman BA, Coburn J, Ruthazer R, Wolfe H, Steere AC: prominent expression of mrna for proinflammatory cytokines in synovium in patients with juvenile rheumatoid arthritis or chronic lyme arthritis. *J Rheumatol* 27(2) (2000) 497-503
44. Jinnin M., Ihn H., Asano Y., Yamane K., Yazawa N., Tamaki K.:serum matrix metalloproteinase-3 in systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 296 (1) (2004) 25-9
45. Katrib A, Smith MD, Ahern MJ, Slavotinek J, Stafford L, Cuello C, Bertouch JV, McNeil HP, Youssef PP: reduced chemokine and matrix metalloproteinase expression in patients with rheumatoid arthritis achieving remmission. *J.Rheumatol.* 30 (2003) 10-21
46. Keller, ET: the role of activity in prostate cancer skeletal metastases. *Drugs Today* 38 (2002) 91-102
47. 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 matrix metalloproteinases 1 (timp-1), and mmp-1/timp -1 complex on rheumatic disease. correlation with clinical activity of rheumatoid arthritis versus other surrogate markers. *J Rheumatol* 26(2) (1999) 251-8
48. Khalkali-Ellis Z, Seftor EA, Nieva DR, Seftor RE, Smaha HA, Bultman L, Larco De JE, Ince A, Moore TL, Hendrix MJ: induction of invasive and degradative phenotype in normal synovial fibroblasts exposed to synovial fluid from patients with juvenile rheumatoid arthritis: role of mononuclear cell population. *J Rheumatol* 24(12) (1997) 2451-60
49. Khani-Hanjani A, Hoar D, Horsman D, Keown P: identification of four novel dinucleotide repeat polymorphisms in the tnf-alpha and tnf-beta genes. 61(5) (2000) 511-2
50. Koivuniemi R, Leirisalo-Repo M: juvenile chronic arthritis in adult life: a study of long-term outcome in patients with juvenile chronic arthritis or adult rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 18(3) (1999) 220-6

51. Kutukculer N, Caglayan S, Aydogdu F: study of proinflammatory (tnf-alpha, il-1 alpha, il-6) and t-cell-derived (il-2, il-4) cytokines in plasma and synovial fluid of patients with juvenile chronic arthritis: correlations with clinical and laboratory parameters. *Clin Rheumatol* 17(4) (1998) 288-92
52. Lacki 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
53. Lang B A, Shore A: a review of current concepts on the pathogenesis of juvenile rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* 21(17) (1990) 1-11
54. Lanone S, Zheng T, Zhu Z, Liu W, Lee CG, Ma B, Chen Q, Homer RJ, Wang J, Rabach LA, Rabach ME, Shipley JM, Shapiro SD, Senior RM, Elias JA: overlapping and enzyme-specific contributions of matrix-metalloproteinases-9 and-12 in il-13-induced inflammation and remodelling. *Clin Invest* 110(4) (2002) 463-74
55. Laufer S, Gay S, Brune K: *Rheumatische Erkrankungen und Entzündungen*. Thieme, Stuttgart, New York, 2002, S.17-57/103-125
56. Le J, Rattner A, Chepda T, Frey J, Chamson A: production of matrix metalloproteinase 2 in fibroblast reaction to mechanical stress in a collagen gel. *Arch Dermatol Res* 249 (9) (2002) 405-10
57. Lepore L, Pennesi M, Saletta A, Perticarari S, Presani G, Prodan M: study of il-2, il-6, tnf- $\alpha$ , inf- $\gamma$  and  $\beta$  in the serum and synovial fluid of patients with juvenile chronic arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 12 (1994) 561-565
58. Leonardi A, Cortivo R, Fregona I, Plebani M, Secchi AG, Abatangelo G: effects of th2 cytokines on expression of collagen, mmp-1, and timp-1 in conjunctival fibroblasts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44 (2003) 183-189

59. Li D, Williams V, Lui L, Chen H, Sawamura T, Antakli T, Mehta JL: lox-1 inhibition in myocardial ischemia-reperfusion injury: modulation of mmp-1 and inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(5) (2002) 1795-801
60. Liem JJ, Rosenberg AM: growth patterns in juvenile rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 21(5) (2003) 663-8
61. Lien G, Flato B, Haugen M, Vinje O, Sorskaar D, Dale K, Johnston V, Egeland T, Forre O: frequency of osteopenia in adolescents with early-onset juvenile idiopathic arthritis: a long-term outcome study of one hundred five patients. *Arthritis Rheum.* 48(8) (2003) 2214-23
62. Lin N, Sato T, Ito A: triptolide, a novel diterpenoid triepoxide from *tripterygium wilfordii* hook. f., suppresses the production and gene expression of pro-matrix metalloproteinases 1 and 3 and augments those of tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 44(9) (2001) 2193-200
63. Lipnick RN, Tsokos GC, Magilavy DB: immune abnormalities in the pathogenesis of juvenile rheumatoid arthritis. *Pediatric Rheumatology* 17 (1991) 843-857
64. Lu J, Chua HH, Chen SY, Chen JY, Tsai CH: regulation of matrix metalloproteinase-1 by epstein-barr virus proteins. *Cancer Res* 63(1) (2003) 256-62
65. Madson KL, Moore TL, Lawrence JN, Osborn TG: cytokine levels in serum and synovial fluid of patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 21(12) (1994) 2359-63
66. Magni-Manzoni S, Rossi F, Pistorio A, Temporini F, Viola S, Beluffi G, Martini A, Ravelli A: prognostic factors for radiographic progression, radiographic damage, and disability in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 48(12) (2003) 3509-17
67. Malagon C, Kerckhove van C, Giannini EH, Taylor J, Lovell DJ, Levinson JE, Passo MH, Ginsberg J, Burke MJ, Glass DN: the iridocyclitis of early onset pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis: outcome in immunogenetically characterized patients. *The Journal of Rheumatology* 19(1) (1992) 160-163

68. Mangge H, Gallistl S, Schauenstein K: long-term follow-up of cytokines and soluble cytokine receptors in peripheral blood of patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J Interferon Cytokine Res* 19(9) (1999) 1005-10
69. Mangge H, Kenzian H, Gallistl S, Neuwirth G, Liebmann P, Kaulfersch W, Beaufort F, Muntean W, Schauenstein K: serum cytokines in juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 38 (1995) 211-220
70. Manicourt DH, Fujimoto N, Obata K, Thonar EJ: levels of circulating collagenase, stromelysin-1, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 in patients with rheumatoid arthritis. relationship to serum levels of antigenic keratin sulphate and systemic parameters of inflammation. *Arthritis Rheum* 38(8) (1995) 1031-9
71. Manners P, Lesslie J, Speldewinde D, Tunbridge D: classification of juvenile idiopathic arthritis: should family history be included in the criteria? *J Rheumatol* 30(8) (2003) 1857-63
72. Maria A, Malnati MS, Poggi A, Pende D, Cottofava F, Moretta L: clonal analysis of joint fluid t lymphocytes in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* 19(1) (1990) 1073-1078
73. Masuhara K, Nakai T, Yamaguchi K, Yamasaki S, Sasaguri Y: significant increases in serum and plasma concentrations of matrix metalloproteinases 3 and 9 in patients with rapidly destructive osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* 46(10) (2002) 2625-31
74. Mathies H, Schneider P: *Medizin von heute: Rheumatische Erkrankungen*. Deutscher Ärzteverlag GmbH, Köln, 1984,130-137
75. Matsuyama T: tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and matrix metalloproteinases-3 in japanese healthy children and in kawasaki disease and their clinical usefulness in juvenile rheumatoid arthritis. *Pediatr Int.* 41(3) (1999) 239-45



76. Matthey DL, Nixon NB, Dawex PT, Ollier WE, Hajeer AH: association of matrix metalloproteinase 3 promoter genotype with disease outcome in rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* 5(2) (2004) 147-9
77. Mazzetti I, Magagnoli G, Paoletti S, Uguccioni M, Olivotto E, Vitellozzi R, Cattini L, Facchini A, Borzi RM: a role for chemokines in the induction of chondrocytes phenotype modulation. *Arthritis Rheum* 50(1) (2004) 112-22
78. Mehraban F, Kuo SY, Riera H, Chang C, Moskowitz RW: prostromelysin and procollagenase genes are differentially up-regulated in chondrocytes from the knees of rabbits with experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 37(8) (1994) 1189-97
79. Minden K, Kiessling U, Listing J, Niewerth M, Doring E, Meinicke J, Schontube M, Zink A: prognosis of patients with juvenile arthritis and juvenile spondyloarthropathy. *J Rheumatol.* 27(9) (2000) 2256-63
80. Minden K. Epidemiologische Aspekte entzündlich-rheumatischer Erkrankungen im Kindesalter; 50 Jahre II. Kinderklinik am Klinikum Buch, Microsoft Power Point Präsentation, 2002
81. Moore TL: immunopathogenesis of juvenile rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 11(5) (1999) 377-83
82. Mu H, Chen JJ, Jiang Y, King MA, Thomson G, Criswell LA: tumor necrosis factor a microsatellite polymorphism is associated with rheumatoid arthritis severity through an interaction with the hla-drm1 shared epitope. *Arthritis and Rheumatism* 42(3) (1999) 438-442
83. Muller K, Herner EB, Stagg A, Bendtzen K, Woo P: inflammatory cytokines and cytokine antagonists in whole blood cultures of patients with systemic juvenile arthritis. *Br J Rheumatol* 37(5) (1998) 562-9
84. Murray K, Thompson SD, Glass DN: pathogenesis of juvenile chronic arthritis: genetic and environmental factors. *Archives of Disease in Childhood* 77 (1997) 530-534

85. Net van der J, Prakken AB, Helders PJ, Berge ten M, Herwaarden van M, Sinnema G, Wilde de EJ, Kuis W: correlates of disablement in polyarticular juvenile chronic arthritis—a cross-sectional study. *The British Journal of Rheumatology* 35(1) (1996) 91
86. Oelmann E, Herbst A, Zuhlsdorf M, Albrecht O, Nolte A, Schmitmann C, Manzke O, Diehl V, Stein H, Berdel WE: tissue inhibitor of metalloproteinases 1 is an autocrine and paracrine survival factor, with additional immune-regulatory functions, expressed by hodgkin/reed-sternberg cells. *Blood* 99(1) (2002) 258-67
87. Oen K, Malleson PN, Rosenberg AM, Petty RE, Reed M, Schroeder ML, Cheang M.: early predictors of longterm outcome in patients with juvenile rheumatoid arthritis: subset-specific correlations. *Rheumatol* 30(3) (2003) 585-93
88. Onodera S, Kaneda K, Mizue Y, Koyama Y, Fujinaga G, Nishihira J: Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis. *J Biol Chem.* 275(1) (2000) 444-50
89. Ou L.S, See LC, Wu CJ, Kao CC, Lin YL, Huang JL: association between serum inflammatory cytokines and disease activity in juvenile idiopathic arthritis. *Clin Rheumatol* 21(1) (2002) 52-6
90. Ozen S, Alikasifoglu M, Bakkaloglu A, Duzova A, Jarosova K, Nemcova D, Besbas N, Vencovsky J, Tuncbilek E: tumor necrosis factor alpha g-->a-238 und g-->a-308 polymorphisms in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology* 41(2) (2002) 223-7
91. Paus AC, Dale K: arthroscopic and radiographic examination of patients with juvenile rheumatoid arthritis before and after open synovectomy of the knee joint. a prospective study with a 5-year follow-up. *Ann Chir Gynaecol* 82(1) (1993) 55-61
92. Peake NJ, Khawaja K., Myers A., Jones D., Cawston TE., Rowan AD., Foster HE.: levels of matrix metalloproteinase (MMP)-1 in paired sera and Synovial fluids of juvenile idiopathic arthritis patients: relationship to inflammatory activity, MMP-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in a longitudinal study. *Rheumatology* 44 (11) (2005) 1383-9

93. Perlman H, Bradley K, Liu H, Cole S, Shamiyeh E, Smith RC, Walsh K, Fiore S, Koch AE, Firestein GS, Haines GK 3<sup>rd</sup>, Pope RM: il-6 and matrix metalloproteinase-1 are regulated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in synovial fibroblasts. *J. Immunol.* 15 (2003) 838-845
94. Petty RE, Hunt DWC: immunity to ocular and collagen antigens in childhood arthritis and uveitis. *Int Arch Allergy Immunol* 89 (1989) 31-37
95. Pham DN, Chu HW, Martin RJ, Kraft M: increased matrix metalloproteinase-9 with elastolysis in nocturnal asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 90 (2003) 72-78
96. Phillips PA, McCarroll JA, Park S, Wu MJ, Pirola R, Korsten M, Wilson JS, Apte MV: rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. *Gut.* 52 (2003) 275-282
97. Pignatti P, Massa M, Travaglini P, Meazza C, Martini A, Benedetti de F: activation-induced cell death and fas-induced apoptosis in patients with systemic or pauciarticular juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 19(3) (2001) 339-44
98. Posthumus MD, Limburg PC, Westra J, Cats HA, Rijswijk van MH: serum levels of matrix metalloproteinase-3 in relation to the development of radiological damage in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 38(11) (1999)1081-1087
99. Posthumus MD, Limburg PC, Westra J, Cats HA, Rijswijk van MH: serum matrix metalloproteinase 3 levels in comparison to C-reactive protein in periods with and without progression of radiological damage in patients with early rheumatoid arthritis 21 (4) (2003) 465-72
100. Quinones S, Saus J, Otani Y, Harris ED, Kurkinen M: transcriptional regulation of human stromelysin. *The Journal of Biological chemistry* 264(14) (1989) 8339-8344
101. Ray A, Kuroki K, Cook JL, Bal BS, Kenter K, Aust G, Ray BK: induction of matrix metalloproteinase 1 gene expression is regulated by inflammation-responsive transcription factor saf-1 in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48(1) (2003) 134-45

102. Ribbens C, Andre B, Kaye O, Kaiser MJ, Bonnet V, Jaspard JM, Groote D, Franchimont N, Malaise MG: synovial fluid matrix metalloproteinase-3 levels are increased in inflammatory arthritides whether erosive or not. *Rheumatology* 39 (2000) 1357-1365
103. Ribbens C, Martin y Porras M, Franchimont N, Kasier MJ, Jaspard JM, Damas P, Houssiau FA, Malaise MG: increased matrix metalloproteinase-3 serum levels in rheumatic disease: relationship with synovitis and steroid treatment. *Ann Rheum Dis* 61(2) (2002) 161-6
104. Rooney M, David J, Symons J, Giovine F, Varsani H, Woo P: inflammatory cytokine responses in juvenile chronic arthritis. *The British Journal of Rheumatology* 34 (1995) 454-460
105. Rossum van MA, Zwindermann AH, Boers M, Dijkmans BA, Soesbergen van RM, Fiselier TJ, Franssen MJ, Cate ten R, Suijlekom-Smit van LW, Wulffraat NM, Kuis W, Luijk van WH, Oostveen JC, Dijkstra PF: radiological features in juvenile idiopathic arthritis: a first step in the development of a standardized assessment method. *Arthritis Rheum.* 48(2) (2003) 507-15
106. 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 Research* 58 (1998) 5321-5325
107. Sakai T, Kambe F, Mitsuyama H, Ishiguro N, Kurokouchi K, Takigawa M, Iwata H, Seo H: tumor necrosis factor alpha induces expression of genes for matrix degradation in human chondrocyte-like hcs-2/8 cells through activation of nf-kappa b: abrogation of the tumor necrosis factor alpha effect by proteasome inhibitors. *J Bone Miner Res* 16(7) (2001) 1272-80
108. Sediva A, Hoza J, Nemcova D, Pospisilova D, Bartunkova J, Vencovsky J: immunological investigation in children with juvenile chronic arthritis. *Med Sci Monit* 7(1) (2001) 99-104

109. Seki N, Kamizono S, Yamada A, Higuchi T, Matsumoto H, Niiya F, Kimura A, Tsuchiya K, Suzuki R, Date Y, Tomita T, Itoh K, Ochi T: polymorphisms in the 5'-flanking region of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene in patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigen* 54 (1999) 194-197
110. Shahin AA, Shaker OG, Kamal N, Hafez HA, Gaber W, Shahin HA: circulating interleukin-6, soluble interleukin-2 receptors, tumor necrosis factor alpha, and interleukin- levels in juvenile chronic arthritis: correlations with soft tissue vascularity assessed by power doppler sonography. *Rheumatol Int* 22(2) (2002) 84-8
111. Shen Y, Li S, Quayle AJ, Mellbye JO, Natvig JB, Forre O: tcr $\delta$ / $\gamma$ + cell subsets in the synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Scand J. Immunol* 36 (1992) 533-540
112. Silvermann ED, Isacovics B, Petsche D, Laxer RM: synovial fluid cells in juvenile arthritis: evidence of selective t cell migration to inflamed tissue. *Clin Exp Immunol* 91 (1993) 90-95
113. Smeets TJ, Barg EC, Kraan MC, Smith MD, Breeveld FC, Tak PP: analysis of the cell infiltrate and expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in arthroscopic synovial biopsies: comparison with synovial samples from patients with end stage, destructive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 62(7) (2003) 635-8
114. So A, Chamot AM, Peclat V, Gerster JC: serum mmp-3 in rheumatoid arthritis: correlation with systemic inflammation but not with erosive status. *Rheumatology* 38(5) (1999) 407-410
115. Spinale FG, Gunasinghe H, Sprunger PD, Baskin JM, Bradham WC: extracellular degradative pathways in myocardial remodeling and progression to heart failures. *J. Card. Fail.* 8 (2002) 332-338
116. Spurbeck WW, Ng CY, Strom TS, Vanin EF, Davidoff AM: enforced expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 affects functional capillary morphogenesis and inhibits tumor growth in a murine tumor model. *Blood* 100(9) (2002) 3361-8

117. Szer W, Sierakowska H, Szer IS: antinuclear antibody profile in juvenile rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* 18(3) (1990) 401-408
118. Szylo K, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Niewiadomski M, Kozłowska E, Kulig A: the promoter polymorphism of the matrix metalloproteinase 3 (mmp3) gene in women with ovarian cancer. *Exp Clin Cancer Res* 21(3) (2002) 357-61
119. Stix B, Kahne T, Sletten K, Raynes J, Roessner A, Rocken C: proteolysis of aa amyloid fibril proteins by matrix metalloproteinases-1,-2,-3. *Am J Pathol* 159(2 82001) 561-70
120. Tanaka M, Ozaki S, Kawabata D, Kishimura M, Osakada F, Okubo M, Murakami M, Nakao K, Mimori T: potential preventive effects of follistatin-related protein /tsc -36 on joint destruction and antagonistic modulation of its autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Int. Immunol.* 15 (2003) 71-77
121. Tetlow LC, Lees M, Woolley DE: comparative studies of collagenase and stromelysin-1 expression by rheumatoid synoviocytes in vitro. *Virchows Arch.* 425(6) (1995) 569-76
122. Thoen J, Waalen K, Forre O, Kvarnes L, Natvig JB: inflammatory synovial t cells in different activity subgroups of patients with rheumatoid arthritis and juvenile arthritis. *Scand J Rheumatol* 18 (1989) 77-88
123. Tolboom TC, Pieterman E, Laan van der WH, Toes RE, Huidekoper AL, Nelissen RG, Breedveld FC, Huizinga TW: invasive properties of fibroblasts-like synoviocytes: correlation with growth characteristics and expression of mmp-1, mmp-3, and mmp-10. *Ann Rheum* 61(11) (2002) 975-80
124. Tomita T, Nakase T, Kaneko M, Shi K, Takahi K, Ochi T, Yoshikawa H: expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 46(2) (2002) 373-8
125. Tsitsami E, Bozzola E, Magni-Manzoni S, Viola S, Pistorio A, Ruperto N, Martini A, Ravelli A: positive family history of psoriasis does not affect the clinical expression and

course of juvenile idiopathic arthritis patients with oligoarthritis. *Arthritis Rheum* 49(4) (2003) 488-93

126. Wagenhäuser FJ: Polyarthritiden. Hans Huber, Bern, 1977, S.99-101/112

127. Weiler C, Nerlich AG, Zipperer J, Bachmeier BE, Boos N: 2002 sse award competition in basic science: expression of major matrix metalloproteinases is associated with intervertebral disc degradation and resorption. *Eur Spine J.* 11(4), (2002) 308-20

128. Wenicke D, Seyfert C, Hinzmann B, Gromnica-Ihle E: cloning of collagenase 3 from the synovial membrane and its expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Rheumatol* 23(4) (1996) 590-5

129. Wong WR, Kossodo S, Kochevar IE: influence of cytokines on matrix metalloproteinases produced by fibroblasts cultured in monolayer and collagen gels. *J Formos Med Assoc.* 100(6) (2001) 377-82

130. Wo P: cytokines in juvenile chronic arthritis. *Baillieres Clin Rheumatol* 12(2) (1998) 219-28

131. 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.* 62 (2002) 7200-7202

132. Ye S, Eriksson P, Hamstens 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(22) (1996) 13055-13060

133. Yilmaz M, Kendirli SG, Altinas D, Bingol G, Antmen B: cytokine levels in serum of patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 20(1) (2001) 30-5

134. Zeggini E, Thomson W, Kwiatkowski D, Richardson A, Ollier W, Donn R: linkage and association studies of single-nucleotide polymorphism-tagged tumor necrosis factor haplotypes in juvenile oligoarthritis. *Arthritis Rheum* 46(12) (2002) 3304-11



## 6 Thesen

1. Rheumatische Erkrankungen sind multifaktoriell bedingt. Die Interaktion mehrerer Gene, die im unterschiedlichen Ausmaß die Disposition bestimmen, im Zusammenspiel mit Umweltfaktoren und Lebensweise führen zur manifesten Erkrankung.
2. Klinische Heterogenität und variable Penetranz erschweren die Aufklärung pathogenetischer Zusammenhänge und genetischer Analysen beim Menschen.
3. Der Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) hat bei der spezifischen Immunreaktion eine wesentliche Bedeutung. Antigenpeptide werden im Komplex mit MHC-Molekülen den antigenspezifischen T-Zellen präsentiert. T-Zellen und die von ihnen sezernierten Zytokine entscheiden über Ausmaß und Art der Immunreaktion. T-Helfer-2-Zellen sind durch die Produktion von Zytokinen charakterisiert und stimulieren Fibroblasten zur Liberation von Metalloproteinasen.
4. Die Bedeutung der Metalloproteinasen in Bezug auf die Krankheitsaktivität wird diskutiert.
5. Die DNA Sequenzierung zur Erfassung der verschiedenen genetischen Varianten wurde im Rahmen dieser Arbeit angewendet. Die Verteilung der Polymorphismushäufigkeiten und Allelfrequenzen wird so quantifizierbar.
6. Die Verteilung der einzelnen Häufigkeiten unterscheidet sich nicht zwischen den beiden unabhängigen Gruppen der Patienten und Kontrollen.
7. Bei der Untersuchung der 3 verschiedenen Promotorgenotypen hinsichtlich einer Gelenkschwellung als Ausdruck einer erhöhten Krankheitsaktivität zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen den Wildtyp Polymorphismen (MMP 1 2G/MMP3 6A) der Metalloproteinasen 1 und 3.

8. Ein Zusammenhang zwischen den Allelfrequenzen und Polymorphismushäufigkeiten mit Blick auf erhöhte Laborparameter (CRP, BSG) als Zeichen einer aktiven Entzündung war nicht feststellbar.
9. Es bestand keine Korrelation zwischen einem gehäuften Vorkommen von bestimmten Immunmarkern (RF, HLA B27, ANA, DR 4) und den MMP Polymorphismen.
10. Des Weiteren wurden die eingenommenen Medikamente als weiteres Kriterium einer erhöhten Krankheitsaktivität mit den verschiedenen Genotypen korreliert. Hieraus resultierte jedoch keine Signifikanz.
11. Als letztes Kriterium wurden die Röntgenbefunde der betroffenen Gelenke hinsichtlich erosiver Veränderungen mit den genetischen Varianten in Bezug gebracht. Es konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden, jedoch war die Patientenzahl in den einzelnen Gruppen teilweise sehr klein, sodass eine signifikante Korrelation nach einer Erhöhung der Patientenzahl in den Untersuchungsgruppen nicht endgültig ausgeschlossen werden kann.
12. Diese Untersuchungsmethoden können auch für zukünftige Analysen genutzt werden.

## **Lebenslauf**

**Tessa Wegmann**

---

Anschrift	Balthasarstr. 11 50670 Köln
Geburtsdatum/-ort	19.12.1978 in Freiburg i. Br.

## **Schulbildung**

---

1985-1989	Grundschule Göggingen West, Augsburg
1989-1998	klösterlich-musisches Mädchengymnasium Maria-Stern, Augsburg
26.06.1998	Allgemeine Hochschulreife

## **Hochschulstudium**

---

WS 99/00-WS 02/03	Medizinstudium an der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg Ärztliche Vorprüfung: 14.09.2001 1. Staatsexamen: 29.08.2002
SS 03-WS 05/06	Studium an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg 2. Staatsexamen: 05.04.2005 3. Staatsexamen: 10.05.2006

## **Praktisches Jahr**

---

Chirurgie	Kreiskrankenhaus Rheinfelden, Universität Basel
Innere Medizin	Hospital Lagomaggiore, Universidad de Cuyo, Mendoza, Argentinien
Neurologie	Universitätsklinikum Erlangen-Nürnberg

## **Ärztliche Tätigkeit**

---

seit 07/2006	Assistenzärztin am Städtischen Klinikum Solingen Abteilung für Innere Medizin / Nephrologie
--------------	------------------------------------------------------------------------------------------------

Köln, den 01.11.2006

## **Selbstständigkeitserklärung**

Tessa Wegmann  
Balthasarstr. 11  
50670 Köln

### **Erklärung an Eides statt**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich meine Dissertationsschrift

#### **Promoter Polymorphismen der Metalloproteinasen 1 und 3 bei Patienten mit juveniler idiopathischer Arthritis**

unter der Leitung von Prof. Dr. med. G. Horneff

allein und selbstständig ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter angefertigt habe, alle hierbei benutzten wissenschaftlichen Arbeiten anderer Autoren und Hilfsmittel genau und vollständig angegeben und nicht versucht habe, an einer anderen Universität zu promovieren. Ich versichere, dass diese Arbeit auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt.

Köln, den 01.11.2006

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Gerd Horneff für die Möglichkeit, unter seiner Aufsicht diese Arbeit anzufertigen, sowie seiner fachkundigen und tatkräftigen Betreuung.

Besonderer Dank gebührt auch Frau Dr. med. Heinrike Schmeling, deren Unterstützung, Hilfe und geduldigen Zusammenarbeit ich vieles zu verdanken habe.

Für die kritische Durchsicht des Manuskriptes danke ich meinem Vater Dr. med. Klaus Wegmann.

Des Weiteren gilt mein Dank all denjenigen, die mich im Laufe der Arbeit immer wieder zur Fertigstellung derselben motiviert, ermuntert und gedrängt haben.

An dieser Stelle danke ich meinen Eltern dafür, dass sie meine Ausbildung nicht nur ermöglicht haben, sondern mich dabei auch vielfältig und verständnisvoll unterstützt haben.