

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Polymorphismen des IL-6-Rezeptor-Gens
(+24013 A/G: Ala31Ala; +48892 A/C: Asp358Ala),
des IL-8-Rezeptor-Gens (+2607G/C:Ser/Thr)
und des
TNFalpha-Gens -238 (G/A)
bei M. Behçet**

**Inaugural – Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard – Karls – Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Kristina Ulrike Anna Storz
aus
Kempten / Allgäu
2006**

Dekan: Professor Dr. Autenrieth

1.Berichterstatter: Fau PD Dr. Ina Kötter

2.Berichterstatter: Herr PD Dr. Jürgen Löffler

Für Ulrike und Florian

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	6
1.1 Klinisches Bild des Morbus Behçet	6
1.2 Epidemiologie des Morbus Behçet	10
1.3 Ätiologie und Pathogenese des Morbus Behçet	11
1.3.1 Genetik	11
1.3.2 Immunpathologie	12
1.4 Diagnostik des Morbus Behçet	14
1.5 Therapie des Morbus Behçet	15
1.6 Zytokine	16
1.6.1 Interleukin 8 und Interleukin 8 Rezeptor A	17
1.6.2 Interleukin 6 und Interleukin 6 Rezeptor	19
1.6.3 TNF alpha	22
1.7 Fragestellung und Zielsetzung	23
2. Material und Methoden	26
2.1 Materialien und Bezugsquellen	26
2.1.1 Geräte	26
2.1.2 Verbrauchsgegenstände	26
2.1.3 Chemikalien	27
2.2 Methoden	27
2.2.1 DNA Extraktion unter Verwendung des QIAamp DNA Tissue Kit	27
2.2.2 Das LightCycler PCR Analysesystem	28
2.2.3 Grundlagen der qualitativen PCR im LightCycler	31
2.2.4 LightCycler PCR	33

2.2.5 LightCycler PCR Protokoll	35
2.2.6 Proben und „Mastermix“	36
2.2.7 Auswertung der LightCycler PCR	39
2.2.8 Statistische Auswertung	39
2.2.9 Patienten- und Kontrollproben	41
3. Ergebnisse	42
3.1 Ergebnisse der qualitativen LightCycler PCR des -238 TNF alpha Polymorphismus	42
3.2 Ergebnisse der qualitativen LightCycler PCR des +2607 IL8RA Polymorphismus	48
3.3 Ergebnisse der qualitativen LightCycler PCR des +48892 IL6R Polymorphismus	55
3.4 Ergebnisse der qualitativen LightCycler PCR des +24013 IL6R Polymorphismus	61
4. Diskussion	67
5. Zusammenfassung	83
6. Literaturverzeichnis	87
Anhang	99
Danksagung	99
Curriculum vitae	100

1. Einleitung

Der türkische Dermatologe Hulusi Behcet beschrieb in seinem 1937 veröffentlichten Aufsatz das Zusammentreffen rezidivierender Mund- und Genitalaphten mit Augenentzündungen im Sinne einer Hypopyon-Iritis und stufte dies als eigenständige, durch ein Virus verursachte Krankheit ein¹¹. Auch der griechische Ophthalmologe Adamantiades berichtete in den dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts über einen Patienten mit oralen und genitalen Aphten, fraglichen Hauteffloreszenzen, rezidivierender Panuveitis und Hypopyon. Diese Symptome führte er auf eine Infektion mit Staphylokokken zurück².

Um beiden Autoren, die die zahlreichen klinischen Ausprägungen der Krankheit als Erste zu einem Formenkreis zusammenschlossen, gerecht zu werden, wird die Krankheit auch als Morbus Adamantiades- Behcet bezeichnet.

Heute wird die Erkrankung als eine systemische Vaskulitis angesehen, die sowohl die Venen als auch die Arterien jeglicher Größe betrifft. Charakteristisch sind rezidivierende orale und genitale Ulzera, Augenmanifestationen und eine Beteiligung des zentralen Nervensystems, des Gastrointestinaltrakts und der Haut.

Die wichtigsten Organmanifestationen dieser seltenen und vielfältigen Krankheit sollen im Folgenden einen Überblick auch über die Differentialdiagnosen verschaffen.

1.1 Klinisches Bild des Morbus Behcet

Aphtöse Ulzera der Mundschleimhaut:

Orale Ulzera sind für gewöhnlich das erste Zeichen der Erkrankung und treten bei 90-100% der Patienten auf^{55,64,82}. Im Vergleich zu gewöhnlichen Aphten der Mundschleimhaut sind diese sehr schmerzhaft und können in der gesamten Mundhöhle vorkommen, häufig jedoch sind sie auf der Zunge, an den Lippen oder an der Backenschleimhaut lokalisiert. Seltener treten sie im Pharynx, Ösophagus oder am Gaumen auf⁶⁴. Die typische Läsion ist rund mit einer

scharfen erythematösen Begrenzung, bedeckt mit einer gelblichen Pseudomembran und durch eine langsame Abheilung innerhalb von 10 Tagen charakterisiert⁸². In Intervallen von einigen Wochen bis Monaten können Rezidive auftreten, so dass bei einigen Patienten Aphten verschiedenen Alters vorhanden sein können⁵⁵.

Genitale Ulzera:

Genitale Ulzera stellen sich morphologisch ähnlich dar wie orale Ulzera, heilen jedoch oft mit Narbenbildung ab⁸². Häufig sind sie an Scrotum und Vulva lokalisiert, können jedoch überall am äußeren Genitale vorkommen, auch die Cervix kann betroffen sein. Urethritis dagegen kommt bei Patienten mit M. Behcet nicht vor und ist somit ein wichtiges Unterscheidungskriterium bezüglich des M. Reiter⁶⁴.

Augenmanifestation:

In 30-70% der Fälle der vor allem weiblichen Patienten findet sich eine Augenbeteiligung^{56,82}. Charakteristisch für M. Behcet ist eine anteriore Uveitis mit Hypopyon, eine sichtbare Eiteransammlung in der Vorderkammer. Diese tritt aber nur bei einem Drittel der Patienten auf. Wesentlich häufiger finden sich posteriore Uveitis, Panuveitis und retinale Vaskulitis, die eine ungleich schwerere Manifestation darstellen, kann es dabei doch zu retinalen Einblutungen und Neovaskularisation kommen. Insgesamt kann dies bei einem Viertel der betroffenen Patienten zur Erblindung führen⁶⁴.

Gastrointestinale Manifestation:

Gastrointestinale Beteiligung wurde häufiger bei Patienten im fernen Osten als bei Patienten des Mittelmeerraumes beschrieben⁹⁷. Auch in der Ausprägung differiert der Erkrankungstyp: so werden bei türkischen Patienten in der Koloskopie multiple, flache und zusammenstehende intestinale Ulzera im

terminalen Ileum gefunden, bei koreanischen Patienten eher einzelstehende, große und tiefe Läsionen⁹⁶.

Insgesamt tritt ein diffuser Bauchschmerz auf, zusammen mit Diarrhoen, Übelkeit, Sodbrennen, Gewichtsverlust und allgemeinen Infektionszeichen wie Schwäche und Fieber^{64,96}. Die Differentialdiagnose M. Crohn liegt daher natürlich nahe und sollte immer mit berücksichtigt werden.

Hautmanifestation:

Hautmanifestationen sind mit 80% häufig und treten oft in Kombination auf. Erythema nodosum tritt vor allem bei Frauen auf und findet sich im allgemeinen an den unteren Extremitäten⁸². Diese schmerzhaften Läsionen heilen normalerweise spontan ab und hinterlassen hyperpigmentierte Areale.

Papulopusteln und akneiforme Papeln sind häufige Begleiterscheinungen, seltener finden sich oberflächliche Thrombophlebitiden⁹⁵.

Der sogenannte Pathergie- Test ist das einzige spezifische Merkmal für M. Behcet, jedoch ist er nur in 60% der Fälle bei türkischen Patienten positiv, bei koreanischen und kaukasischen Patienten in nur 5– 15%⁶⁴. Auch ist er bei anderen Krankheiten wie z.B. dem Sweet-Syndrom ebenfalls positiv⁸².

Durchgeführt wird der Test mittels eines intrakutanen Einstichs mit einer sterilen Nadel, woraufhin sich aufgrund einer kutanen Hypersensivität innerhalb von 48 Stunden eine sterile Papulopustel bildet. Histologisch findet sich eine Neutrophilen- und Lymphozyteninfiltration⁴.

Gelenkmanifestation:

Gelenkbeteiligungen kommen bei ca 80% der Patienten vor⁸². Es finden sich Synovitis, Arthritis und Athralgien, vor allem an den unteren Extremitäten, allerdings verlaufen diese überwiegend ohne Erosionen oder Deformationen. Meist sind weniger als 5 Gelenke betroffen (oligoatrikulär)¹².

Vaskuläre Manifestation:

M. Behcet ist eine systemische Vaskulitis, die sowohl die Venen als auch die Arterien jeglicher Größe betrifft. Eine Beteiligung der Venen ist jedoch insgesamt häufiger, v.a. die Thrombusbildung spielt hierbei eine wichtige Rolle. Allerdings ist das Gerinnungssystem bei Patienten mit M. Behcet intakt²⁸, diskutiert werden einerseits die Hyperhomocysteinämie, die als Risikofaktor für Thrombose und Artherosklerose bekannt ist, andererseits werden die Endothelschäden, die durch die Entzündung entstehen, direkt für die Thrombusbildung verantwortlich gemacht⁴⁰. Hyperhomocysteinämie konnte in der Studie von Aksu et al. bei M. Behcet Patienten nachgewiesen werden⁵, jedoch nicht in der Studie von Korkmaz et al.⁵³.

Eine bei M. Behcet beobachtete Vaskulitis der Vasa vasorum wird teils in Zusammenhang mit arterieller Beteiligung der Gefäße gebracht, da aufgrund einer Degeneration der Arterienwand sowohl arterielle Verschlüsse als auch Aneurysmata entstehen können⁴⁰. Interessanterweise ist eine kardiale Beteiligung sehr selten, obgleich Fälle von Koronararterienstenose und intracardialer Thrombusbildung beschrieben sind⁶⁴.

Die Folgeschäden dieser Thrombus- und Aneurysmatabildung sind beträchtlich und vielfältig- von Schlaganfallsymptomatik bis hin zur Lungenembolie- auch lag die Mortalität aufgrund eines rupturierten Pulmonalarterienaneurysmas in einer Studie bei immerhin 1%³⁸.

ZNS- Manifestation:

Neurologische Manifestationen treten bei 10-20% der vor allem männlichen Patienten auf⁸².

Man unterscheidet zwischen primären parenchymatösen Läsionen (Neuro-Behcet) und sekundären aufgrund von Gefäßschäden. Oft ist der Hirnstamm betroffen, aber auch Rückenmarksschäden und Meningoenzephalitis treten auf⁴⁰.

Die Symptome des Neuro-Behcet sind vielfältig, am häufigsten jedoch finden sich Pyramidenbahn-Zeichen⁸⁵. Unterschieden wird die akute Form des Neuro-

Behcet mit akuter Meningoenzephalopathie mit oder ohne fokalen Läsionen, von der chronischen Form, die durch unaufhaltsam voranschreitende Demenz, Ataxie und Dysarthrie gekennzeichnet ist⁴⁰. Wichtig ist hier die Unterscheidung zur Multiplen Sklerose. Die Ätiologie des Neuro-Behcet bleibt unklar, jedoch zeigt sich eine Assoziation zu HLA-B51 in über 55% der Fälle⁶⁷.

1.2 Epidemiologie des Morbus Behcet

Auffällig ist eine Häufung der Krankheitsfälle von M. Behcet entlang der alten Seidenstrasse. Die höchste Prävalenz der Erkrankung von 80- 370 Fällen pro 100.000 Einwohnern weist die Türkei auf⁶⁴. In Japan, Korea, China, Iran und Saudi- Arabien liegt die Prävalenz zwischen 13.5 bis 20 Fällen pro 100.000 Einwohnern. Weitaus niedriger ist die Prävalenz in den westlichen Ländern: in den USA beträgt die Prävalenz 0.12 pro 100.000, in Großbritannien 0.50 pro 100.000⁹⁹.

Die Prävalenz unter der türkischen Bevölkerung in Berlin ist mit 21 pro 100.000 wesentlich niedriger als in der Türkei, jedoch um ein vielfaches höher als diejenige der deutschstämmigen Bevölkerung(0.42 pro 100.000)⁹⁹. Unter Japanern, die nach Hawaii und Kalifornien ausgewandert sind, konnte kein M. Behcet nachgewiesen werden.⁹⁹.

Die Krankheit, die typischerweise in der dritten bis vierten Lebensdekade beginnt, ist unter Männern im mittleren Osten verbreiteter als unter Frauen, in Japan und Korea allerdings sind überwiegend Frauen betroffen^{64,99}.

Eine familiäre Häufung findet sich in 10 bis 15% im mittleren Osten, ansonsten liegt die Prozenrate bei 2 bis 5%⁶⁴.

Insgesamt lassen die Daten vermuten, dass bei der Entstehung der Erkrankung sowohl genetische-, als auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen.

1.3 Ätiologie und Pathogenese

1.3.1 Genetik

Der am besten untersuchte Genlocus in Bezug auf M. Behcet ist der HLA-Komplex auf Chromosom 6p21. Vor allem der Polymorphismus (mittlerweile sind 34 Allelvarianten bekannt)⁶⁴ des HLA-B51 Gens wird mit der Erkrankung assoziiert, insbesondere unter den Patienten, die entlang der Seidenstrasse leben. So konnte bei über 80% der asiatischen, ebenso wie bei über 70% der deutschen und italienischen Patienten dieses Allel nachgewiesen werden^{67,50,54}. Diskutiert wird ebenso eine Assoziation zum Schweregrad des Krankheitsverlaufs: so waren über 55% der Patienten mit Neurobehcet HLA-B51 positiv⁶⁷, ebenso waren Augenmanifestation ($p=0.027$), vaskuläre Manifestationen ($p=0.008$), superfizielle Trombophlebitiden ($p=0.0003$) und Hautmanifestationen ($p<0.001$) bei HLA-B51 positiven Patienten häufiger zu finden als bei HLA-B51 Negativen⁹⁹. Darüber hinaus entwickelten HLA-B51 positive Patienten die volle klinische Ausprägung früher als HLA-B51 negative Patienten ($p=0.017$)⁹⁹.

Noch ist unklar, ob diese Assoziation die primäre Ursache für die Erkrankung darstellt, oder ob Koppelungen mit anderen benachbarten Risikoallelen vorliegen. Das zentromerisch vom HLA-B Locus gelegene MHC class I chain related gene A (MICA) wurde ebenso untersucht wie TNF- Genloci, die sich ebenfalls zentromerisch vom HLA-B Locus befinden^{36,72,96}. MICA- Gene werden von Promoter Hitzeschock Proteinelementen, die Ähnlichkeiten zu hsp70 aufweisen, reguliert⁷² und in Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen und Monozyten exprimiert³⁶. Diese Expression, so die Vermutung, könnte die Entzündungsreaktion, die bei M. Behcet Patienten auftritt, erklären, da MICA-Antigene gammadelta T-Zellen direkt aktivieren können³⁶. Letztendlich jedoch war sowohl das MICA*A6 –Allel als auch das MICA 009- Allel, das für die extrazellulären Domänen von MICA codiert, in einem Koppelungsungleichgewicht zu HLA-B51, so dass HLA-B51 nach wie vor als Hauptfaktor in der Krankheitsassoziation angesehen wird^{36,72}. Ähnlich sind die Ergebnisse der Untersuchungen die TNF- Genloci betreffend: es besteht keine

Assoziation mit TNFalpha -308, TNFbeta +252 und TNFR2 196 bezüglich der Erkrankung an M. Behcet⁹⁶.

Auch Gene außerhalb des MHC- Locus waren Gegenstand verschiedener Analysen, wie zum Beispiel das MEFV- Gen. Dieses Gen wird im Zusammenhang mit dem familiären Mittelmeerfieber gesehen, welches wiederum Ähnlichkeiten in Morphologie und Epidemiologie mit M. Behcet aufweist⁴⁰. Bestimmte Polymorphismen scheinen auch bei M. Behcet Patienten vermehrt, was auch für eine mögliche Beteiligung an der Krankheitsausprägung sprechen könnte⁴⁰.

Insgesamt jedoch konzentriert sich die Forschung auf das Chromosom 6 und die darin enthaltene MHC- Region im weitesten Sinne. So wurde ein neuer Locus aus Chromosom 6p22- p23, der telomerisch von der MHC- Region liegt, untersucht. Dieser wird sicherlich noch Gegenstand weiterer Forschung sein⁴⁰.

HLA-B51 bleibt also vorerst der genetische Hauptfaktor in der Pathogenese des M. Behcet. Die genetische Suszeptibilität jedoch wird insgesamt auf nur 19% geschätzt, was in Übereinstimmung zu einer positiven Ratio von lediglich 60% steht⁴⁰.

Somit müssen auch andere Faktoren wie Umweltbedingungen, Infektionen oder eine Dysregulation der Immunantwort in der Pathogenese eine Rolle spielen und mitberücksichtigt werden.

1.3.2 Immunpathogenese

Tatsächlich wurden zahlreiche mikrobiologische Erreger auf ihr krankheitsauslösendes Potential hin untersucht, als Beispiel seien hier das Herpes simplex Virus 1 und 2, humanes Herpes Virus 6 und 7, Varizella Zoster, Streptokokken- Antigene und bestimmte Epitope von Hitzeschockproteinen genannt^{36,40,96}. Teils konnten unter anderem erhöhte Serumantikörperspiegel gegen Herpes simplex Virus bei Patienten nachgewiesen werden⁸², ebenso wie ein erhöhter Antikörper- Titer gegen Streptokokkus sanguis ^{36,82}. Insgesamt jedoch konnte kein alleiniger ursächlicher Zusammenhang mit der Pathogenese des M. Behcet hergestellt werden⁹⁶. Man nimmt jedoch an, dass

ein Zusammenspiel verschiedener Antigene in einer kreuzreaktiven Autoimmunantwort münden⁸², die mit einer T- Zell Aktivierung einhergehen²⁴. So wurde eine gammadelta T-Zell Vermehrung bei M. Behcet Patienten in der aktiven Krankheitsphase nachgewiesen, speziell von gammadelta CD8+ T-Zellen³⁶. Diese produzieren IFNgamma, TNFalpha und IL-8, nicht jedoch IL-4³⁶. Beschrieben ist unter anderem diese Reaktion auf Streptokokken- und Staphylokokken- Antigen- Präsentation³⁶.

Des weiteren findet man bei M. Behcet Patienten eine Erhöhung der Th1-Zellpopulation und demnach eine Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine vom Th1- Typ, vor allem in der aktiven Krankheitsphase³². Th1- Zellen sekretieren IFNgamma, IL-2, TNF beta, aktivieren Makrophagen, fördern die zellvermittelte Immunität und entwickeln sich selbst unter IL-12 Einfluß³². Selektive Defekte oder unregelmäßige Zytokinproduktion sind für viele immunpathologische Geschehen verantwortlich.

Eine Vermehrung von Th2- Lymphozyten und deren Zytokine konnte nicht nachgewiesen werden^{24,63}.

Eine spontane Freisetzung von TNFalpha, IL-1, IL-6 und IL-8 durch Makrophagen im aktiven Krankheitsverlauf ist beschrieben, ebenso eine LPS-stimulierte Produktion derselben Zytokine, allerdings ohne Korrelation zur Krankheitsaktivität⁶⁵.

Lange wurde eine Hyperreaktivität von neutrophilen Granulozyten als alleiniger pathogener Mechanismus angesehen⁴⁰, jedoch lässt sich diese aufgrund der beschriebenen Zytokinproduktion als Stimulationsfaktor hierfür erklären³⁶. Auch produzieren neutrophile Granulozyten bei Patienten mit M. Behcet TNFalpha, IL-12 sowie IL-18, was wiederum eine Erklärung der Th1- Dominanz liefern kann³⁶. Die erhöhte Produktion von TNFalpha kann ebenso die Lebensspanne von neutrophilen Granulozyten verlängern und damit deren Zytokinproduktion.

1.4 Diagnostik

Die Diagnose erfolgt klinisch, da ein spezifischer Test zum Nachweis von M. Behcet nicht besteht. Die Klassifikationskriterien wurden 1990 von der „International Study Group for Behcet’s disease“ zusammengetragen und einem Schema angepasst (Tabelle 1)⁴⁵.

Rezidivierende orale Ulzerationen	Kleine oder große oder herpetiforme aphtöse Ulzerationen, die mindestens dreimal in 12 Monaten auftreten
Zusätzlich zwei der folgenden Kriterien:	
Rezidivierende genitale Ulzerationen	Aphtöse Ulzerationen oder Vernarbung
Augenläsionen	Uveitis anterior, Uveitis posterior oder Zellen im Glaskörper bei der Spaltlampenuntersuchung oder retinale Vaskulitis, von einem Ophthalmologen diagnostiziert
Hautläsionen	Erythema nodosum, Pseudofolikulitis oder papulopustulöse Läsionen oder akneiforme Knötchen bei postadoleszenten Patienten ohne Steroidmedikation
Positiver Pathergie Test	Positive Reaktion binnen 24- 48 Stunden

Tabelle 1: Klassifikationskriterien der „International Study Group of Behcet’s disease“ 1990

Die zahlreichen Differentialdiagnosen wie M.Crohn, Reiter- Syndrom, Multiple Sklerose, familiäres Mittelmeerfieber und Erythema multiforme müssen natürlich sorgfältig ausgeschlossen werden⁶⁴.

Laboruntersuchungen eignen sich ebenfalls nicht zur Diagnosesicherung. Lediglich eine leichte Anämie aufgrund der chronischen Entzündung kann nachgewiesen werden, ist jedoch völlig unspezifisch⁶⁴. Der genetische Nachweis von HLA-B51 (siehe 1.3.1) eignet sich aufgrund der Häufigkeit in der Bevölkerung ebenfalls nicht.

1.5 Therapie

Die Therapie des M. Behcet erfolgt symptomorientiert. Ein weiteres Ziel ist es, die Entzündungsreaktion so früh wie möglich zu unterdrücken und Organschäden zu vermeiden. Zur Verfügung stehen hierbei zahlreiche Immunsuppressiva und anti- inflammatorische Medikamente.

Exemplarisch sollen einige wichtige Medikamente kurz vorgestellt werden.

Systemische Glukokortikoide:

Systemische Glukokortikoide werden bei fast allen Manifestationen des M. Behcet eingesetzt, vor allem auch in der akuten Exazerbationsphase. Allerdings sollte eine Langzeitgabe aufgrund der bekannten Nebenwirkungen vermieden werden^{64,82,96}.

Infliximab:

Infliximab ist ein chimärer Antikörper gegen TNFalpha und wird mit großem Erfolg bei orogenitalen Ulzerationen, Haut- und Gastrointestinalmanifestation und Panuveitis eingesetzt⁴⁰.

Cyclosporin:

Cyclosporin findet bei vor allem bei Augenmanifestation Anwendung⁸². Ein limitierender Faktor stellt hierbei die Neurotoxizität dar, so sollte bei Patienten mit Neuro- Behcet die Gabe vermieden werden⁶⁴.

Interferon-Alpha:

Die Gabe von Interferon alpha erfolgt vor allem bei Augen- und Gelenkmanifestation^{40,64}. Die Therapie mit Interferon alpha weist hohe Ansprechraten und einen relativ schnellen Wirkeintritt innerhalb von 2-4 Wochen auf⁹⁶.

Colchizin:

Colchizin wird erfolgreich bei mukokutanen Läsionen und Gelenkmanifestation eingesetzt, bei okulärer Manifestation jedoch zeigt Colchizin kaum eine Wirkung⁶⁴. Auch wirkt das Medikament bei weiblichen Patienten besser als bei männlichen Patienten⁴⁰.

1.6 Zytokine

Zytokine sind kleine lösliche Proteine, die von den verschiedensten mononukleären Körperzellen auf einen aktivierenden Stimulus hin freigesetzt werden können. Durch Bindung an spezifische Rezeptoren rufen sie eine pleiotrope Wirkung hervor, d.h. sie wirken auf verschiedene Zellarten und rufen eine zum Teil gegensätzliche Wirkung hervor.

Die Signalweiterleitung erfolgt dabei teils second- messenger vermittelt, teils über Janus-Kinasen und führt letztlich zu einer Veränderung der Genexpression⁸⁰.

Dabei können sie sowohl autokrin wirken, und die sezernierende Zelle beeinflussen, wie auch parakrin, und das Verhalten der umgebenden Zellen beeinflussen, ja sogar endokrin, soweit Stabilität und Lebensdauer dies zulassen⁴⁷

Eine eigene Familie innerhalb der Zytokine bilden die strukturell verwandten Chemokine, die in der allerersten Phase einer Infektion im betroffenen Gewebe freigesetzt werden. Sie binden an sieben transmembranöse G- Protein gekoppelte Rezeptoren und wirken hauptsächlich als Chemotraktoren für

Leukozyten, indem sie Monozyten, neutrophile Granulozyten und andere Effektorzellen zur Diapedese mobilisieren.

Zytokine gehören zu den antigenunspezifisch wirksamen Komponenten des humoralen Immunsystems. In ihrer Rolle als Mediatoren steuern sie das Zusammenspiel der Immunabwehr und der Verständigung der beteiligten Zellen untereinander.

Auf die in dieser Arbeit untersuchten Zytokine soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.6.1 Interleukin 8 und Interleukin 8 Rezeptor A:

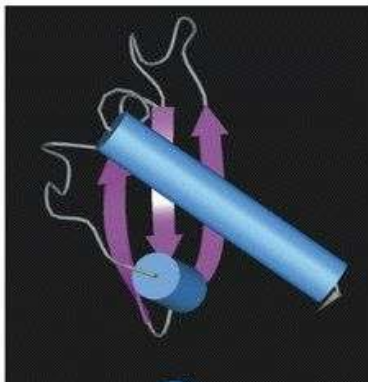


Figure 2-40 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Abbildung 1: CXCL 8- Struktur

IL8 (oder CXCL8) (siehe Abbildung 1) gehört zur Familie der CXC- Chemokine, in denen zwei Cysteinreste durch eine dazwischenliegende Aminosäure getrennt sind. Hauptsächlich wirken diese CXC- Chemokine auf die Mobilisation der Basophilen, Monozyten, Keratinozyten und T- Zellen, vor allem jedoch auf Neutrophile ein⁸⁷. Hierbei erfüllen sie zwei Hauptfunktionen: zum einen schaffen sie eine stabile Bindung zwischen den Endothelzellen und den in der Blutbahn bewegten Leukozyten, zum anderen weisen sie den Leukozyten aufgrund ihres steigenden Konzentrationsgradienten den Weg zum Infektionsort.

Makrophagen, Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten bilden IL-8 als Reaktion auf Krankheitserreger oder Gewebeverletzungen.

Durch IL-8 angeregte Neutrophile setzen einen sogenannten „respiratory burst“ frei, bei dem Sauerstoffradikale und Stickoxide erzeugt werden, ebenso sezernieren sie den Inhalt ihrer Speichergranula und tragen so zur Immunantwort bei⁴⁷. Auch ist IL-8 an der Angiogenese beteiligt⁶⁰.

Zwei Zelloberflächenrezeptoren, Interleukin- Rezeptor A (CXCR1) und Interleukin- Rezeptor B (CXCR2), die auf Neutrophilen, Basophilen, T-Lymphozyten, Monozyten und Keratinozyten exprimiert werden, sind beschrieben⁶¹. Beide IL8-R Gene sind auf dem Chromosom 2p35 im menschlichen Genom lokalisiert⁸⁷.

CXR1 bindet mit hoher Affinität ausschließlich IL-8, während CXCR2 ebenso andere Chemokine wie NAP-2 oder GCP-2 bindet⁷⁸. Die Neutrophilenaktivierung erfolgt ausschließlich CRXC1 abhängig, während die Angiogenese CRXC2 vermittelt erfolgt⁸⁸.

Die Rezeptoren enthalten sieben Helices, die die Membran durchqueren und mit G- Proteinen interagieren, die Signalkaskade wird also second-messenger vermittelt⁴⁷.

Rezeptor- Phosphorylierung, Desensibilisation und Internalisation werden IL-8 abhängig reguliert, und obwohl beide Rezeptoren die Internalisation über Arrestin/Dynamin- abhängigen Mechanismus steuern, findet die Internalisation bei CRXC2 wesentlich schneller statt als bei CXCR1, ebenso erfolgt die Wiederherstellung des CXCR2 beträchtlich langsamer⁷⁸. Aufgrund letzterer Feststellung wurde CXCR1 teils eine aktivere Rolle in der Signalübermittlung zugesprochen, da dieser Rezeptor schneller wiederhergestellt und somit einsatzfähig ist¹⁹.

Tabelle 2 gibt abschließend eine tabellarische Übersicht über CXCL 8.

<u>Klasse</u>	<u>Chemokin</u>	<u>Produziert von:</u>	<u>Zielzellen:</u>	<u>Haupteffekte:</u>	<u>Rezeptoren:</u>
CXC	CXCL 8 (IL-8)	Monozyten Makrophagen Fibroblasten Keratinocyten Endothelzellen	Neutrophile Monozyten T-Zellen Basophile Keratinocyten	Mobilisation, Aktivierung und Degranulation der Neutrophilen Angiogenese	CXCR1 CXCR2

Tabelle 2: Übersicht über CXCL 8

1.6.2 Interleukin 6 und Interleukin 6 Rezeptor:

Interleukin 6 (IL-6) ist ein pleiotropes Zytokin von 26 kDa¹⁸ und wird von zahlreichen Zellen, wie B-Zellen, T- Zellen, Eosinophilen, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, dendritische Zellen, Chondrozyten, Endothelzellen, Muskelzellen, Astrozyten, Fibroblasten, Keratinocyten und bestimmten Tumorzellen produziert^{8,18,47,51,68}.

Die Interaktionen und Wirkungen sind vielfältig, Abbildung 2 gibt einen Überblick über wichtigsten Funktionen.

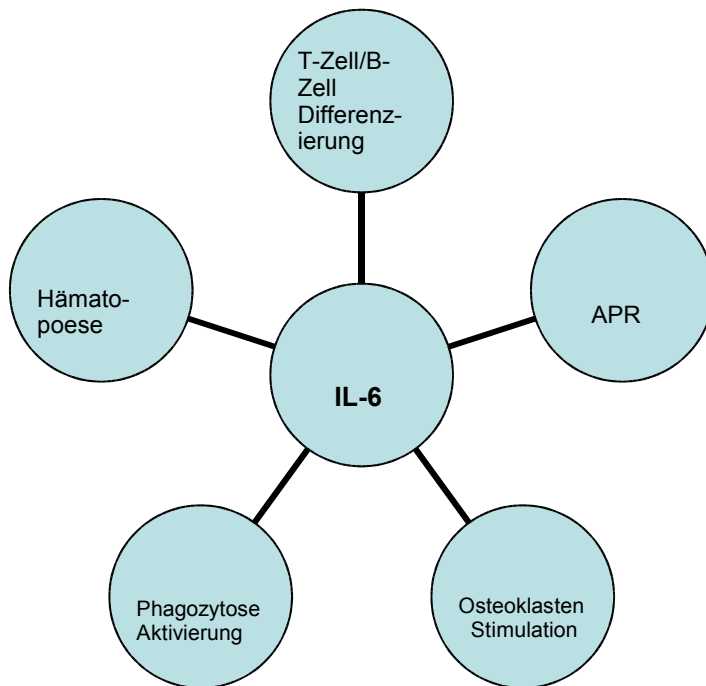


Abbildung 2: Übersicht über die wichtigsten IL-6 Funktionen

Das Immunsystem wird sehr stark von der Präsenz des IL-6 beeinflusst. Die Proliferation von T-Zellen ist unter IL6- Einfluß gesteigert , ebenso findet ein Th2/Th1 Shift zugunsten Th2 und dessen Zytokinfreisetzung (IL-2,4,5,6,10) statt⁷⁹. Somit ist IL-6 auch an der Proliferation und Antikörperbildung der B-Zellen, bzw. der Plasmazellen beteiligt. Da Letzteres zuerst entdeckt wurde, lautete die ursprüngliche Bezeichnung von IL-6 auch B- Zell Stimulationsfaktor 2¹⁸. Auch aktiviert IL-6 die Differenzierung der Makrophagen und dendritischen Zellen, letztlich steigert es die gesamte Leukozytenproliferation und -differenzierung ³⁹. Insgesamt spielt IL-6 bei der Immunantwort auf virale und bakterielle Infektionen eine offensichtlich wichtige Rolle. So konnten beispielsweise Knock- Out- Mäuse eine Infektion mit Listerien und Vaccinia Virus nicht mehr kontrollieren⁵².

IL-6 regt außerdem direkt die Hepatozyten zur Produktion von Akute-Phase-Proteinen, wie C-reaktives Protein und Amyloid A an und beeinflusst so die Akute- Phase- Reaktion¹⁸.

In mesenchymalen Zellen stimuliert IL-6 die Hämatopoese, inklusive Granulopoese und Megakaryozytopoese und somit auch die Blutplättchenbildung^{8,47}.

Die Hypothalamus- Hypophysen-NNR-Achse wird durch IL-6 ebenso angeregt wie die Osteoklastenaktivität⁸.

In der Struktur weist IL-6 mit anderen Zytokinen Ähnlichkeit auf, z.B. mit Onkostatin M, IL-11, Kardiotropin 1, cell-stimulating factor 3 und anderen. Diese werden zur IL-6 Familie zusammengefasst¹⁸.

Der Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R) besteht aus einer alpha Kette (IL-6RA) und einer Untereinheit, GP130, und ist auf Chromosom 1q21 lokalisiert⁸. IL-6R gehört sowohl zur Ig-, als auch zur Hämopetin- Zytokinrezeptorfamilie, da beide Untereinheiten eine Ig-artige Domäne und das Hauptmerkmal der Hämopoetinfamilie, bestehend aus vier gleich bleibenden Aminosäuren aus Tryptophandubletten, einem Serin und bestimmten Cysteinen, aufweisen⁸⁰.

Die Untereinheit GP130 findet sich bei allen Zytokinen aus der IL-6- Familie, die primär zytokinbindende Rezeptoruntereinheit variiert je nach Familienmitglied³⁹. IL-6 bindet primär an IL-6RA, das sowohl membrangebunden als auch in löslicher Form vorkommt. Zusammen mit GP130, das ebenfalls in diesen zwei Formen vorliegt, ist dies unter anderem eine Erklärung für das vielfältige und weitreichende Wirkungsspektrum von IL-6⁴⁹.

GP130 kommt hierbei eine Schlüsselfunktion in der Signalübertragung zu, da nur über Anlagerung des zuvor gebildeten, zunächst inaktiven IL-6/IL-6RA Komplexes an GP130, v.a. an die IG-ähnliche Domäne, aktive Signale ins Zellinnere übertragen werden können⁴⁹. Die Übertragung erfolgt hierbei durch Janus- Kinasen: GP130 aktiviert die Janus- Kinasen Jak-1, JAK-2 und TYK-2. Diese phosphorylieren Tyrosin- Reste der cytoplasmatischen Domäne von GP130 und aktivieren letztlich STAT-3 (= Signal Transducer and Aktivator of Transkription), welches in den Nukleus der Zelle eindringt und die Gen-Expression reguliert^{8,47}. Interleukin 6 wird jedoch ausschließlich über die Expression des IL6RA kontrolliert⁵¹.

1.6.3 TNFalpha:

TNF alpha ist ein proinflammatorisches Zytokin, das hauptsächlich von Makrophagen und T- Zellen, v.a. von Th1- Zellen, aber auch von einigen Th2- Zellen und zytotoxischen T- Zellen produziert wird⁵⁹. Das TNF- Gen liegt auf dem telomerischen Ende der Klasse III Region des hoch polymorphen Major Histokompatibilitätskomplex (MHC) auf Chromosom 6p21⁶² (siehe Abbildung 3).

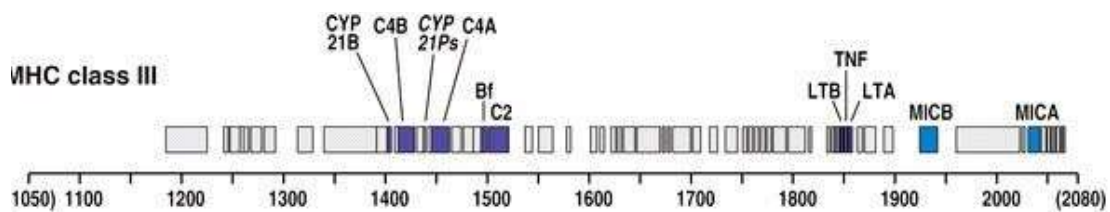


Abbildung 3: TNFalpha Gen- Lokalisation auf Chromosom 6p21

Offensichtlich ist es ein Mitglied der TNF- Familie, zu der unter anderem auch der Fas- Ligand, der CD40- Ligand, TNF beta und die Rezeptoren TNFR 1 und TNFR 2 zählen. Diese weisen als gemeinsame Grundstruktur drei identische Polypeptidketten (= Homotrimer) auf (siehe Abbildung 4)⁴⁷.

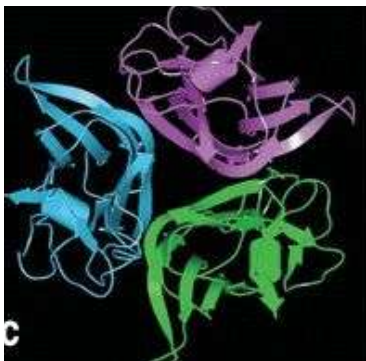


Abbildung 4: TNFalpha- Struktur

TNF alpha kommt sowohl in membrangebundener als auch in löslicher Form vor, ebenso wie die bindungsrelevanten Rezeptoren TNFR 1 und TNFR 2. TNFR 2 hat hierbei eine höhere Affinität zu TNF und bindet TNF in niedrigerer Konzentration besser³⁷. Lösliche TNF- Rezeptoren neutralisieren zum einen die Aktivität von TNF durch kompetitive Hemmung am membrangebundenen

Rezeptor, zum anderen jedoch stabilisieren sie gleichzeitig das TNFalpha Molekül und verhindern so seine Degeneration³⁷.

TNFalpha hat ein breites Spektrum an biologischer Aktivität. So ist es unter anderem an der Regulation der Immunantwort auf Infektionen beteiligt, indem es die B- und T- Zellen, sowie Makrophagen verstärkt aktiviert, aus Knochenmark und Endothel Neutrophile mobilisiert und schließlich über Hypothalamusstimulation als endogenes Pyretikum wirkt. Gleichzeitig regt es Muskel- und Fettzellen zur Bereitstellung von Energie an, um eine Steigerung der Körpertemperatur zu erreichen. Wie Interleukin-6 regt es die Hepatozyten direkt zur Bildung von Akute- Phase- Proteinen an und aktiviert so die Komplementkaskade^{47,73}.

Des Weiteren stimuliert TNFalpha das mikrovaskuläre Endothel zur Gerinnungsaktivierung, was letztlich zum lokalen Gefäßverschluß führt. Somit wird ein Ausbreiten pathogener Keime in die Blutbahn verhindert. Befinden sich allerdings bereits Keime in der Blutbahn, liegt also eine Sepsis vor, so kommt es zur systemischen Freisetzung von TNFalpha: es kommt zur Vasodilatation und einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität, was zu Blutdruckabfall und Schocksymptomatik führen kann^{23,73}.

1.7 Fragestellung und Zielsetzung

IL-6, IL-8 und TNFalpha sind potente proinflammatorische Zytokine und ihre Beteiligung an vielen chronisch entzündlichen und autoimmunvermittelten Krankheiten, wie rheumatoide Arthritis, entzündliche Darmerkrankung und Multiple Sklerose ist bekannt^{17,33,59}.

Mehrere Hinweise deuten auf eine Beteiligung von TNFalpha an der Pathogenese des M.Behcet hin: zum einen finden sich erhöhte TNFalpha Serumspiegel bei Patienten mit M. Behcet⁸⁴, ebenso läßt sich eine spontane Freisetzung von TNFalpha durch Makrophagen beobachten⁶⁵. Darüber hinaus erzielt die Therapie mit Anti-TNFalpha- Antikörper große Erfolge bei der Behandlung von M. Behcet- Patienten⁸⁶. Und nicht zuletzt lässt die Lokalisation

des TNF- Gens, angrenzend an den HLA- B Komplex, eine Beteiligung durch TNF- Polymorphismen vermuten³.

In früheren Studien wurde eine Assoziation von TNF Polymorphismen mit M. Behcet teils bestätigt, teils ausgeschlossen^{3,59,90}. Untersuchungen, die sich mit TNFalpha Polymorphismen beschäftigt haben, konzentrierten sich in ihren Analysen meist auf TNFalpha -308(G/A) und konnten hier keine Assoziation zwischen Polymorphismus und Krankheit feststellen^{3,90}. Aus diesem Grund, und aufgrund des Nachweises dieses Polymorphismus bei chronisch entzündlichen- und Autoimmunerkrankungen³⁷ wurde in dieser Arbeit die Punktmutation (SNP) TNFalpha -238(G/A) auf eine Assoziation zu M. Behcet hin untersucht.

Erhöhte Serumspiegel von IL-6 und IL-8 wurden bei M. Behcet Patienten festgestellt und konnten mit der Krankheitsaktivität korreliert werden^{1,17,33}. Polymorphismen im Rezeptorgen könnten im pathophysiologischem Sinne regulatorischen Einfluß auf Expression und Aktivität dieser Zytokine nehmen²⁶ und wurden deshalb in dieser Arbeit näher untersucht.

Bis jetzt wurde erst eine geringe Anzahl an Polymorphismen des Interleukin-6- Rezeptorgens beschrieben⁷⁷, obwohl IL-6 bekanntermaßen eine wichtige Rolle im immunpathologischen Geschehen spielt. In Bezug auf M. Behcet existiert nur eine Studie, die sich mit IL-6- Gen Polymorphismen beschäftigt hat¹⁷, jedoch noch keine Arbeit, die sich mit einer Assoziation von Polymorphismen im Rezeptorgen und M. Behcet auseinandergesetzt hat.

In dieser Arbeit wurden daher zwei SNPs im Rezeptorgen untersucht, ein synonymes SNP auf Exon 2 (+24013 A/G: Ala31Ala) und ein nonsynonymes SNP auf Exon 9 (+48892 A/C: Asp358Ala).

Polymorphismen im Interleukin-8 Rezeptorgen sind beschrieben, jedoch konnten diesen bis jetzt keine regulatorischen Funktionen nachgewiesen werden⁷⁷. Die Hyperreaktivität der Neutrophilen jedoch, die typisch ist für M. Behcet, und deren Mobilisation durch IL-8 lassen unter anderem eine eventuelle Dysregulation des Zytokins durch Rezeptorgenpolymorphismen vermuten. Bezüglich des M. Behcet ist bisher eine Studie publiziert, die sich mit Polymorphismen des IL-8- Gens und des CXCR 2- Gens beschäftigt hat, allerdings konnte hier keine Verbindung nachgewiesen werden²⁶. So konzentriert sich diese Arbeit auf eine mögliche Assoziation eines

CXCR-1(=IL8RA) Polymorphismus mit M. Behcet.

Untersucht wurde ein nonsynonymes SNP auf Exon 2 (+2607G/C: Ser/Thr).

Detektion der Polymorphismen mit der Light-Cycler- Methode (eine PCR-Variante).

Untersucht wurden eine Patientengruppe aus Deutschland und der Türkei, sowie eine Kontrollgruppe aus Deutschland und der Türkei.

Die Fallzahlen stellt die Tabelle 3 dar.

SNP	Pat.gesamt	Kontr.gesamt	Pat. D	Kontr.D	Pat.T	Kontr.T
	t	t				
-238TNF alpha	n=122	n=71	n=92	n=51	n=30	n=20
+2607 CXCR1	n=124	n=70	n=94	n=50	n=30	n=20
+48892 IL6R	n=124	n=70	n=94	n=50	n=30	n=20
+24013 IL6R	n=124	n=70	n=94	n=50	n=30	n=20

Tabelle 3: Fallzahlen der detektierten SNP

2. Material und Methoden

2.1 Materialien und Bezugsquellen

2.1.1 Geräte

- Computer: T-Bird; Fujitsu Siemens Computers, Sömmerda
- Betriebssystem: Windows NT; Microsoft, München
- Drucker: DeskJet 695C; Hewlett Packard, München
- Programme: Microsoft Office XP; Microsoft, München
LightCycler-Software 3.5; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

- PCR-System: LightCycler Instrument; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler Carousel; Zentrifuge
- SteriBänke: LaminAir HLB 2472; Heraeus, Hanau
Biogard B 40-112; Baker Company, Sanford, Maine, USA
- Pipetten: Variopipetten; Eppendorf, Hamburg
10µl, 100µl, 1000µl
- Vortex: Top-Mix 94323; Heidolph Instruments

2.1.2 Verbrauchsgegenstände

- LightCycler Kapillaren: 20µl; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Pipettenspitzen: 10 µl, 100 µl, 1000 µl; Biozym Diagnostik, Hessisch Oberndorf
- Reaktionsgefäße: 2 ml Tubes; Eppendorf, Hamburg

2.1.3 Chemikalien

- Primer und Sonden: Tib Molbiol, Berlin
- PCR: LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.2 Methoden

2.2.1 DNA- Extraktion unter Verwendung des QIAamp DNA Tissue- Kit

10 ml der jeweiligen Probe werden mit RCLB Puffer auf 45 ml aufgefüllt und anschließend 10 Minuten auf der Wippe durchmischt. Die Proben werden jetzt für 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen/ Minute zentrifugiert. Der Vorgang wird nochmals wiederholt. Der anfallende Überstand wird nun verworfen, das Pellet nochmals aufgelöst, ebenso wird 1ml WCLB zugegeben. Anschließend erfolgt eine 45minütige Inkubation bei 65 °C. Eine erneute Zentrifugation mit 4000 Umdrehungen/ Minute für 10 Minuten schließt sich an. Der anfallende Überstand wird wieder verworfen und 500µl Lyticase zugegeben. Dann folgt eine erneute Inkubation bei 37°C für weitere 45 Minuten.

Nun wird nochmals für 10 Minuten bei 4000 Umdrehungen/ Minute zentrifugiert. Es folgt die Zugabe von 180µl ATL Puffer (Tissue Lysis Puffer) und 20µl Proteinase K. Nach 20 Minuten Inkubationszeit werden 200ml AL Puffer (Lysis Buffer) dazugegeben und für 10 Minuten erneut inkubiert. Danach wird die Probe mit 210µl Ethanol gemischt und sorgfältig gevortext. Der Ansatz wird in Quiagen- Säulen pipettiert und für eine Minute bei 9000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Anschließend wird die Probe mit 500µl AW1- Waschpuffer gereinigt und erneut für eine Minute bei 9000 Umdrehungen/ Minute zentrifugiert. Die Reinigung mit 500µl Waschpuffer erfolgt anschließend zwei Mal, jedes Mal wird im Anschluss daran zentrifugiert.

50µl AE– Puffer wird nun auf die Säulen gegeben und für eine Minute bei 9000 Umdrehungen/ Minute zentrifugiert. Nach erneuter Zugabe von 50µl AE– Puffer wird noch einmal zentrifugiert, diesmal mit 13000 Umdrehungen/ Minute.

Mittels photometrischer Messung kann die so gelöste DNA auf Konzentration und Reinheit überprüft werden.

Die verwendeten Puffer zur Aufreinigung der DNA werden vom Hersteller des QIAamp Tissue Kit geliefert.

2.2.2 Das LightCycler PCR Analysesystem

Das LightCycler PCR Analysesystem findet seine Anwendung sowohl in quantitativen als auch in qualitativen PCR Reaktionen bei einer geringen Laufzeit von etwa 45– 65 Minuten.

Aufbau des LightCycler Gerätes:

Der Aufbau besteht im Wesentlichen aus zwei Einheiten: einer oberen Einheit, die die Heizspirale enthält, und einer unteren Einheit, die die Temperaturkammer enthält, in welche wiederum das Probenkarussell, das Fluorimeter ,die Motoren sowie die Energieversorgung integriert sind.

Arbeitsprinzip des LightCyclers:

Zum Erhitzen und Abkühlen der verwendeten Proben wird in diesem System Luft verwendet, wobei die Temperaturregulierung über eine Heizspirale erfolgt. Diese erwärmt die Luft, welche anschließend mit Hilfe eines Ventilators, der sich am Boden der Temperaturkammer befindet, gleichmäßig in der Kammer verteilt wird. So herrscht eine gleichmäßige Temperatur in der Kammer und somit für jede einzelne Probe. Eine Überhitzung wird durch die Zufuhr von Raumluft in die Wärmekammer vermieden.

Für die LightCycler PCR werden Glaskapillaren verwendet, die einen Außendurchmesser von 1,55 mm und eine Länge von 35 mm haben. Mit 10–

20µl ist das erforderliche Reaktionsvolumen minimal. Das optimale Oberflächen– Volumen– Verhältnis der Kapillaren sowie die Verwendung von Luft zur Wärmeregulation garantieren eine rasche Temperaturänderung des Probenmaterials von bis zu 20°C/sec sowie eine Genauigkeit von $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$. Ein weiterer Vorteil ist die geringe Zyklusdauer, die sich hieraus ergibt: ein Zyklus beträgt nur ca. 30s.

Durch die Verwendung von drei optischen Messkanälen kann gewährleistet werden, dass die Fluoreszenz aller verfügbaren Proben erfasst werden kann. Kanal 1 arbeitet mit einer Wellenlänge von 530 nm, Kanal 2 von 640 nm und Kanal 3 von 710 nm. Die bis zu 32 Proben werden in ein Karussell gegeben und mittels Photodioden misst das optische System die Fluoreszenz jeder einzelnen Probe in rund 20 Millisekunden, wobei während des Messvorgangs ein Schrittmotor das Karussell rotiert, so dass jede Kapillare im Brennpunkt des Fluorimeters zu liegen kommt.

Am Computer kann der PCR– Lauf für jede Probe einzeln in Echtzeit verfolgt werden, wobei die LightCycler Software (Version 3.5) zur Analyse dient.

Detektion der PCR Produkte, Prinzipien:

Prinzipiell bestehen mehrere Möglichkeiten zur Probendetektion mittels des LightCyclers. Eingegangen werden soll hier auf die Möglichkeit der Detektion mittels Fluoreszenzfarbstoffen. Diese binden in bestimmten Phasen des PCR– Zyklus an die gewünschte Ziel– DNA. Die optische Einheit des LightCyclers regt durch Licht einer bestimmten Wellenlänge diese Farbstoffe an. Abhängig von ihrem Bindungsverhalten lassen sich zwei unterschiedliche Gruppen benennen: zum einen die Gruppe der Fluoreszenzfarbstoffe, die an doppelsträngiger DNA bindet, und dies unabhängig von der Sequenz, z.B. SYBR Green I. Zum anderen die Gruppe der Fluoreszenzfarbstoffe, die mittels zweier sequenzspezifischer Oligonukleotide in der Lage sind, bestimmte PCR– Produkte nachzuweisen, das sogenannte Hybridization Probes Format.

Da Letzteres in der Arbeit Verwendung gefunden hat, soll auf dieses in einer kurzen Erklärung näher eingegangen werden.

Hybridization Probes Format:

Zwei sequenzspezifische Oligonukleotide dienen dazu, DNA nachzuweisen. Jedes der beiden Oligonukleotide ist dabei an einen anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Am 5' Oligonucleotid (Donor, Sonde 1) befindet sich am 3'- Ende der Farbstoff Fluorescein, am 3' Oligonukleotid (Acceptor, Sonde 2) LightCycler Red 640.

In der „Annealing“- Phase, in der die DNA einzelsträngig vorliegt, binden die Sonden an die Ziel- DNA, wobei die Sequenz der Sonden in kleinstmöglichem Abstand von 1– 5 Nukleotiden gewählt wird. In diesem sogenannten „head– to– tail arrangement“ wird die Ziel- DNA hybridisiert und die beiden Fluoreszenzfarbstoffe werden einander angenähert. Der Farbstoff Fluorescein wird durch blaues Licht (470 nm) der externen LED angeregt und strahlt selbst nun grünes Licht (530 nm) ab. Diese so abgestrahlte Energie überträgt sich auf die zweite Sonde LightCycler Red 640, die ihrerseits nun rotes Licht (640 nm) abgibt und durch Kanal F2 registriert wird. Dieser Vorgang wird auch als „FRET“ (fluorescence resonance energy transfer) bezeichnet. Die gemessene Fluoreszenz ist der Menge an amplifizierter DNA direkt proportional.

Das von Fluorescein emittierte Licht von 530 nm kann vom F1-Kanal gemessen werden. Günstig ist es, die Fluoreszenz im Verhältnis F1 zu F2 darzustellen, wobei F1 der Messkanal ist, dessen Signal mit steigendem Produkt fällt und F2 der Messkanal ist, dessen Signal mit steigendem Produkt ansteigt .

2.2.3 Grundlagen der qualitativen PCR im LightCycler

Für die für uns relevante Detektion von Mutationen im Genom ist das qualitative Erfassen des LightCyclers mittels Schmelzkurvenanalyse von Bedeutung. Die Amplifizierung der DNA ist notwendige Voraussetzung hierfür, soll aber nur kurz besprochen werden.

Die PCR beruht im wesentlichen auf drei relevanten Schritten, die zyklisch wiederholt werden. Der erste Schritt ist die sogenannte Denaturierung: durch Erhitzen auf 95°C wird die doppelsträngige DNA in Einzelstränge zerlegt. Dies ist Voraussetzung für die nun folgende „Annealing“- Phase (= Anlagerungs-Phase). In dieser Phase lagern sich nach entsprechender Abkühlung auf die jeweilige optimale Hybridisierungstemperatur die Primer nun an den komplementären Abschnitt der DNA an. Die Amplifikation erfolgt durch die Taq- Polymerase, die bei 72°C optimal arbeitet. Diese synthetisiert den Gegenstrang in 5'- 3'- Richtung.

Mittels Hybridisierungssonden können Mutationen im Genom analysiert werden. Grundlage hierfür ist ein zusätzlicher Zyklus, der sich an die Amplifikationszyklen anschließt., der „Melting“ Zyklus (= Schmelz- Zyklus). Die Sonden lagern sich in der sogenannten „Annealing“- Phase von ca. 30s- 2 min Dauer an die DNA an. Die Temperatur sollte allerdings 5- 10°C unterhalb der „Annealing“- Temperatur der Primer liegen. Anschließend wird die Temperatur erhöht, die Sonden schmelzen hierbei ab. Der Schmelzpunkt T_m hängt von verschiedenen Faktoren ab: der CG- Gehalt der Sonden spielt eine Rolle, ebenso wie die Länge der Sonden. Auch das Design der Sonden ist ausschlaggebend: eine Sonde, die „Anchor“- Sonde, welche verantwortlich für das Fluoreszenzsignal ist, ist länger als die Detektor- Sonde und weist somit einen höheren Schmelzpunkt um ca. 5°C auf. Die Detektor- Sonde bindet im Bereich der Mutation, woraus sich ein weiteres Arbeitsprinzip ergibt. Die Passgenauigkeit ist ein wichtiger Faktor in der Schmelzkurvenanalyse, da bereits ein Unterschied von einer Base zwischen der Ziel-DNA und der Sonde bei z.B. einer Punktmutation (single point mutation= SNP) zu einer Verringerung der Sonden- T_m um ca. 5- 8°C führt.

Erreicht wird dies über eine langsame Temperaturerhöhung der Kammer um 0,1– 0,2°C, währenddessen wird das Fluoreszenzsignal kontinuierlich gemessen und als Schmelzkurve aufgezeichnet (vgl. Abbildung 4).

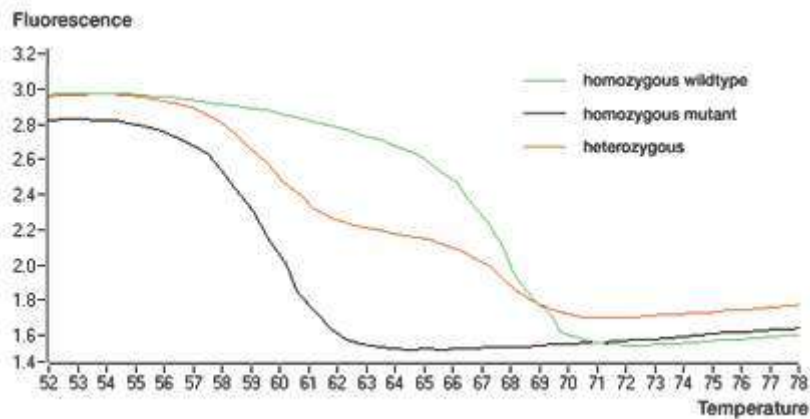


Abbildung 4: Schmelzkurve

Aufgrund der Temperaturerhöhung und dem beschriebenen Bindungsverhalten der Sonden ergibt sich, dass die kürzere und instabilere Sonde zuerst abschmelzen wird. Dadurch vergrößert sich der Abstand zwischen den Farbstoffen („FRET“, s. 2.2.2.1, Hybridisation Probes Format) und das Fluoreszenzsignal nimmt ab. Umso homogener die Sonde an die Ziel-DNA passt, desto höher ist folglich auch die Schmelztemperatur.

Das LightCycler- Programm nimmt im Folgenden die erste negative Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur ($-dF/dT$) und zeichnet die unterschiedlichen Schmelztemperaturen graphisch auf. Eine homozygote, mutierte Probe weist einen niedrigeren Schmelzpunkt auf, eine homozygote Wildtyp- Probe einen definierten Schmelzpunkt höherer Temperatur. Die heterozygote Probe weist zwei Schmelzpunkte auf, die sich mit dem niedrigeren T_m der homozygot mutierten Probe und dem höheren T_m der homozygoten Wildtyp- Probe decken (siehe Abbildung 5).

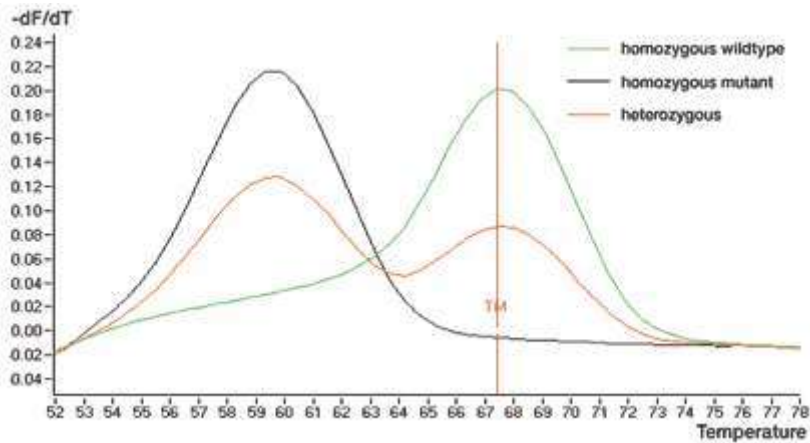


Abbildung 5: $-dF/dT$ - Ableitung

2.2.4 LightCycler PCR

Primer und Sonden:

Die Anordnung der Primer und Sonden an die DNA sollte so erfolgen, dass sie sich nicht überlappen.

Die Schmelztemperatur der Sonden liegt ca. 15°C über der Schmelztemperatur der Primer, so dass die Sonden vor den Primern hybridisiert werden.

Der Schmelzpunkt der Primer kann über den C/G- Gehalt berechnet werden, wobei die Schmelztemperatur für optimale Bedingungen experimentell bestimmt werden sollte. Die „Annealing“- Temperatur kann hierbei bis zu 5°C unter der Berechneten sein.

Für diese Arbeit wurden Primer und Sonden von Tib Molbiol synthetisiert und in Testläufen überprüft.

Die verwendeten Sonden und Primer zeigen die folgende Tabellen. Die Sonden waren passend zum homozygoten Wildtyp.

Folgende Primer wurden verwendet:

-238 TNF alpha	5' – CCTgCATCCTgTCTggAAgTTA
	5' – CTgCACCTTCTgTCTCggTTT
+2607 IL8RA	5' – gCCAAgAACTCCTTgCTgAC
	5' – CTggCTgCCCTACAACC
+48892 IL6R	5' – CATCTCACCTCAgAACAATgg
	5' – TCCTTTgAggCTTTTgACA
+24013 IL6R	5' – CCAgTgAACAgTggCATT
	5' – TgggCCACTTCATCATTATCA

Tabelle 4: Sequenzen der PCR Primer

Folgende Sonden wurden verwendet:

-238 TNF alpha	5'–LC Red640- CCCTgCTCCgATTCCgA- -PH
	5'–ggATACCCCTCACACACTCCCCATCC- -FL
+2607 IL8RA	5'- LC Red640– gggTCCTCATAgggTgTCTgCCA- -PH
	5'– CTCACAgCTCTCCTggATCACC- -FL
+48892 IL6R	5'– LC Red640– gTACCACTgCCCACATTCCTggTT- -PH
	5'– TTAACCTAgTgCAAgCTTCTTCTTC- -FL
+24013 IL6R	5'- TCAgCACgCCTCTCggCC- -FL
	5'– LC Red640– CCTCTggAggAgggAgAAgACACTTg- -PH

Tabelle 5: Sequenzen der PCR Sonden

2.2.5 LightCycler PCR Protokoll

Gearbeitet wurde mit einem bereits im Labor etablierten Verfahren, das Protokoll wurde hierbei nur unwesentlich abgeändert. Neu eingestellt wurde lediglich die „Annealing“- Temperatur und die entsprechende „Hold- Time“ im „Melting- Zyklus“. Die „Annealing“- Temperatur wurde auf 40°C abgesenkt, um den Sonden genügend Zeit für die Anlagerung an die DNA zu gewähren. Die entsprechende „Hold- Time“ wurde hierfür auf 2 min erhöht.

Angepasst wurde zum Dritten die „Melting- Slope“ – Einstellung in Segment 3 des „Melting- Zyklus“, hierbei erfolgt ein linearer Temperaturanstieg von 40°C auf 95°C mit 0,25°C/sec (= „Slope“). In mehreren Schmelzversuchen der PCR- Amplifikate in denselben LightCycler- Kapillaren, die ohne großen Qualitätsverlust bis zu achtmal verwendet werden können, wurde die „Melting- Slope“- Einstellung in 0,05°C/ sec- Schritten variiert und auf schließlich 0,25° C/ sec abgeglichen.

Zur Darstellung wurde der Abgleich F1 zu F2 gewählt (siehe 2.2.2.1), ebenso die erste Ableitung $-dF/dT$ (siehe 2.2.3).

Ein Lauf dauerte ca. 60 min bei 48 Zyklen, wobei das Schmelzen ca. 10 min in Anspruch nahm.

Ein Protokoll wird in Abbildung 6 exemplarisch gezeigt.

Program:	Denaturierung				Type	Quantification	Cycles	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	95	540	20	0	0	0	None	

Program:	Amplifizierung				Type	Quantification	Cycles	45
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	95	3	20	0	0	0	None	
2	54	15	20	0	0	0	Single	
3	72	25	20	0	0	0	None	

Program:		Schmelzen			Type	Melting Curves		Cycles	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Tune (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode		
1	95	20	20	0	0	0	None		
2	40	120	20	0	0	0	None		
3	80	0	0.25	0	0	0	Continuous		

Program:		Abkühlen			Type	Melting Curves		Cycles	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode		
1	40	30	20	0	0	0	None		

Melting Analysis Settings			
Channel Setting	F2/ F1		
ProgramName	Schmelzen		
Start Time	1:00:36.4	Stop Time	1:03:19.7

Abbildung 6: Verwendetes LightCycler-Protokoll für eine PCR mit Hybridisierungssonden

2.2.6 Proben und „Mastermix“

Das Pipettierschema hielt sich ebenso an das im Labor etablierte Verfahren, um die besten Einstellungen zu erlangen wurde allerdings mit einigen Parametern experimentiert.

So wurde unter anderem eine DNA–Verdünnungsreihe mit TNF alpha– Proben in den Schritten 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 durchgeführt, deutlich wurde hierbei, dass die niedrigen Verdünnungen 1:10 und 1:100 die besten Ergebnisse erzielten, zur unverdünnten DNA– Ableitung ließ sich jedoch kein Unterschied feststellen, so dass im Folgenden ohne DNA- Verdünnung gearbeitet wurde.

Des weiteren wurde an der Zusammensetzung des „Mastermix“ gearbeitet. Zunächst wurde ein Titrationsverlauf mit MgCl₂ durchgeführt, da die optimale Einstellung der MgCl₂– Konzentration sowohl in der Lage ist, den „Crossing–Point“ (definiert als die Zyklenzahl, bei der das Fluoreszenzsignal die Schwelle

überschreitet) zu erniedrigen, als auch das höchste Fluoreszenzsignal und die steilste Schmelzkurve zu erzeugen.

Die MgCl₂- Konzentration wurde jedem Primer/ Sonden-Paar mit einer Titration von 2–5 mMol MgCl₂ angepasst, jedes Mal ergab sich eine optimale Konzentration von 3mMol, die ins Protokoll aufgenommen wurde.

Ebenso wurde eine Primer– Titration mit 7,5pmol, 5pmol und 2,5pmol durchgeführt. Diese sogenannte „asymmetrische PCR“ wurde durchgeführt, um den „Hook– Effekt“ zu verringern. Hierbei lagern sich die Einzelstränge nach der Denaturierungsphase erneut aneinander an und zwar, wenn die Produktmenge am Ende der PCR hoch ist, schneller als die Sonden, die an ihre Zielstruktur binden wollen.

Verantwortlich für den „Hook– Effekt“ ist also ein gegenseitiges Verdrängen im Bindungsverhalten der „Hybridization Probes“ (s. 2.2.2.1) und ein erneutes Anlagern der PCR– Produkte.

Dies hat keinen Effekt auf die Interpretation der Ergebnisse, kann aber durch die asymmetrische PCR vermieden werden. Hierzu muss der Primer des sondenbindenden Strangs in niedrigerer Konzentration angesetzt werden als der Primer des nicht– sondenbindenden Strangs.

Daraus ergab sich für die verschiedenen Zytokine teilweise ein unterschiedlicher „Mastermix“, wie Tabelle 6 zeigt.

<u>-238 TNF alpha:</u>	<u>+2607 IL8RA:</u>
2,9 µl H ₂ O	2,4 µl H ₂ O
1,6 µl MgCl ₂	1,6 µl MgCl ₂
1 µl TNF alpha se	1,5 µl IL8RA S
0,5 µl TNF alpha as	0,5 µl IL8RA A
1 µl -238[G]640	1 µl Anchor IL8RA
1 µl -238Anc	1 µl Sensor wt
2 µl Taq-Polymerase	2 µl Taq-Polymerase

<u>+48892 IL6R:</u>	<u>+24013 IL6R:</u>
2,4 µl H ₂ O	2,4 µl H ₂ O
1,6 µl MgCl ₂	1,6 µl MgCl ₂
1,5 µl IL6R_F2	1,5 µl IL6R_R
0,5 µl IL6R_R2	0,5 µl IL6R_F
1 µl Anchor 2	1 µl Anchor
1 µl Sensor [C]	1 µl Sensor [G]
2 µl Taq-Polymerase	2 µl Taq-Polymerase

Tabelle 6: „Mastermix“

Pipettierschema:

Zunächst wurden die von Tib Molbiol gelieferten Sonden und Primer mit H₂O aufgelöst, wobei die Primer mit 1000µl H₂O gelöst wurden, was einer Konzentration von je 5µM entspricht. Die Sonden wurden teils in 300µl H₂O, teils in 100µl H₂O gelöst, entsprechend einer jeweiligen Konzentration von 3µM. Sowohl Sonden als auch Primer wurden im Anschluß gevortext und kühl gelagert.

Jede LightCycler PCR wurde unter Verwendung von „*FastStart DNA Master Hybridization Probes Kit*“ (Roche Diagnostics) durchgeführt. Die darin erhaltene Taq Polymerase arbeitet nach dem „Hot Start“- Prinzip, dessen größter Vorteil in der weitgehenden Vermeidung von unspezifischen Produkten liegt. Verhindert wird dies über den „Hot Start“: die Taq-Polymerase wird erst nach einer Erhitzung auf 95°C für 10min aktiv. Zuvor muss die Taq-Polymerase unter sterilen Bedingungen angesetzt werden. Hierfür werden zum „*FastStart Enzym*“ 60 µl des „*FastStart Reaction Mix*“ dazu pipettiert und in einem Kühlblock zwischengelagert.

Es wurde wie folgt pipettiert:

1. Proben: 2µl DNA + 8µl H₂O
2. „Mastermix“: 10 µl

Es ergab sich also ein Gesamtvolumen von 20µl.

Zunächst wurden in die LightCycler Kapillaren 2µl DNA und 8 µl H₂O gegeben und diese in einen gekühlten Halterblock gestellt. Ebenso wurde eine

Negativkontrolle von 10µl H₂O beigefügt. Anschließend wurde unter sterilen Bedingungen der „Mastermix“ erstellt, wobei sich das jeweilige Ansatzvolumen an der Zahl der Proben plus einem Puffer von ca. +2 Proben orientierte, falls Kapillaren brechen oder Pipettierfehler unterlaufen sollten.

Die „Mastermix“-Reagenzien und der „Mastermix“ selbst waren während des gesamten Vorgangs stets kühl bei ca. 4°C gelagert. Alle Reagenzien bis auf die Taq-Polymerase wurden vor Gebrauch sorgfältig gevortext. Nach Herstellung wurden 10µl „Mastermix“ in die Glaskapillaren zu dem 10µl DNA/ H₂O – Gemisch gegeben und anschließend wurde jede Kapillare mit einem Deckel verschlossen. Die Kapillaren wurden nun in das Probenkarussell eingesetzt und für 20sec bei maximal 3000 Umdrehungen zentrifugiert und in das LightCycler-Gerät gegeben.

2.2.7 Auswertung der LightCycler PCR

Wie in Punkt 2.2.3. beschrieben erfolgte die Auswertung. Durch Unterschiede in der Schmelztemperatur konnten auftretende Mutationen identifiziert werden.

2.2.8 Statistische Auswertung

Grundlage der Auswertung bildete die logistische Regression von Y auf X, wobei Y als Ziel- und X als Einflussgröße definiert wurde. Da es sich bei den verwendeten Daten um nominale und ordinale handelte, wurden sogenannte Kontingenztafeln gebildet. Für jede einzelne Zelle der Tabelle wurden die Häufigkeiten mit Hilfe der Spalten- und Zeilensummen berechnet. Eine zweiseitige Häufigkeitstabelle kann graphisch als Mosaik Plot dargestellt werden. Ein Mosaik Plot gliedert sich in Rechtecke, wobei jedes Rechteck proportional zur Häufigkeit des Merkmals von Interesse ist. Der „Likelihood Ratio Chi- Quadrat Test“ zeigte weiter, ob signifikante Unterschiede in den Häufigkeiten der Kontingenztafel vorlagen. Der „Likelihood Ratio Chi- Quadrat Test“ ist ein Verfahren zum Vergleich von Modellen auf der Grundlage

des „Maximum- Likelihood“- Schätzverfahrens. Verglichen werden hierbei jeweils zwei Modelle: Ein Ausgangsmodell, welches mehrere Modellparameter enthält, und ein Vergleichsmodell, in welchem einem oder mehreren dieser Parameter Restriktionen auferlegt wurden. Grundlage hierfür bildet die Chi-Quadrat- Verteilung, wobei die Zahl der Freiheitsgrade der Zahl der Restriktionen entspricht. Die Regressionskoeffizienten der logistischen Regression sind nicht einfach zu interpretieren. Daher bildet man häufig die sogenannten Effektkoeffizienten durch Bildung des Antilogarithmus; die Regressionsgleichung bezieht sich dadurch auf die „Odds“ oder Chancen. Die Odds Ratio oder das Chancenverhältnis ist ein Messinstrument für die Stärke des Unterschieds zwischen zwei Gruppen und kann daher als Zusammenhangsmaß aufgefasst werden. Dabei werden Chancen der beiden Gruppen auf ein definiertes Ereignis zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die Genauigkeit der Odds Ratio wird durch das 95% Konfidenzintervall angegeben. Ein großes Konfidenzintervall bedeutet eine hohe Variabilität der Daten.

Generell wurde in dieser Arbeit mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0.05$ gearbeitet.

Aufgrund der relativ niedrigen Fallzahl wurden bei der statistischen Auswertung der Allelfrequenz hinsichtlich der Nationalität deutsch- türkisch und hinsichtlich der Diagnose folgende Zusammenfassungen vorgenommen: bei der Auswertung des Trägerstatus und der Allelfrequenz hinsichtlich der Nationalität wurden die Patienten- und Kontrollgruppen zu einer Vergleichsgruppe zusammengenommen, bei der Auswertung des Trägerstatus und der Allelfrequenz hinsichtlich der Diagnose M. Behcet- Gesund wurden die Nationalitäten zu einer Vergleichsgruppe zusammengefasst.

Alle Analysen wurden mit dem statistischen Programm Jump 5.1 erstellt.

2.2.9 Patienten- und Kontrollproben

Insgesamt wurden 194 Patientenproben untersucht, wobei 94 deutsche Patientenproben und 30 türkische Patientenproben untersucht wurden. Die deutschen Patientenproben stammten aus der medizinischen Universitätsklinik Tübingen, PD Dr. med Kötter und aus der Dermatologie in Berlin aus der Charite, Campus Benjamin Franklin, Prof. Zouboulis und erfüllten alle die erforderlichen Diagnosekriterien. Ebenso gilt dies für die türkischen Patienten- und auch Kontrollproben, die teilweise aus der medizinischen Universitätsklinik Tübingen, PD Dr. med Kötter, stammten und teilweise aus der Türkei, Prof. Yazici/Prof. Fresko, Cerraphasa Universität, Rheumatologie, Istanbul.

Die türkischen Kontrollen wurden ebenfalls aus denselben Quellen wie die Patientenproben bezogen.

Die 50 deutschstämmigen Kontrollproben stammten aus dem Labor Professor Einsele, Tübingen.

Die Laboruntersuchungen wurden nach einer Einverständniserklärung der Probanden und dem Vorliegen des Tübinger Ethik Votums aufgenommen.

Die Anzahl der untersuchten Proben variiert um ± 2 je untersuchtes Zytokin, da manche der Proben durch den LightCycler nicht erkannt werden konnten.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der qualitativen LightCycler PCR des -238 TNF alpha Polymorphismus

Wie in Punkt 2.2.3 beschrieben, wurden die insgesamt 92 Patientenproben und 51 Kontrollproben aus Deutschland, 30 Patientenproben und 20 Kontrollproben aus der Türkei mit den in Punkt 2.2.5.1 gezeigten Primern und Sonden untersucht. Alle Proben wurden detektiert. Untersucht wurde der Polymorphismus -238 TNF alpha, welcher auf Chromosom 6p21 lokalisiert ist. Drei Genotypen existieren: der homozygote Wildtyp GG, der heterozygote Genotyp GA und der homozygot mutierte Genotyp AA.

Exemplarisch zeigt Abbildung 7 die $-dF/dT$ Ableitung, aus der ersichtlich wird, dass sich bei dem nachgeprüften Zytokin TNF alpha in dieser Arbeit keine homozygote Mutation auf dem untersuchten Genabschnitt finden ließ.

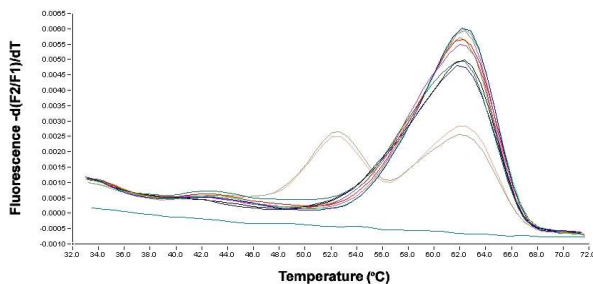


Abbildung 7: $-dF/dT$ Ableitung von -238 TNF alpha

Zur genaueren Festlegung der Schmelzpunkte wurde die Darstellung „Area“ ($-d(F2/F1)/dT$) gewählt, die durch vertikale Linienverschiebung durch den Schmelzpunkt ausgewählter Proben eine exaktere Bestimmung der Schmelztemperatur erlaubt, wie Abbildung 8 darlegt.

Für die heterozygoten Proben wurden die Schmelzpeaks bei einer Temperatur von 52,2°C und 62°C ermittelt. Die homozygoten Wildtyp-Proben waren deckungsgleich auf 62°C.

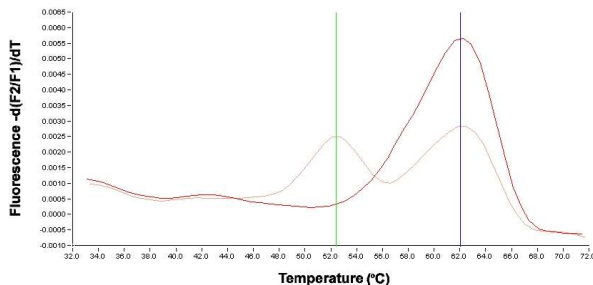


Abbildung 8: „Area“- Darstellung von -238 TNF alpha

Wie Abbildung 8 zeigt, war keine homozygote Mutation auf dem untersuchten Genabschnitt nachzuweisen.

Heterozygot mit dem Genotyp GA waren von den Patientenproben aus Deutschland insgesamt 14, in der Kontrollgruppe fand sich eine Anzahl von 7 Proben. Den homozygoten Wildtyp GG wiesen bei den Patientenproben 79 und bei den Kontrollproben 44 auf. Bei den Patientenproben aus der Türkei war eine Probe heterozygot, aus der Kontrollgruppe 2. 27 Patientenproben zeigten den homozygoten Wildtyp, ebenso 18 Proben aus der Kontrollgruppe.

Prozentual entspricht dies einem Anteil von 85% homozygoten Wildtyp-Patientenproben aus Deutschland, was mit nur einem Prozentpunkt Unterschied (86%) fast dem Anteil der Kontrollgruppe entspricht.

Der Patientenanteil von 4% Heterozygoten-Proben aus der Türkei steht einem 10% igen Anteil aus der Kontrollgruppe gegenüber.

Der Vergleich Deutschland– Türkei ergab sowohl bei den Patienten-, als auch bei den Kontrollgruppen keinerlei Unterschiede bezüglich der heterozygot detektierten (13%) und der homozygot Wildtyp detektierten(87%) Proben (siehe Tabelle 23).

Insgesamt wiesen 21 Deutsche den heterozygoten Genotyp GA auf, was einem prozentualen Anteil von 15% entspricht und 122 Deutsche den homozygoten Wildtyp GG, was 85% ausmacht.

3 der türkischen Proben zeigten den heterozygoten Genotyp GA, was bei insgesamt 50 Proben einem prozentualen Anteil von 6% entspricht und 47 Proben präsentierten den homozygoten Wildtyp GG, was 94% entspricht.

Tabelle 7 gibt nochmals einen Überblick über die genannten Zahlen, während Abbildung 9 einen graphischen Überblick über die Verteilung der Genotypen des untersuchten Polymorphismus -238 TNF alpha hinsichtlich der Nationalität deutsch- türkisch verschaffen soll.

-238 TNF alpha:

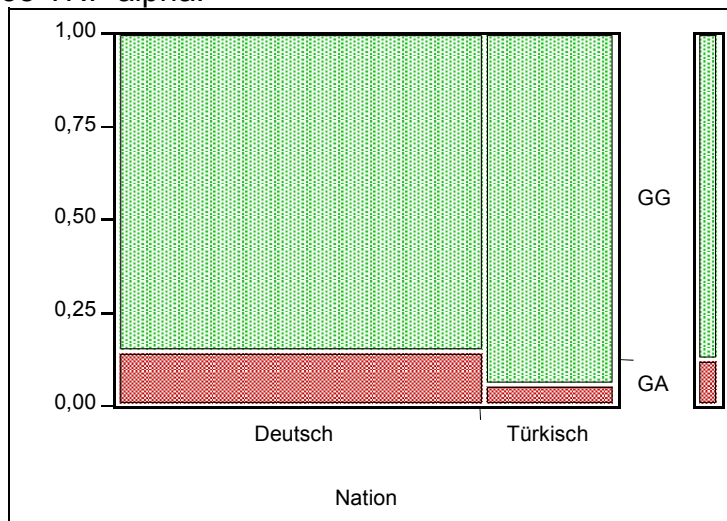


Abbildung 9: Verteilungsdiagramm der Genotypen hinsichtlich der Nationalität deutsch- türkisch (Patienten- und Kontrollproben zusammengefasst)

Genotyp	GA	GG	
-238 TNF alpha			
Deutsch	21	122	143
%	15	85	
Türkisch	3	47	50
%	6	94	
	24	169	193

Tabelle 7: Anzahl der Genotypen und prozentualer Anteil hinsichtlich der Nationalitäten (Patienten- und Kontrollproben zusammengefasst)

Des weiteren wurden insgesamt 15 Patientenproben mit heterozygotem Genotyp detektiert. Dies macht einen Anteil von 12% aus. 107 Patientenproben oder 87% zeigten den homozygoten Wildtyp.

Bei der Kontrollgruppe fanden sich 9 heterozygote Genotypen (12%) und 62 homozyote Wildtypen (87%). Die Ergebnisse der Kontrollgruppe sind mit denen der Patientengruppe somit hinsichtlich der prozentualen Verteilung deckungsgleich. Tabelle 8 und Abbildung 10 sollen dies nochmals veranschaulichen.

Genotyp	GA	GG	
-238 TNFalpha			
M. Behcet	15	107	122
%	13	87	
Kontroll- gruppe	9	62	71
%	13	87	
	24	169	193

Tabelle 8: Anzahl der Genotypen und prozentualer Anteil hinsichtlich der Diagnose (Nationalität deutsch- türkisch zusammengefasst)

-283 TNF alpha:

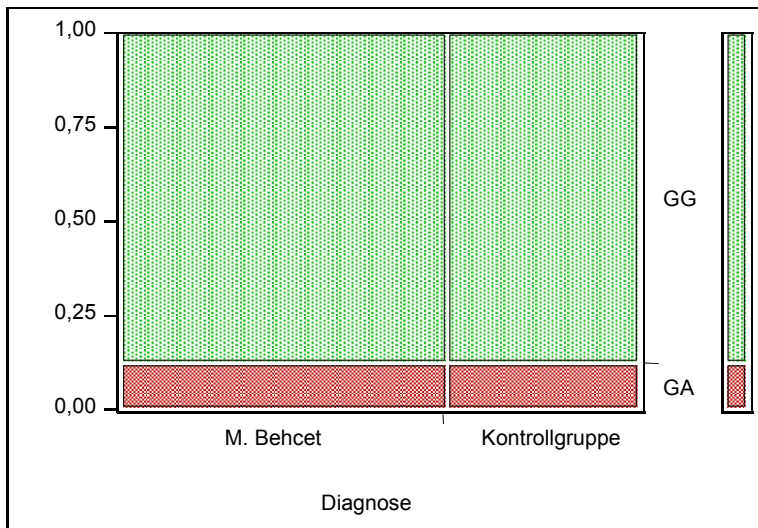


Abbildung 10: Verteilungsdiagramm der Genotypen hinsichtlich der Diagnose (Nationalität deutsch- türkisch zusammengefasst)

Trägerstatus und Allelfrequenz wurden hinsichtlich der Nationalitäten deutsch-türkisch und hinsichtlich der Diagnose M. Behcet auf statistisch signifikante Zusammenhänge untersucht. Es ergeben sich folgende Resultate:

WT- Allelfrequenz -238 TNFalpha	p- Wert	Odds ratio	Odds lower	Odds upper
Nation [Deutsch]	0.1280	0.3842	0.0893	1.1462
Diagnose [M.Behcet]	0.8649	1.0771	0.4404	2.4972

Tabelle 9: WT- Allelfrequenz –238 TNF alpha hinsichtlich Nation und Diagnose

Wie aus Tabelle 9 hervorgeht, ergibt sich ein p- Wert von 0.1280 hinsichtlich der WT-Allelfrequenz der untersuchten Nationalitäten deutsch- türkisch. Dieses

Ergebnis ist als nicht signifikant anzusehen, so dass kein Unterschied in der Allelfrequenz in den verschiedenen Nationalitäten festzustellen ist.

Gleichzeitig haben Deutsche eine 0.3842fache Chance [0.0893- 1.1462] auf das WT-Allel G, somit finden sich weniger WT-Allele bei Deutschen als bei Türken. Eine deutsche Ethnizität scheint somit keinen protektiven Einfluß auf die Mutationshäufigkeit zu haben.

Des weiteren finden sich ebenso keine signifikanten Ergebnisse (p-Wert= 0.8649) für eine Unterscheidung der Allelfrequenz hinsichtlich der Diagnose M.Behcet. Die Patienten- und Kontrollgruppen differieren bezüglich der WT-Allelhäufigkeit nicht.

Eine errechnete Odds ratio von 1.0771 läßt keinen Unterschied in der Chancenverteilung zwischen Patienten und Gesunden erkennen.

Homozygoter WT-Trägerstatus -238 TNFalpha	p- Wert	Odds ratio	Odds lower	Odds upper
Nation [Deutsch]	0.1206	0.3697	0.0845	1.1378
Diagnose [M.Behcet]	0.8872	1.0665	0.4230	2.5619

Tabelle 10: homozygoter WT- Trägerstatus –238 TNF alpha hinsichtlich Nation und Diagnose

Da keine homozygoten Mutationen bei -238 TNFalpha detektiert wurden, gleichen sich die Ergebnisse des Trägerstatus mit den Ergebnissen der Allelfrequenz.

Der p-Wertes des homozygoten WT- Genotyps der Nationen deutsch und türkisch beträgt 0.1206 und kann nicht als signifikantes Unterscheidungsmerkmal gewertet werden.

Gleichzeitig beträgt die Odds ratio 0.3697 [0.0845- 1.1378] bezüglich der Chance auf den homozygoten WT- Trägerstatus bei Deutschen. Das WT- Allel

findet sich bei Deutschen damit weniger häufig als bei Türken. Wiederum scheint eine deutsche Ethnizität keinen protektiven Einfluss auf die Mutationshäufigkeit zu haben.

Darüber hinaus differieren die Patienten- und Kontrollgruppen nicht in der Ausprägung des homozygoten WT- Trägerstatus GG ($p=0.8872$), ebenso lässt sich kein Unterschied in der Chancenverteilung finden (Odds ratio= 1.0665; 0.4230- 2.5619) (siehe Tabelle 10).

Eine deutsche Ethnizität scheint somit keinen protektiven Einfluss auf die Mutationshäufigkeit zu haben, sowohl hinsichtlich der Allelfrequenz als auch hinsichtlich des Trägerstatus, gleichzeitig fand sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Allelfrequenz und des Trägerstatus der Nationen deutsch- türkisch. Eine errechnete Odds ratio von 1 lässt keinen Unterschied in der Chancenverteilung hinsichtlich Allelfrequenz und Trägerstatus zwischen Patienten und Gesunden erkennen, gleichzeitig besteht keine Assoziation zu M. Behcet ($p= 0.8649$ bzw. 0.8872).

3.2 Ergebnisse der qualitativen LightCycler PCR des +2607 IL8RA Polymorphismus

Untersucht wurden 94 Patientenproben und 51 Kontrollproben aus Deutschland, wobei Probennummer 2 aus der Kontrollgruppe nicht detektiert werden konnte. Aus der Türkei wurden 30 Patienten-, sowie 20 Kontrollproben geprüft. Verwendet wurden die Sonden und Primer wie in Punkt 2.2.5.1 beschrieben. Der +2607 IL8RA- Polymorphismus befindet sich auf Chromosom 2q34- 35 und präsentiert sich im homozygoten Wildtyp mit GG, mit dem heterozygoten Genotyp GC und dem homozygot mutiertem Genotyp CC.

Erneut konnte in dieser Arbeit keine homozygote Mutation nachgewiesen werden, wie aus Abbildung 11 hervorgeht. Die $-dF/dt$ -Ableitung zeigt eine insgesamt zufriedenstellende graphische Darstellung des untersuchten Materials.

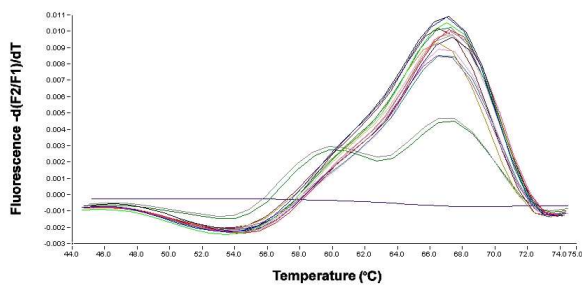


Abbildung 11: $-dF/dT$ - Ableitung von +2607 IL8RA

Der Schmelzpeak für homozygot Wildtyp detektierte Proben wurde über die „Area“-Darstellung bei 67,2 °C ermittelt, für heterozygoten Proben ergaben sich die Peaks bei 60,8 °C und 67,2°C (Abbildung 12).

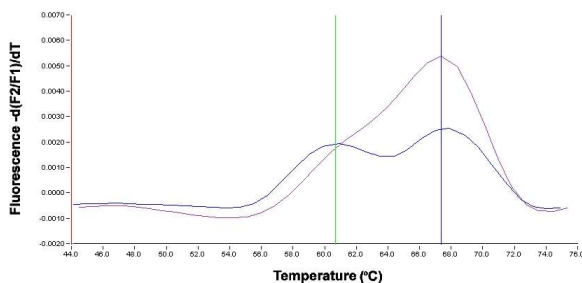


Abbildung 12: „Area“-Darstellung von +2607 IL8RA

Der zu untersuchende Genabschnitt wies keine homozygote Mutation auf, wie aus Abbildung 12 zu entnehmen ist.

Heterozygot mit dem Genotyp GC waren 9 Patientenproben aus Deutschland, sowie 3 aus der Türkei. Die Rate blieb sich bei den jeweiligen Kontrollgruppen nahezu gleich: hier waren 7 Proben aus Deutschland und 4 aus der Türkei heterozygot.

Folglich gleichen sich auch die Ergebnisse der homozygoten Wildtyp GG-Proben: hier ergab sich eine Anzahl von 85 Patienten- und 43 Kontrollproben aus Deutschland, sowie 27 Patienten- und 16 Kontrollproben, die in der Türkei gewonnen wurden.

Prozentual gesehen ergibt sich beim Vergleich der Patienten- zu den Kontrollproben aus Deutschland ein Unterschied von 5%, bei den türkischen Proben eine Differenz von 10% hinsichtlich der Heterozygotitätsrate. Im Gesamtvergleich ergibt sich eine Abweichung von 6% der Patientenproben aus

Deutschland und Türkei gegenüber der Kontrollgruppe Deutschland/ Türkei (siehe Tabelle 23).

Insgesamt waren 16 Proben der Deutschen heterozygot (GC), was einem prozentualen Anteil von 11% entspricht. Bei den türkischen Proben waren 7 heterozygot, dies macht einen Anteil von 14% aus. 127 der deutschen Blutproben erwiesen sich als homozygoter Wildtyp (GG), was bei 143 Gesamtpuben einem Anteil von 89% entspricht. Ähnlich die Situation bei den untersuchten türkischen Proben. Hier wurden 44 GG- Träger ermittelt, es ergeben sich somit 86% homozygote Wildtypen- Träger.

Abbildung 13 soll dieses Ergebnis erneut graphisch veranschaulichen. Tabelle 11 führt die genannten Zahlen nochmals im Überblick an.

Genotyp	GC	GG	
+2607 IL8RA			
Deutsch	16	127	143
%	11	89	
Türkisch	7	44	51
%	14	86	
	23	171	194

Tabelle 11: Anzahl der Genotypen und prozentualer Anteil hinsichtlich der Nationalitäten (Patienten- und Kontrollproben zusammengefasst)

+2607 IL8RA:

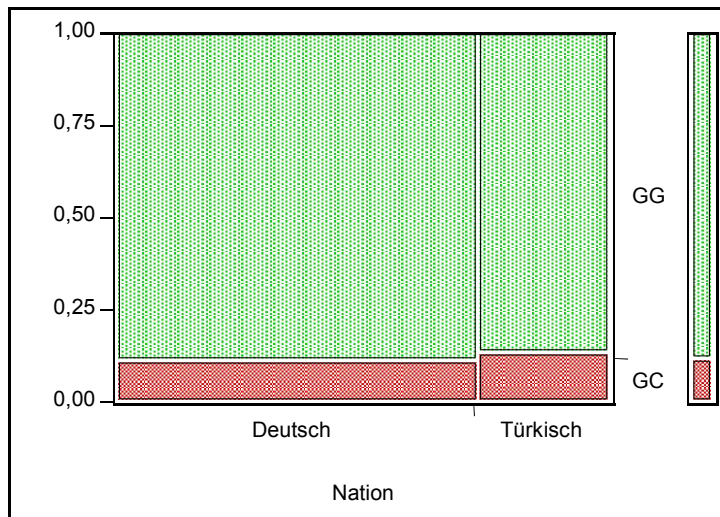


Abbildung 13: Verteilungsdiagramm der Genotypen hinsichtlich der Nationalität (Patienten- und Kontrollproben zusammengefasst)

Wie Tabelle 12 und Abbildung 14 zeigen, fanden sich darüber hinaus bei den Patientenproben im Gesamten 12 heterozygote Genotypen, was einem prozentualen Anteil von 10% entspricht. 16% der Kontrollgruppe wiesen denselben Genotyp auf, hier wurden insgesamt 11 Proben mit dem heterozygoten Genotyp detektiert. 112 der Patientenproben (90%) und 59 Proben der gesunden Kontrollgruppe zeigten den homozygoten GG-Trägerstatus.

Genotyp	GC	GG	
+2607 IL8RA			
M. Behcet	12	112	124
%	10	90	
Kontroll- Gruppe	11	59	70
%	16	84	
	23	171	194

Tabelle 12: Anzahl der Genotypen und prozentualer Anteil hinsichtlich der Diagnose (Nationalität deutsch- türkisch zusammengefasst)

+2607 IL8RA:

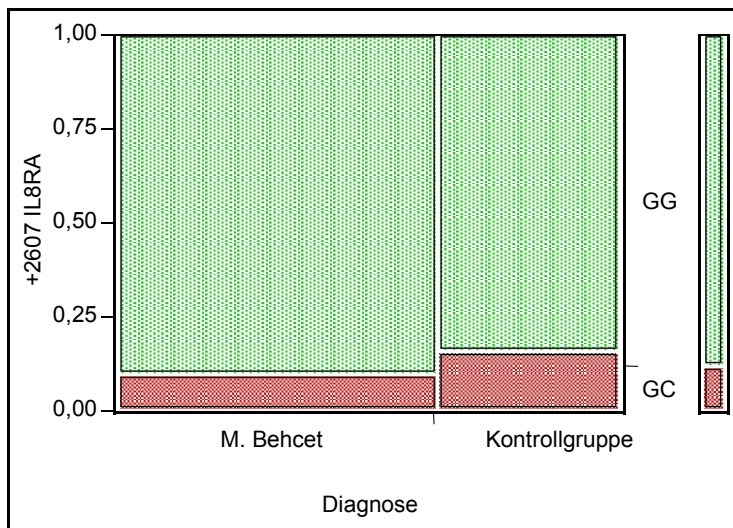


Abbildung 14: Verteilungsdiagramm der Genotypen hinsichtlich der Diagnose (Nationalität deutsch- türkisch zusammengefasst)

Trägerstatus und Allelfrequenz wurden hinsichtlich der Nationalitäten deutsch-türkisch und hinsichtlich der Diagnose M. Behcet auf statistisch signifikante Zusammenhänge untersucht. Es ergeben sich folgende Resultate:

WT- Allelfrequenz +2607 IL8RA	p- Wert	Odds ratio	Odds lower	Odds upper
Nation [Deutsch]	0.6765	1.2165	0.4546	2.9516
Diagnose [M.Behcet]	0.2378	1.6652	0.7035	3.9058

Tabelle 13: WT- Allelfrequenz +2607 IL8RA hinsichtlich Nation und Diagnose

Bei einem errechneten p-Wert von 0.6765 hinsichtlich der WT-Allelfrequenz der untersuchten Nationalitäten deutsch- türkisch ergibt sich kein Unterschied in der WT-Allelhäufigkeit G in den ethnischen Gruppen.

Gleichzeitig ist die Chance auf das WT-Allel bei Deutschen 1.2165fach [0.4546- 2.9516] derjenigen der Türken, so dass mehr WT-Allele bei Deutschen als bei Türken zu finden sind. Eine deutsche Ethnizität scheint somit ein protektiver Faktor in Bezug auf die Mutationshäufigkeit zu sein.

Keine Signifikanz (p-Wert= 0.2378) findet sich für eine Unterscheidung der Allelfrequenz hinsichtlich der Diagnose M.Behcet. Die Patienten- und Kontrollgruppen differieren bezüglich der WT-Allelhäufigkeit nicht.

Dabei ist die Chance auf das WT-Allel G bei Patienten 1,6fach derjenigen bei Gesunden [0.7035- 3.9058]. Es ergeben sich mehr WT-Allele bei Patienten mit M.Behcet als bei der gesunden Kontrollgruppe, das WT-Allel scheint somit keinen protektiven Einfluss bezüglich des M. Behcet auszuüben.

Homozygoter WT-Trägerstatus +2607 IL8RA	p- Wert	Odds ratio	Odds lower	Odds upper
Nation [Deutsch]	0.6657	1.2348	0.4475	3.1149
Diagnose [M.Behcet]	0.2222	1.7275	0.7086	4.1791

Tabelle 14: Homozygoter WT- Trägerstatus +2607 IL8RA hinsichtlich Nation und Diagnose

Erneut konnten keine homozygoten Mutationen bei +2607 IL8RA detektiert werden, daher gleichen sich die Ergebnisse des Trägerstatus mit den Ergebnissen der Allelfrequenz.

Es ergab sich keine signifikante Differenz (p-Wert= 0.6657) in den Nationalitäten deutsch- türkisch bezüglich des homozygoten WT-Trägerstatus. Die Chance der Deutschen auf den homozygoten WT- Trägerstatus war 1.2348 fach [0.4475- 3.1149] derjenigen der Türken, somit wiesen mehr Deutsche den homozygoten Trägerstatus auf. Eine deutsche Ethnizität scheint also erneut einen protektiven Einfluß auf die Mutationshäufigkeit zu haben.

Die Patienten- und Kontrollgruppen unterscheiden sich nicht in der Ausprägung des homozygoten WT- Trägerstatus GG (p- Wert= 0.2222). Bei Patienten errechnet sich eine 1.7275fache Chance [0.7086- 4.1791] auf den homozygoten WT- Trägerstatus, Patienten zeigen vermehrt den homozygoten WT- Trägerstatus. Somit schient das WT-Allel keinen protektiven Einfluss bezüglich des M. Behcet auszuüben.

Insgesamt scheint eine deutsche Ethnizität einen protektiven Einfluss auf die Mutationshäufigkeit zu haben, da sich mehr deutsche WT- Allele und homozygote WT- Mutationsträger finden als türkische, gleichzeitig fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Allelfrequenz und des Trägerstatus der Nationen deutsch- türkisch.

Ebenso fand sich keine Assoziation zu M. Behcet, auch scheint das WT- Allel und der homozygote WT- Trägerstaus keinen protektiven Einfluss bezüglich

des M. Behcet auszuüben, da sich mehr WT- Allele bei Patienten mit M. Behcet fanden.

3.3 Ergebnisse der qualitativen LightCycler PCR des +48892 IL6R Polymorphismus

Für die Untersuchung des +48892 IL6R wurden die in 2.2.1.5 gezeigten Primer und Sonden genutzt. Verwendet wurden 94 Patientenproben deutscher Herkunft und 30 türkischer Herkunft. Ebenso wurden 51 Kontrollen aus Deutschland und 20 aus der Türkei untersucht, wobei eine deutsche Kontrollprobe (Nummer 42) nicht detektiert werden konnte. Untersucht wurde der auf Chromosom 1q21 gelegene Polymorphismus +48892 IL6R, welcher als homozygoten Wildtyp AA präsentiert, als heterozygoten Genotyp AC und als homozygot mutierten Genotyp CC.

Wie Abbildung 14 zeigt, konnten in dieser Arbeit homozygote Mutationen, Heterozygote und homozygote Wildtyp– Proben nachgewiesen werden.

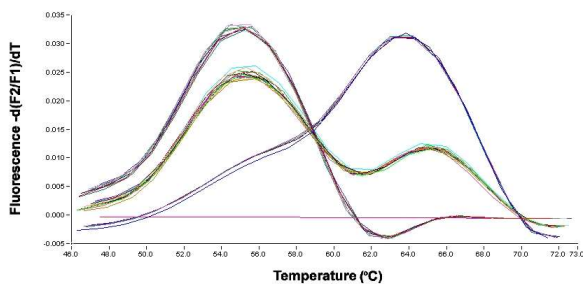


Abbildung 14: -dF/dT – Ableitung von +48892 IL6R

Über die „Area“- Darstellung konnten die Schmelzpeaks für die homozygoten Mutationen bei 54,8°C und für die homozygoten Wildtyp– Proben bei 64,5°C festgestellt werden. Die Peaks der heterozygoten Proben lagen jeweils deckungsgleich (Abbildung 15).

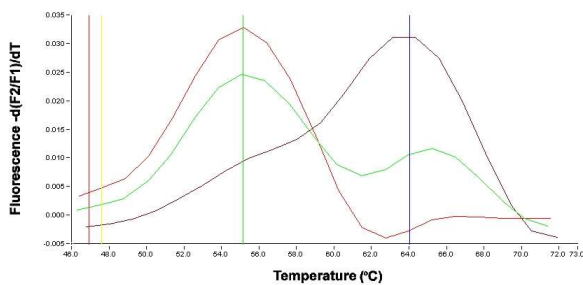


Abbildung 15: „Area“- Darstellung von +48892 IL6R

Eine homozygote Mutation CC konnte bei 36 deutschen Patientenproben festgestellt werden. Heterozygot mit dem Genotyp AC waren 47 deutsche Patientenproben; 11 schließlich wiesen den homozygoten Wildtyp AA auf.

Bei den deutschen Kontrollen waren 14 homozygot mutiert, 28 heterozygot und 8 homozygot Wildtyp.

Bei den Patientenproben aus der Türkei zeigten 14 eine homozygote Mutation, ebenso waren 14 heterozygot, auch konnten 2 homozygot Wildtyp- Proben nachgewiesen werden. Die Kontrollgruppe ergab 5 homozygot mutierte Proben, 14 Heterozygote und eine homozygote Wildtyp- Probe.

Die Gegenüberstellung der Patientenproben zu den Kontrollproben aus Deutschland ergab einen prozentualen Unterschied von 10% hinsichtlich der Anzahl der homozygot mutierten Proben, eine Differenz von 6% bezüglich der heterozygoten Proben und schließlich einen Abstand von 4% bei den homozygoten Wildtyp- Proben. Ähnlich stellen sich die Ergebnisse der türkischen Proben dar, so dass sich im Gesamten ein Unterschied von 12% bei den homozygot Mutierten, 10% bei den Heterozygoten und 2% bei den homozygoten Wildtyp-Proben erkennen lässt (siehe Tabelle 23).

Wie Tabelle 15 und Abbildung 15 veranschaulichen, ergaben sich insgesamt 50 deutsche Proben mit dem homozygot mutiertem Genotyp CC, dies entspricht einem Anteil von 35%. 74 Proben, oder 52%, trugen den heterozygoten Genotyp AC, und 19 deutsche Proben zeigten den homozygoten Wildtyp AA. Dies macht einen Anteil von 13% aus. Bei den Türken waren im Gesamten 19 Proben homozygot mutiert (37%) und 29 wiesen den heterozygoten Genotyp auf, was 57% entspricht. Nur 3 der detektierten türkischen Proben zeigten den homozygoten Wildtyp. Dies macht 6% aus.

Genotyp	CC	AC	AA	
+48892 IL6R				
Deutsch	50	74	19	143
%	35	52	13	
Türkisch	19	29	3	51
%	37	57	6	
	69	103	22	194

Tabelle 15: Anzahl der Genotypen und prozentualer Anteil hinsichtlich der Nationalitäten (Patienten- und Kontrollproben zusammengefasst)

+48892 IL6R:

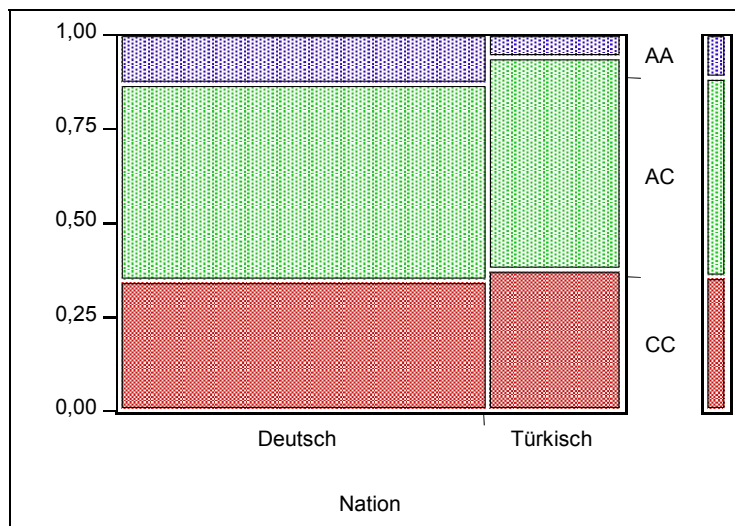


Abbildung 15: Verteilungsdiagramm der Genotypen hinsichtlich der Nationalität (Patienten- und Kontrollproben zusammengefasst)

Des weiteren ergaben sich bei der Patientengruppe 50 Proben, die den homozygot mutierten Genotyp CC aufwiesen, was einen prozentualen Anteil von 40% ausmacht. 61 Proben zeigten den heterozygoten Genotyp AC und 13 Proben den homozygoten Wildtyp AA. Dies entspricht 49- bzw. 11% von insgesamt 124 untersuchten Proben. Tabelle 16 und Abbildung 16 führen diese Ergebnisse nochmals im Überblick an.

Genotyp	CC	AC	AA	
+48892 IL6R				
M. Behcet	50	61	13	124
%	40	49	11	
Kontroll- gruppe	19	42	9	70
%	27	60	13	
	69	103	22	194

Tabelle 16: Anzahl der Genotypen und prozentualer Anteil hinsichtlich der Diagnose (Nationalität deutsch- türkisch zusammengefasst)

+48892 IL6R:

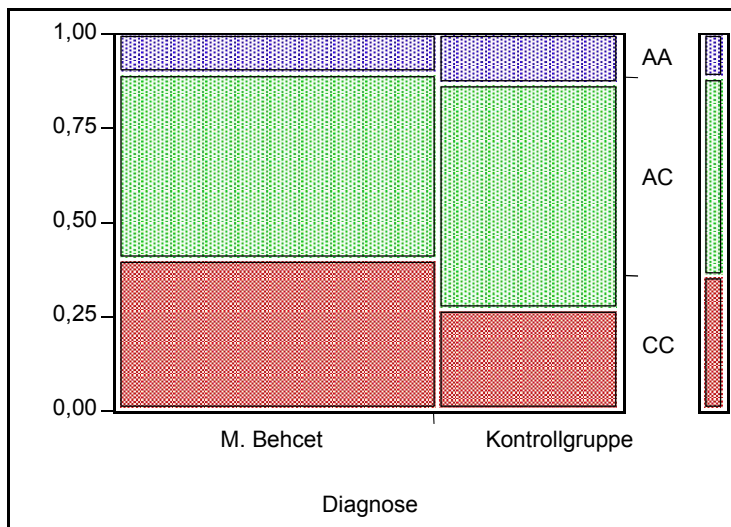


Abbildung 16: Verteilungsdiagramm der Genotypen hinsichtlich der Diagnose (Nationalität deutsch- türkisch zusammengefasst)

Trägerstatus und Allelfrequenz wurden hinsichtlich der Nationalitäten deutsch-türkisch und hinsichtlich der Diagnose M. Behcet auf statistisch signifikante Zusammenhänge untersucht. Es ergeben sich folgende Resultate:

WT- Allelfrequenz +48892 IL6R	p- Wert	Odds ratio	Odds lower	Odds upper
Nation [Deutsch]	0.3164	1.2743	0.7971	2.0628
Diagnose [M.Behcet]	0.0871	0.6913	0.4527	1.0557

Tabelle 17: WT- Allelfrequenz +48892 IL6R hinsichtlich Nation und Diagnose

Wie aus Tabelle 17 ersichtlich, errechnet sich ein p- Wert von 0.3164 hinsichtlich der WT-Allelfrequenz A der untersuchten Nationalitäten deutsch-türkisch. Dieses Ergebnis ist nicht signifikant, so dass keine Differenzierung in der Allelhäufigkeit in den verschiedenen Nationalitäten festzustellen ist.

Gleichzeitig ist die Chance auf das WT- Allel A bei Deutschen 1.2743fach [0.7971- 2.0628] derjenigen bei Türken, so dass sich mehr WT-Allele bei Deutschen finden und sich somit eine deutsche Ethnizität als protektiver Faktor in Bezug auf die Mutationshäufigkeit zu ergeben scheint.

Hinsichtlich der WT-Allelhäufigkeit in der Patienten- und Kontrollgruppe lässt sich kein signifikanter Unterschied mit einem p- Wert von 0.0871 feststellen.

Die Chance auf das WT-Allel A bei Patienten ist 0.6913 [0.4527- 1.0557] derjenigen bei Gesunden. So finden sich weniger WT-Allele bei Patienten als bei Gesunden und somit scheint das WT-Allel einen protektiven Einfluss bezüglich des M. Behcet auszuüben.

Homozygoter WT-Trägerstatus +48892 IL6R	p- Wert	Odds ratio	Odds lower	Odds upper
Nation [Deutsch]	0.1586	2.4826	0.7983	10.9167
Diagnose [M.Behcet]	0.5753	0.7706	0.3120	1.9746

Tabelle 18: Homozygoter WT- Trägerstatus +48892 IL6R hinsichtlich Nation und Diagnose

Mit einem p-Wert von 0.1586 ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in den Nationalitäten deutsch- türkisch bezüglich des homozygoten WT-Trägerstatus AA.

Deutsche weisen eine 2.4826fache Chance [0.7983- 10.9167] für den homozygoten WT-Trägerstatus derjenigen bei Türken auf, folglich ergeben sich mehr deutsche homozygote WT-Träger, somit scheint eine deutsche Ethnizität einen protektiven Einfluss auf die Mutationshäufigkeit zu haben.

Kein Unterschied mit einem p- Wert von 0.5753 findet sich in der Patienten- und Kontrollgruppe hinsichtlich des homozygoten WT-Trägerstatus. Die Patienten mit M. Behcet haben die 0.7707fache Chance [0.3120- 1.9746] auf den homozygoten WT-Trägerstatus derjenigen bei Gesunden. Weniger WT-Träger finden sich bei Patienten mit M. Behcet als bei Gesunden, so dass das WT-Allel einen protektiven Einfluss bezüglich des M. Behcet auszuüben scheint.

Insgesamt scheint eine deutsche Ethnizität einen protektiven Einfluss auf die Mutationshäufigkeit zu nehmen, gleichzeitig fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Allelfrequenz und des Trägerstatus der Nationen deutsch- türkisch.

Ebenso scheint das WT- Allel und der homozygote Trägerstatus ein protektiver Faktor bezüglich des M. Behcet zu sein, da weniger WT- Allele bei Patienten als bei Gesunden gefunden wurden. Gleichzeitig besteht keine statistisch signifikante Assoziation zu M. Behcet.

3.4 Ergebnisse der qualitativen LightCycler PCR des +24013 IL6R Polymorphismus

Gearbeitet wurde mit den in Punkt 2.2.5.1 dargestellten Primern und Sonden. Verwendet wurden 94 Patientenproben aus Deutschland und 30 aus der Türkei, sowie 50 deutsche und 20 türkische Kontrollproben. Untersucht wurde der ebenfalls auf Chromosom 1q21 lokalisierte Polymorphismus +24013 IL6R. Als homozygoten Wildtyp präsentiert dieser sich mit GG, als heterozygoter Genotyp mit AG und als homozygot mutierter Genotyp mit AA.

Aus Abbildung 17 wird ersichtlich, dass bei der Untersuchung dieses SNP homozygote Mutationen, sowie homozygote Wildtypen nachgewiesen werden konnten, jedoch keine heterozygote Ausprägung gefunden wurde.

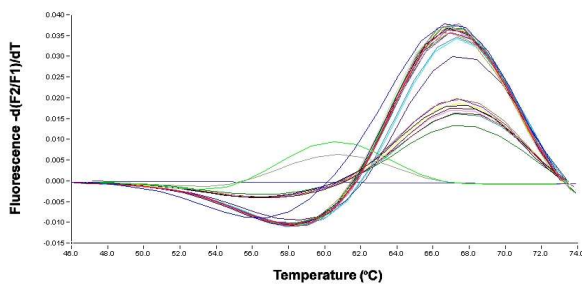


Abbildung 17: -dF/dT- Ableitung von +24013 IL6R

Die Schmelzpeaks wurden über die „Area“- Einstellung über 60,8 °C für die homozygot mutierten Proben und über 67°C für den homozygoten Wildtyp ermittelt (Abbildung 18).

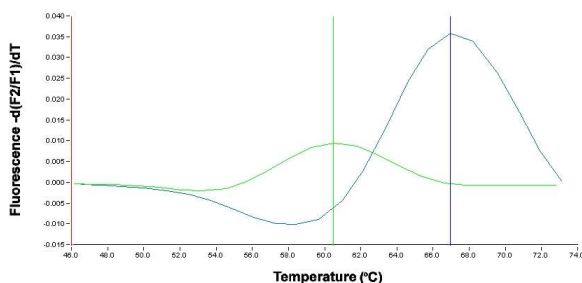


Abbildung 18: „Area“- Darstellung von +24013 IL6R

Aus Abbildung 18 geht ebenso hervor, dass keine heterozygoten Proben mit dem Genotyp AG detektiert werden konnten. In sehr geringer Anzahl konnten homozygot mutierte Proben mit dem Genotyp AA nachgewiesen werden: 2 Patienten- und 2 Kontrollproben aus Deutschland stehen 92 deutschen Patienten- und 48 Kontrollproben mit dem homozygoten Wildtyp GG gegenüber. Bei den türkischen Patientenproben wurde eine homozygot mutierte und 29 homozygote Wildtyp- Proben festgestellt. In der türkischen Kontrollgruppe fanden sich ausschließlich 20 homozygote Wildtyp GG -Proben. In der Gegenüberstellung der deutschen Patienten- zu Kontrollproben ergab sich eine Differenz von 2% bezüglich der homozygot mutierten Proben sowie von 2% hinsichtlich der homozygoten Wildtyp- Proben. Ein Unterschied von 3% fand sich im selben Vergleich der türkischen Proben (siehe Tabelle 23).

Insgesamt wiesen 4 deutsche Proben den homozygot mutierten Genotyp AA auf, was bei 143 Gesamtproben 3% entspricht. 139 davon zeigten den homozygoten Wildtyp GG, was 97% ausmacht. Bei den türkischen Proben präsentierte nur eine den homozygot mutierten Genotyp (2%) und 50 von insgesamt 51 Proben den homozygoten Wildtyp, was einem Anteil von 98% entspricht (siehe Tabelle 19 und Abbildung 19).

Genotyp	AA	GG	
+24013 IL6R			
Deutsch	4	139	143
%	3	97	
Türkisch	1	50	51
%	2	98	
	5	189	194

Tabelle 19: Anzahl der Genotypen und prozentualer Anteil hinsichtlich der Nationalitäten(Patienten- und Kontrollproben zusammengefasst)

+24013 IL6R:

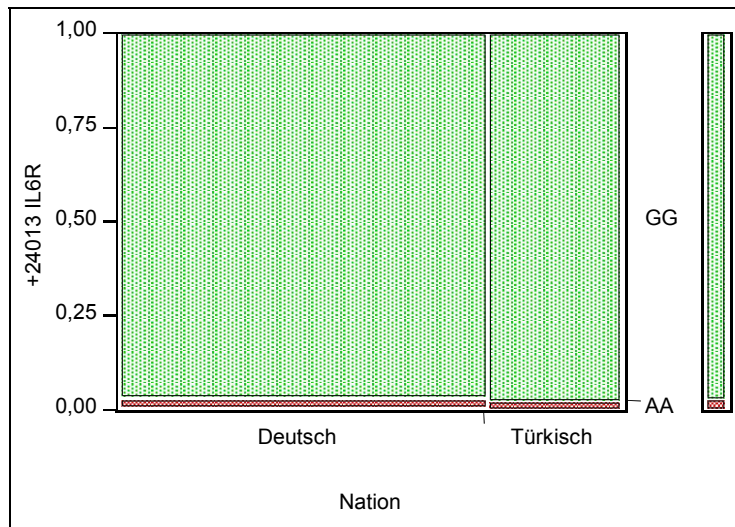


Abbildung 19: Verteilungsdiagramm der Genotypen hinsichtlich der Nationalität (Patienten- und Kontrollproben zusammengefasst)

Wie Tabelle 20 und Abbildung 20 veranschaulichen, wiesen darüber hinaus 3 Proben oder 2% des untersuchten Patientenkollektivs den homozygot mutierten Genotyp AA auf, während 121 der insgesamt 124 Proben den homozygoten Wildtyp GG zeigten. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 98%.

Ähnlich das Ergebnis der Kontrollgruppe: 2 Proben waren homozygot mutiert und 68 Proben präsentierten den homozygoten Wildtyp. Bei insgesamt 70 Proben entspricht dies einem Anteil von 3- bzw. 97%.

Genotyp	AA	GG	
+24013 IL6R			
M. Behcet	3	121	124
%	2	98	
Kontroll- gruppe	2	68	70
%	3	97	
	5	189	194

Tabelle 20: Anzahl der Genotypen und prozentualer Anteil hinsichtlich der Diagnose (Nationalität deutsch- türkisch zusammengefasst)

+24013 IL6R:

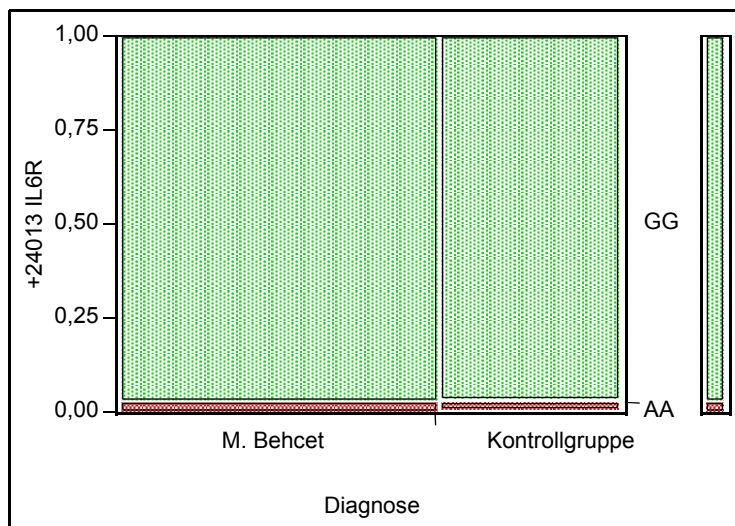


Abbildung 20: Verteilungsdiagramm der Genotypen hinsichtlich der Diagnose (Nationalität deutsch- türkisch zusammengefasst)

Trägerstatus und Allelfrequenz wurden hinsichtlich der Nationalitäten deutsch-türkisch und hinsichtlich der Diagnose M. Behcet auf statistisch signifikante Zusammenhänge untersucht. Es ergeben sich folgende Resultate:

WT- Allelfrequenz +24013 IL6R	p- Wert	Odds ratio	Odds lower	Odds upper
Nation [Deutsch]	0.6497	0.6954	0.1037	2.8354
Diagnose [M.Behcet]	0.7989	1.1815	0.2975	4.2117

Tabelle 21: WT- Allelfrequenz +24013 IL6R hinsichtlich Nation und Diagnose

Bei einem p-Wert von 0.6497 bezüglich der WT-Allelfrequenz G der untersuchten Nationalitäten deutsch- türkisch ergibt sich keine Differenz in der WT-Allelhäufigkeit G.

Gleichzeitig ist die Chance auf das WT- Allel bei Deutschen 0.6954 [0.1037- 2.8354] derjenigen bei Türken. Es ergeben sich somit weniger WT-Allele bei Deutschen, so dass eine deutsche Ethnizität keinen protektiven Einfluss auf die Mutationshäufigkeit zu nehmen scheint.

Keine Signifikanz (p-Wert= 0.7989) ergibt sich für eine Unterscheidung der Allelfrequenz hinsichtlich der Diagnose M. Behcet. Die Patienten- und Kontrollgruppen differieren bezüglich der WT-Allelhäufigkeit G nicht.

Die Chance auf das WT- Allel G bei Patienten mit M. Behcet ist 1.1815 [0.2975- 4.2117] derjenigen bei Gesunden. Das WT-Allel ist in der Patientengruppe häufiger anzutreffen und scheint somit keinen protektiven Einfluss bezüglich des M. Behcet zu nehmen.

Homozygoter WT-Trägerstatus +24013 IL6R	p- Wert	Odds ratio	Odds lower	Odds upper
Nation [Deutsch]	0.7423	0.6894	0.0347	4.8070
Diagnose [M.Behcet]	0.8433	1.2009	0.1551	7.4277

Tabelle 22: Homozygoter WT- Trägerstatus +24013 IL6R hinsichtlich Nation und Diagnose

Wie Tabelle 22 zeigt, ergeben sich mit einem p- Wert von 0.7423 keine Unterschiede in der Ausprägung des homozygoten WT-Trägerstatus GG in den Nationalitäten deutsch- türkisch.

Die Deutschen haben eine 0.6894fache Chance [0.0347- 4.8070] auf den homozygoten WT-Trägerstatus derjenigen der Türken. Weniger Deutsche weisen also den homozygoten WT- Trägerstatus auf und so scheint eine deutsche Ethnizität keinen protektiven Einfluß auf die Mutationshäufigkeit zu haben.

Darüber hinaus differieren die Patienten- und Kontrollgruppen nicht in der Ausprägung des homozygoten WT- Trägerstatus GG (p-Wert= 0.8433).

Die Chance auf den homozygoten WT- Trägerstatus bei Patienten mit M. Behcet ist 1.2009 [0.1551- 7.4277] derjenigen bei der gesunden Kontrollgruppe. Somit finden sich bei Patienten mehr homozygote WT-Träger als bei Gesunden, so dass die Ausprägung der homozygoten WT keinen protektiven Einfluss bezüglich des M. Behcet auszuüben scheint.

Eine deutsche Ethnizität scheint also insgesamt keinen protektiven Einfluss auf die Mutationshäufigkeit zu nehmen, gleichzeitig fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Allelfrequenz und des Trägerstatus der Nationen deutsch- türkisch.

Ebenso scheint das WT- Allel und der homozygote Trägerstatus keinen protektiven Einfluss bezüglich des M. Behcet zu nehmen, gleichzeitig besteht keine statistisch signifikante Assoziation mit M. Behcet.

Kombiniert man die zwei Genloci +48892 und +24013 des Interleukin 6 Rezeptorgens miteinander und untersucht die Assoziation des sich ergebenden Mutationsallelträgerstatus mit M. Behcet und den Nationalitäten deutsch-türkisch, so ergeben sich folgende Resultate:

Mutationsallelträgerstatus von +48892 IL6R [C] und +24013 IL6R [A]	p- Wert
Nation [Deutsch]	0.8637
Diagnose [M. Behcet]	0.1195

Tabelle 23: Mutationsallelträgerstatus von +48892 IL6R [C] und +24013 IL6R [A] hinsichtlich Nation und Diagnose

Mit einem p- Wert von 0.8637 ergibt sich keine statistisch signifikante Assoziation des kombinierten Mutationsallelträgerstatus von +48892 IL6R [C] und +24013 IL6R [A] mit den untersuchten Nationalitäten deutsch- türkisch. Ebenso ergibt sich keinerlei signifikante Assoziation (p= 0.1195) des kombinierten Mutationsallelträgerstatus von +48892 IL6R [C] und +24013 IL6R [A] mit M. Behcet.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass keines der untersuchten SNP hinsichtlich Trägerstatus und Allelfrequenz bezüglich der Nationalitäten deutsch- türkisch und der Diagnose M. Behcet statistisch signifikante Zusammenhänge aufwiesen.

Genotyp	Pat. ges.	%	Kontr. ges.	%	Pat. D	%	Kontr. D	%	Pat. T	%	Kontr. T	%
-238 TNFalpha												
AA	0		0		0		0		0		0	
GA	15	13	9	13	14	15	7	15	1	4	2	10
GG	107	87	62	87	78	85	44	85	29	96	18	90
+2607 IL8RA												
CC	0		0		0		0		0		0	
GC	12	10	11	16	9	10	7	15	3	10	4	20
GG	112	90	59	84	85	90	43	85	27	90	16	80
+48892 IL6R												
CC	50	40	19	27	36	38	14	28	14	25	5	28
AC	61	49	42	60	47	50	28	56	14	70	14	56
AA	13	11	9	13	11	12	8	16	2	5	1	16
+24013 IL6R												
AA	3	2	2	3	2	2	2	4	1	3	0	0
GA	0		0		0		0		0		0	
GG	121	98	68	97	92	98	48	96	29	97	20	100

Tabelle 24: Genotyp und prozentuale Aufschlüsselung der untersuchten SNP

4. Diskussion

M. Behcet ist eine chronische, multisystemische Erkrankung, die durch rezidivierende Schübe entzündlicher Genese charakterisiert ist. Verschiedene genetische Faktoren wurden im Hinblick auf die Krankheitsursache untersucht. Der am besten untersuchte Genlocus stellt sicherlich der HLA- Komplex auf Chromosom 6p21 dar, der mit mittlerweile 34 beschriebenen Allelvarianten einen hoch polymorphen Komplex darstellt⁶⁴. Noch ist unklar, ob diese Assoziation die primäre Ursache für die Erkrankung darstellt, oder ob Koppelungen mit anderen benachbarten Risikoallelen vorliegen. Das zentromerisch vom HLA-B Locus gelegene MHC class I chain related gene A (MICA) wurde ebenso untersucht wie TNF- Genloci, die sich ebenfalls zentromerisch vom HLA-B Locus befinden^{36,72,96}. Letztendlich jedoch war sowohl das MICA*A6- Allel als auch das MICA 009- Allel, das für die extrazellulären Domänen von MICA codiert, in einem Koppelungsungleichgewicht zu HLA-B51, so dass HLA-B51 nach wie vor als Hauptfaktor in der Krankheitsassoziation angesehen wird^{36,72}.

Des weiteren finden sich bei M. Behcet Patienten, wie auch bei anderen Erkrankungen entzündlicher und autoimmunvermittelter Genese, wie rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose und M.Crohn, ein Überwiegen proinflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise IL-6, IL-8 und TNF α ^{17,33,58}. Mehrere Hinweise deuten hierbei auf eine Beteiligung von TNF α an der Pathogenese des M. Behcet: zum einen finden sich erhöhte TNF α Serumspiegel bei Patienten mit M. Behcet⁸⁴, ebenso lässt sich eine spontane Freisetzung von TNF α durch Makrophagen beobachten⁶⁵. Darüber hinaus erzielt die Therapie mit Anti-TNF α - Antikörpern große Erfolge bei der Behandlung von M. Behcet- Patienten⁸⁶. Nicht zuletzt lässt die Lokalisation des TNF- Gens, angrenzend an den HLA- B Komplex, eine Beteiligung durch TNF- Polymorphismen vermuten³, da der TNF-Genkomplex innerhalb der Klasse III-Region des hochpolymorphen „Major Histocompatibility Complex“ (MHC) auf Chromosom 6p21 liegt⁶². Bis jetzt wurden 5 polymorphe Mikrosatelliten-Marker, TNF α -e, in der TNF- Region beschrieben⁵⁹. Ebenso sind bezüglich des TNF α - Locus mittlerweile 12 „Single Nucleotide Polymorphism“ (SNP)

bekannt, die sowohl in der Promotor-, als auch in der Exon-, Intron und 3'-Region liegen¹⁰. Die Promotor-Region ist mit ca. 10 beschriebenen Polymorphismen (-1031 (T/C), -863 (C/A), -857 (C/A), -851 (C/T), -419 (G/C), -376 (G/A), -308 (G/A), -238 (G/A), -162 (G/A), -49 (G/A)) hochpolymorph, während sich die 3'-Region mit nur einem SNP (T → C Substitution, 322 Basenpaare stromabwärts des letzten Exons) als relativ stabil erweist³⁷.

Die 5'-Region ist an der TNF-Gentranskription beteiligt und tatsächlich konnten für die beiden bis zum jetzigen Zeitpunkt sicherlich am besten untersuchten Promotor-Polymorphismen an Position -238 (G/A) und -308 (G/A) in einigen Studien eine erhöhte transkriptionale Aktivität und TNF- α -Freisetzung nachgewiesen werden^{30,90}. In anderen Arbeiten jedoch konnte dieses Ergebnis zumindest für -238 TNF- α nicht bestätigt werden, so dass die genaue funktionelle Rolle dieses Polymorphismus noch nicht hinreichend geklärt ist^{10,76}.

-238 TNF- α ist in einer Y-Box-artigen Sequenz lokalisiert, die typischerweise in der regulierenden Region von MHC II Genen gefunden wird und Zielsequenz für einen ubiquitären Transkriptionsfaktor, NF-Y, ist^{21,29,76}.

Dieser Faktor kann selbst zwar die Transkription nicht aktivieren, sorgt aber für die korrekte Positionierung anderer Transkriptionsfaktoren und ist darüber hinaus an der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen beteiligt^{21,29}.

Des Weiteren wurde eine TNF- α -Repressor-Seite zwischen den Nukleotiden -254 und -230, also genau zwischen der Lokalisation des -238-Polymorphismus, identifiziert, so dass dieser eventuell die genetische Transkription beeinflussen könnte⁷⁶. Einerseits könnte ein Austausch von Guanin zu Adenin eine verbesserte Genregulation zur Folge haben, sollte die Position -238 mit der Repressor-Seite interagieren, andererseits könnte das Guanin-Allel an einer verbesserten Interaktion mit einem positiven Regulator der TNF- α -Produktion beteiligt sein. Wichtig für die TNF- α -Produktion scheint jedoch das generelle Zusammenspiel der 5'- und 3'-Region zu sein²¹.

Allerdings stellt sich die 5'-Region als hochpolymorph dar, mit starken Koppelungsungleichgewichten der Polymorphismen, sowohl mit HLA-Genen, als auch untereinander³⁷. Generell erweist es sich daher als schwierig, die alleinige Funktion eines SNPs zu untersuchen.

Nichtsdestotrotz setzten sich zahlreiche Studien mit einer möglichen Assoziation von einzelnen SNPs in der TNFalpha- Region mit verschiedenen Krankheitsbildern, v.a. entzündlicher und autoimmunvermittelter Genese, auseinander, in der Annahme, dass Polymorphismen im Rezeptorgen im pathophysiologischem Sinne regulatorischen Einfluß auf Expression und Aktivität dieser Zytokine nehmen könnten. Im folgenden soll eine Fokussierung auf Krankheitsbilder, die in der Ausprägung ihrer Symptome Ähnlichkeiten mit denen des M. Behcet aufweisen, vorgenommen werden.

Die Ergebnisse dieser Studien sind zum Teil jedoch widersprüchlich. So konnte in einer Arbeit, die sich u.a. mit einer Assoziation des SNP -308 TNFalpha und entzündlicher Darmerkrankung beschäftigt hat, eine erhöhte TNFalpha Produktion bei -308(G/A)-Träger nachgewiesen werden¹⁴. Andere Studien konnten dies allerdings nicht bestätigen^{94,98}.

Ein Zusammenhang eines -238 TNFalpha Polymorphismus mit entzündlichen Darmerkrankungen konnte bis jetzt nicht hergestellt werden^{16,98}.

Bezüglich Untersuchungen hinsichtlich einer Assoziation mit Multipler Sklerose sind die gewonnenen Resultate nicht einheitlich. Huizinga et al. konnten eine Assoziation bezüglich des -238(G/A) TNFalpha und des Schweregrads einer MS-Ausprägung herstellen⁴¹, jedoch blieben andere Analysen verschiedener TNFalpha- Polymorphismen hinsichtlich einer Assoziation mit Multipler Sklerose ergebnislos^{66,81}.

Zahlreiche Studien beschäftigten sich mit dem Nachweis eines Zusammenhangs des -238 TNFalpha Polymorphismus mit rheumatoider Arthritis und deren Schweregradausbildung. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stellen sich jedoch auch hier nicht einheitlich dar. Einige Studien konnten eine Assoziation herstellen^{29,91}, andere wiederum nicht¹⁰. Auch bezüglich des Schweregrades der Erkrankung sind die Resultate unterschiedlich. So konnte Barton et al. keinen Zusammenhang von -238 TNFalpha mit der Ausprägung von rheumatoider Arthritis nachweisen¹⁰, Fabris et al.²⁹ wiederum konnten eine Assoziation erkennen.

Bei extraintestinaler Manifestation des M.Crohn, v.a. bei einer Gelenkbeteiligung, aber auch bei einer Augen- und Hautbeteiligung im Sinne einer Uveitis und eines Erythema nodosum, konnte eine Assoziation mit

-1031TNFalpha gezeigt werden⁷¹. Interessanterweise konnte dieselbe Verbindung bei M. Behcet Patienten, die in ihrer Krankheitsausprägung ganz ähnliche Symptome aufweisen, hergestellt werden³. Weitere Untersuchungen bezüglich einer Assoziation von TNFalpha Polymorphismen mit M. Behcet konzentrierten sich allerdings meist auf das -308 TNFalpha SNP. Hier konnte allerdings keine Assoziation mit M. Behcet bewiesen werden, auch weitergefasste Analysen der verschiedenen anderen Polymorphismen des TNFalpha-Gens (-863 (C/A), -876 (G/A), -1031 (A/C), -857 (C/T), -380 (G/A), -308 (G/A)) blieben ohne signifikantes Ergebnis^{3,25,59,96}. Eine Ausnahme bildet der Polymorphismus -238 TNFalpha, der in einer Studie von Ahmed et al. mit M. Behcet assoziiert werden konnte ($p= 0.046$), allerdings bleibt in dieser Arbeit ungeklärt, ob dieser Polymorphismus unabhängig auftritt oder auf ein Koppelungsungleichgewicht mit HLAB51 zurückzuführen ist³.

Die Frage, ob die Überexpression des Zytokins TNFalpha, die bei M. Behcet Patienten nachgewiesen werden kann^{65,84}, durch Polymorphismen im TNFalpha- Gen verursacht wird, oder durch eine post- transkriptionale Dysregulation, bleibt letztlich bis zum jetzigen Zeitpunkt der Studienlage offen. In dieser Arbeit wurde daher erneut der Versuch unternommen, eine Assoziation zwischen M. Behcet und einem TNFalpha Polymorphismus, in diesem Fall -238 TNFalpha, herzustellen.

Die Position -238 ist aus oben genannten Gründen sicher nicht die einfachste Variante der TNFalpha Polymorphismen, und vielleicht wäre es für zukünftige Arbeiten von Vorteil, vor allem für Arbeiten mit limitierter Fallzahl, einen Polymorphismus aus einer nicht ganz so hochpolymorphen Region zu nehmen. Allerdings wäre es dann nicht möglich gewesen, ein signifikantes Ergebnis einer anderen Studie zu überprüfen, ebenso wenig wie einen erneuten Richtungshinweis zu geben, ob dieser Polymorphismus mit einer erhöhten TNFalpha Produktion assoziiert werden kann oder nicht.

So wurde in dieser Arbeit ein in Deutschland lebendes M. Behcet Patientenkollektiv mit einer in Deutschland lebenden gesunden Kontrollgruppe bezüglich des Auftretens eines Polymorphismus im genannten Bereich verglichen, ebenso wurde eine in der Türkei lebende Patientengruppe mit einer ebensolchen gesunden Kontrollgruppe verglichen. Es ergaben sich jedoch in

den beschriebenen Gruppen keine signifikanten Verdachtsmomente, die eine Assoziation des -238 TNFalpha- Polymorphismus mit der genetischen Suszeptibilität hinsichtlich des M. Behcet ($p= 0.8649$) rechtfertigen würden. Ebenso fand sich kein Unterschied in der Allelhäufigkeit in den beiden Nationen deutsch- türkisch. Die Allel- und Heterozygotenfrequenzen der untersuchten Gruppen stellen sich ebenfalls relativ einheitlich dar, da keine homozygote Mutation detektiert werden konnte. Die Chance auf das WT-Allel G und den homozygoten WT- Trägerstatus GG beträgt bei Deutschen 0.384 bzw. 0.3697 derjenigen der Türken. Somit finden sich weniger WT-Allele und homozygote Träger des WT bei Deutschen als bei Türken. Eine deutsche Ethnizität scheint daher keinen protektiven Einfluß auf die Mutationshäufigkeit zu haben. Mehr WT-Allele und homozygote Träger des WT finden sich also bei türkischer Ethnizität, allerdings findet sich kein Unterschied in der Chancenverteilung bezüglich der Diagnose M. Behcet (Odds ratio= 1.0771), gleichzeitig besteht keine Assoziation zu M. Behcet ($p= 0.8649$ bzw. 0.8872).

Die sich ergebenden Allelfrequenzen der Patienten- und Kontrollgruppe stimmen weitgehend mit denen in der Literatur beschriebenen, allgemein ermittelten Allelfrequenzen überein, ($G= 0.916$; $A= 0.084$), so dass sich auch hier keine relevanten Unterscheidungen ergeben und somit sowohl davon ausgegangen werden kann, dass die gesunden Kontrollgruppen einem tatsächlich gesunden Kollektiv entsprachen, als auch davon, dass sich die Patienten- und Kontrollgruppen nicht wesentlich hinsichtlich der Allelfrequenzen unterscheiden. Somit konnten diese Gruppen, um eine höhere Fallzahl zu erreichen, in der statistischen Auswertung schlussendlich zusammengefasst werden.

Insgesamt zeigt die Verteilung der WT- Allelfrequenzen in Patienten- und Kontrollgruppe keine unterschiedlichen Ergebnisse ($p= 0.8649$).

Darüber hinaus differieren die Patienten- und Kontrollgruppen nicht in der Ausprägung des homozygoten WT- Trägerstatus GG ($p= 0.8872$), ebenso lässt sich kein Unterschied in der Chancenverteilung finden (Odds ratio= 1.0665).

Generell limitiert natürlich die niedrige Fallzahl mit 93 deutschen und 28 türkischen Patientenproben sowie 51 deutschen und 20 türkischen Kontrollproben die statistische Aussagekraft dieser Arbeit. Allerdings erweist

sich eine größere Gruppenbildung mit M. Behcet Patienten als schwierig, da die Krankheit selten ist und nur an bestimmten Klinikzentren überhaupt eine M Behcet- Sprechstunde existiert und gleichzeitig auch Forschung hinsichtlich dieser Erkrankung betrieben wird. Andere Studien, die sich mit einer möglichen Assoziation bestimmter Polymorphismen mit M. Behcet beschäftigt haben, weisen aufgrund dieses Problems ebenfalls eine begrenzte Anzahl der Patientenproben auf, im Durchschnitt wurden hier ca. 70 Proben untersucht^{1,17,20,90}. Die 93 deutschen Patientenproben entsprechen somit durchaus den in der Literatur beschriebenen Anforderungen, die Fallzahl von 20 türkischen Patientenproben und 20 türkischen Kontrollen erweist sich jedoch als relativ gering. Die deutsche Kontrollgruppe stellt mit einer Anzahl von 51 Proben sicherlich ein relativ kleines Kollektiv dar, ist aber generell zu statistisch signifikanten Vergleichsaussagen ausreichend.

Detektiert wurden die jeweiligen Proben mit der LightCycler- Methode, einer Real- time PCR, die gegenüber der herkömmlichen PCR verschiedene Vorteile hat. Zum einen dauert die Genotypisierung von 32 Proben nur ca. 50 Minuten, da die Amplifizierungszeit auf ein Minimum durch Rapid- Cycling verkürzt und gleichzeitig die Spezifität im Vergleich zur herkömmlichen PCR erhöht wird. Zum anderen wird die Schmelzkurven- Analyse jeweils in nur einer einzelnen Kapillare in einem in sich geschlossenen System durchgeführt und damit jede weitere Post- PCR- Kontamination vermieden, da im LightCycler- System keine weiteren Bearbeitungsschritte nach der Amplifikation notwendig sind. Alles in allem ist die LightCycler- Methode schnell und zuverlässig und der herkömmlichen PCR vorzuziehen⁴⁶.

Auch wenn die statistische Aussagekraft dieser Arbeit aufgrund der niedrigen Fallzahl somit als gering angesehen werden muss, konnten dennoch die Resultate einer 2003 erschienenen Studie von Ahmad et al. nicht bestätigt werden, die eine Assoziation des Allels -238TNFalpha mit M. Behcet herstellen konnte³. 133 M. Behcet Patienten, die kaukasischer Herkunft waren und in Großbritannien lebten, wurden hierzu untersucht. Allerdings bleibt in dieser Arbeit ungeklärt, ob diese Assoziation unabhängig auftritt oder im Zusammenhang mit einem Koppelungsungleichgewicht mit HLAB51, so dass HLA-B51 letztlich als Hauptfaktor angesehen werden muss, zumal die

Patientengruppe stark mit HLA-B51 assoziiert war (33,1% der M. Behcet Patienten versus 9,9% der Kontrollgruppe)³.

Aufgrund des weitgehenden und beträchtlichen Koppelungsungleichgewicht in dieser hoch polymorphen Region bereitet es jedoch generell einige Schwierigkeiten, unabhängige Variablen zu finden und zu bestätigen, gerade der Polymorphismus an Position -238 befindet sich in einem starken Koppelungsungleichgewicht, sowohl mit HLA- Genen, als auch mit den anderen beschriebenen Polymorphismen. Tatsächlich werden bis jetzt 12 Polymorphismen auf TNFalpha beschrieben, bezüglich M. Behcet wurden ca. 7 davon auf eine Assoziation hin untersucht^{3,59,90}, so dass weiterhin die Möglichkeit besteht, signifikante, von HLAB51 unabhängige Ergebnisse auf anderen Gen-Loci zu finden, wie es in der Studie von Ahmad et al. mit -1031TNFalpha erstmals gelungen ist³.

In dieser Arbeit jedoch konnte keinerlei Assoziation von -283TNFalpha und einer genetischen Suszeptibilität hinsichtlich M. Behcet hergestellt werden.

Ein größeres Untersuchungskollektiv wäre für zukünftige Arbeiten allerdings sicher von Vorteil, gerade weil TNF alpha Polymorphismen sich weitgehend in einer Region mit hoher polymorphischer Variation befinden und somit die Untersuchung einer isolierten Funktion eines bestimmten Polymorphismus eine so große Fallzahl wie möglich benötigt, um Koppelungsungleichgewichten entgegenwirken zu können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen jedoch nahe, dass entweder andere Polymorphismen im TNFalpha-Gen oder doch post-transkriptionale Faktoren für die Dysregulation des Zytokins TNFalpha bei M. Behcet Patienten verantwortlich sind.

Das Chromosom 6p21 ist bezüglich der genetischen Ursache von M. Behcet das sicherlich am besten untersuchte. Nichtsdestoweniger könnten andere genetische Polymorphismen in ihrer Ursächlichkeit eine ebenso bedeutende Rolle spielen und sollten deshalb mit berücksichtigt werden. Ausgehend von der Tatsache, dass bei M. Behcet Patienten erhöhte Serumspiegel von Interleukin 8 gemessen wurden, und diese mit der Krankheitsaktivität korreliert werden konnten^{6,92}, liegt die Schlussfolgerung nahe, eine möglichen Ursache hierfür in einer genetischen Determinante zu vermuten. Interleukin 8 gehört zur

Familie der Chemokine und wirkt als chemotaktischer Faktor für Neutrophile und Lymphozyten⁴⁷. Das auf Chromosom 4q13-q21 codierte Interleukin 8 interagiert mit zwei Rezeptoren, IL8RA und IL8RB, welche beide auf Chromosom 2q34-35 codiert sind⁷⁷. IL8RA bindet hierbei ausschließlich Interleukin 8, während IL8RB auch andere Chemokine binden kann⁷⁸. Des Weiteren regeneriert sich IL8RA wesentlich schneller als IL8RB, weshalb IL8RA eine aktivere Rolle in der Signalübermittlung zugesprochen wird¹⁹. Im Interleukin 8- Gen, bestehend aus vier Exons, drei Introns und einer proximalen Promoter- Region, werden bis zu neun SNP beschrieben, wovon drei in der Promoterregion sicherlich die am besten untersuchten darstellen (-251 (T/A), +396 (T/G), +781 (C/T))^{43,83}, während bezüglich der Rezeptoren insgesamt vier SNP bekannt sind. Das aus drei Exons bestehende IL8RA- Gen enthält ein nonsynonymes SNP auf Exon 2 an Position +2607 (G/C) und hat letztlich eine Aminosäuresubstitution in der Proteinsequenz (Serin zu Threonin) zur Folge, ist also ein funktionell wirksamer Polymorphismus⁷⁷. Nicht funktionell wirksam sind die restlichen drei Polymorphismen, auf dem IL8RB- Genlokus, welcher aus 11 Exons besteht⁵⁷. Beschrieben sind ein synonymes SNP auf Exon 3, sowie zwei weitere in der 3'-Region auf Exon 3 in den Positionen +1208 und +1440⁸³.

Die Dysregulation von Interleukin 8 bei entzündlichen Erkrankungen, wie M. Crohn, Colitis ulcerosa, rheumatoider Arthritis und M. Behcet, hin zu einer erhöhten Produktion und damit zu messbaren Serumspiegelveränderungen ist seit einiger Zeit bekannt^{6,9,22,27,33,35,92,99}, ebenso wie die veränderte Expression der beiden Rezeptoren auf unterschiedlichen Zelltypen, hier vor allem von IL8RA auf Neutrophilen^{63,70,77,93}.

In vitro konnte eine Erhöhung des Interleukin 8- Serumspiegels aufgrund eines SNP (-251 (T/A)) im Interleukin 8-Gen nachgewiesen werden, ebenso konnte dieser Polymorphismus mit einer Virus-Bronchiolitis assoziiert werden^{44,57}. Andere Studien wiederum konnten jedoch keine Assoziation zwischen analysiertem Polymorphismus, teils im Interleukin 8- Gen, teils in den beiden Rezeptorgenen gelegen, mit der jeweilig untersuchten, entzündlich bedingten Erkrankung feststellen^{7,57,83}.

Relativ wenige Studien, die sich mit Polymorphismen im Rezeptorgen von IL-8, IL8RA und IL8RB, und entsprechender Assoziation zu verschiedenen

Erkrankungen beschäftigt haben, sind bisher publiziert worden. So findet sich eine Arbeit, die sich mit diesen Polymorphismen (+2607 (G/C)IL8RA, +785 (C/T) IL8RB, +1208 (C/T) IL8RB, +1440 (G/A) IL8RB) und einem möglichen Zusammenhang mit entzündlich bedingten ösophagealen Plattenepithelcarcinomen und Magen- Adenocarcinomen auseinandergesetzt hat, allerdings konnten hier keine signifikanten Assoziationen gefunden werden⁸³.

Ebenfalls keine Signifikanz fand sich hinsichtlich des IL-8 (-251 A/T) und IL8RB (+1208 C/T) Gen Polymorphismus und Multipler Sklerose⁴⁸.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie, die sich mit einem möglichen Zusammenhang von IL-8 und IL8RA Polymorphismen mit bronchialem Asthma beschäftigt hat, konnte eine Assoziation mit Promotor- Polymorphismen im IL-8- Gen herstellen, mit IL8RA jedoch nicht⁷⁴.

Bezüglich des M. Behcet ist bisher eine Studie publiziert, die sich mit Polymorphismen des Interleukin 8- Gens und des IL8RB- Gens beschäftigt hat. Dymaz- Tozkir et al. konnten hier jedoch keine neuen Suszeptibilitätsgene identifizieren. Untersucht wurden drei SNP im IL-8 Gen (-353 (A/G), +1530 (T/C), +3331 (A/G)) und zwei im IL8RB- Gen (+785 (C/T), +1208 (T/C)), das IL8RA- Gen wurde nicht untersucht²⁶.

Eine Analyse des funktionell wirksamen +2607 IL8RA (G/C → Serin/Threonin) auf eine Assoziation zu M. Behcet hin ist bisher nicht in der Literatur beschrieben worden und wurde deshalb in dieser Arbeit unternommen.

Zum einen könnte es sich bei +2607 IL8RA (G/C) um eine direkt funktionelle Variante handeln, die Einfluss auf Expression und Aktivität von IL-8 und die durch IL-8 vermittelten Pathologika nehmen könnte, zum anderen könnte ein Koppelungsungleichgewicht mit einer oder mehreren funktionell wirksamen Komponenten existieren.

Die sich ergebenden WT- Allelfrequenzen G und der homozygoten WT-Trägerstatus GG der Gruppen aus Deutschland und der Türkei sind mit einen errechneten p- Wert von 0.6765 bzw. 0.6657 jedoch nicht signifikant, es ergibt sich kein Unterschied in den einzelnen Ethnien. Keine Signifikanz findet sich ebenso für eine Unterscheidung der Allelfrequenz und des homozygoten WT-Trägerstatus hinsichtlich der Diagnose M. Behcet. Die Patienten- und

Kontrollgruppen differieren bezüglich der WT-Allelhäufigkeit und des homozygoten WT-Trägerstatus nicht ($p= 0.2378$ bzw. 0.2222).

Die Allelfrequenzen der entsprechenden Patienten- und Kontrollgruppen wiesen Ähnlichkeit zu denen in der Literatur beschriebenen auf ($G= 0.891$; $C= 0.109$).

Erneut wurden diese Gruppen mit dem Ziel, in der statistischen Auswertung eine höhere Fallzahl zu erreichen, zusammengefasst.

Die Deutschen hatten eine 1.2348 fache Chance auf den homozygoten WT und eine 1.2165fache Chance auf das WT- Allel, somit finden sich mehr deutsche WT-Allele und homozygote WT-Mutationsträger als türkische, so dass eine deutsche Ethnizität einen protektiven Einfluß auf die Mutationshäufigkeit zu haben scheint. Allerdings scheint das WT- Allel und der homozygote WT-Trägerstatus keinen protektiven Einfluss bezüglich des M. Behcet auszuüben (Odds ratio= 1.6652 bzw. 1.7275), gleichzeitig besteht ebenfalls keine Assoziation zu M. Behcet ($p= 0.2378$ bzw. 0.2222).

Die niedrige Fallzahl limitiert natürlich auch hier die statistische Aussagekraft und alle bereits genannten Kritikpunkte hinsichtlich der Gruppenzusammensetzung gelten natürlich auch hier.

Insgesamt jedoch ergibt sich keine Assoziation des Polymorphismus +2607 IL8RA mit M. Behcet, obwohl hier ein funktionell relevantes SNP untersucht wurde und somit die Vermutung einer Beteiligung an Regulationsmechanismen bezüglich der Überexpression von IL8 bei M. Behcet Patienten nahe lag. Bis zum jetzigen Kenntnisstand kann nicht geklärt werden, welche Mechanismen für diese Dysregulation verantwortlich sind. Nicht alle beschriebenen Polymorphismen auf dem IL8- Gen und den beiden Rezeptorgen sind untersucht worden, nach jetzigem Kenntnisstand drei SNP im IL-8 Gen (-353 (A/G), +1530 (T/C), +3331 (A/G)), zwei im IL8RB- Gen (+785 (C/T), +1208 (T/C)) und einer im IL8RA- Gen (+2608 (G/C)), auch die Frage nach Koppelungsungleichgewichten und multigenetischer Ursache bleibt ungeklärt. Letztlich bedarf es noch einiger Forschungsarbeit, um die klinische Tatsache der Überexpression von Interleukin 8 bei M. Behcet- Patienten zu klären. Der Polymorphismus auf Exon 2 im IL8RA- Gen scheint jedoch nicht in ursächlichem Zusammenhang mit der Entwicklung eines M. Behcet zu stehen.

Eine ähnliche Ausgangssituation wie bei Interleukin 8 findet sich auch bei Interleukin 6. Interleukin 6 ist ein pleiotropes Zytokin, dessen Interaktionen und Wirkungen im Immunsystem vielfältig sind. Interleukin 6, dessen Gen auf Chromosom 7p21 codiert ist⁴⁹, interagiert mit Interleukin 6- Rezeptor (IL6R), welcher wiederum aus einer alpha- kette (IL6RA) und einer Untereinheit, GP 130, besteht und auf Chromosom 1q21 codiert ist⁵⁸. Interleukin 6 bindet primär an IL6RA, das sowohl membrangebunden, als auch in löslicher Form vorkommt. Die weitere Signalübermittlung erfolgt über GP 130, welches ebenfalls in diesen zwei Formen vorliegt⁴⁹. Die Regulation der zellulären Aufnahme von humanem Interleukin 6 wird jedoch ausschließlich über die Expression des IL6RA kontrolliert¹⁵so dass IL6RA eine weit bedeutendere Rolle zu spielen scheint, als ursprünglich aufgrund der geringen Aminosäure- Anzahl (82) angenommen⁴⁹.

Erhöhte Serumspiegel von Interleukin 6 bei entzündlich bedingten Erkrankungen, einschließlich M Behcet, sind seit längerem bekannt^{1,35,69,75}, ebenso wird eine Beteiligung von Interleukin 6 Genpolymorphismen bei chronisch inflammatorischen und autoimmunvermittelten Erkrankungen diskutiert^{8,13,31,42,51,89}.

Die Studienlage hierzu ist allerdings teilweise widersprüchlich. Teils konnten Interleukin 6 Genpolymorphismen mit der untersuchten Krankheit assoziiert werden, teilweise blieb das Ergebnis jedoch ohne Signifikanz. So konnte der Polymorphismus -174 IL6 (G/C) in einer Studie mit chronischer Arthritis assoziiert werden³¹, jedoch blieben die Untersuchung hinsichtlich einer Assoziation mit chronischer Pankreatitis¹³ und autoimmunem Diabetes⁸⁹ ergebnislos. Derselbe Polymorphismus, und ein weiterer auf dem Interleukin 6 Gen (IL6vntr B/C), wurden auch hinsichtlich einer möglichen Assoziation mit M. Behcet analysiert, allerdings konnte auch hier keine Verbindung mit der Erkrankung hergestellt werden¹⁷.

Die Überexpression von Interleukin 6 bei entzündlichen Erkrankungen könnte ihren Ursprung auch in einer genetisch bedingten Dysregulation durch Polymorphismen im Rezeptorgen haben, und eine nähere Untersuchung dieses möglichen Zusammenhangs scheint sinnvoll, auch und gerade weil die

Erforschung von Polymorphismen im IL6RA- Gen auf funktionelle Zusammenhänge hin gerade erst begonnen hat.

So beschrieben Kim LH et al. in ihrer 2003 veröffentlichten Studie erstmals verschiedene SNP im Interleukin 6 Rezeptor-Gen. Sieben SNP wurden hierbei identifiziert: Ein SNP in der Promoterregion (-183(G/A), ein synonymes SNP auf Exon 2 +24013 (G/A), ein nonsynonymes SNP auf Exon 9 +48892 (A/C), und vier auf Introns (+29753 A/C, +42700 T/C, +48869 T/A, +59818 C/T)⁵¹.

In einer anderen Arbeit von Galicia JC et al. (2004) konnte nachgewiesen werden, dass der +48892 (A/C) Polymorphismus auf Exon 9 in Zusammenhang mit einer erhöhten Produktion von löslichem IL6R steht³⁴. Dieser Polymorphismus, der funktionell wirksam ist, da eine Aminosäuresubstitution von Asparagin(GAT) zu Alanin(GCT) stattfindet, wurde für eine Untersuchung einer möglichen Assoziation mit M. Behcet verwendet. Außerdem wurde ein weiteres SNP analysiert, ein synonymes auf Exon 2 an Position +24013 (G/A), das allerdings nicht funktionell wirksam ist, da keine Aminosäuresubstitution stattfindet (Alanin/Alanin).

Für +48892 IL6R errechnet sich innerhalb der untersuchten Gruppen aus Deutschland und der Türkei ein p- Wert von 0.3164 hinsichtlich der WT-Allelfrequenz A und ein p-Wert von 0.1586 hinsichtlich des homozygoten WT-Trägers AA. Dieses Ergebnis ist nicht signifikant, so dass keine Differenzierung in der Allelhäufigkeit und des homozygoten WT- Trägerstatus in den verschiedenen Nationalitäten festzustellen ist. Kein Unterschied mit einem p-Wert von 0.5753, bzw. von 0.0871 findet sich in der Patienten- und Kontrollgruppe hinsichtlich des homozygoten WT-Trägerstatus AA und des WT- Allels A.

Eine deutsche Ethnizität erweist sich mit einer Odds ratio von 1.2743 und 2.4826 als protektiver Faktor in Bezug auf die Mutationshäufigkeit, ebenso scheint das WT-Allel (Odds ratio= 0.6913) und der homozygote Trägerstatus (Odds ratio= 0.7706) einen protektiven Einfluss bezüglich des M. Behcet auszuüben. Aufgrund der niedrigen Fallzahlen jedoch und der fehlenden Assoziation zu M. Behcet (p= 0.0871 bzw. p= 0.5753) muss jedoch von einer Verallgemeinerung abgesehen werden.

Für +24013 IL6R ergeben sich bezüglich der WT-Allelfrequenz G und des homozygoten WT-Trägerstatus GG der Nationalitäten deutsch- türkisch keine Differenz ($p= 0.6497$ bzw. 0.7423). Ebenso findet sich kein signifikanter Unterschied in der WT- Allelfrequenz und des homozygoten WT-Trägerstatus hinsichtlich der Diagnose M. Behcet. Patienten- und Kontrollgruppen differieren nicht ($p= 0.7989$ bzw. 0.8433).

Mit einer Odds ratio von 0.6954 bzw. 0.6894 scheint eine deutsche Ethnizität keinen protektiven Einfluss auf die Mutationshäufigkeit zu nehmen, ebenso scheint das WT-Allel und der homozygote WT- Trägerstatus keinen protektiven Einfluss bezüglich des M. Behcet zu nehmen (Odds ratio = 1.1815 bzw. 1.2009), gleichzeitig besteht keine Assoziation zu M. Behcet ($p= 0.7989$ bzw. 0.8433).

Kombiniert man die zwei Genloci +48892 und +24013 des Interleukin 6 Rezeptorgens miteinander und untersucht die Assoziation des sich ergebenden Mutationsallelträgerstatus mit der Diagnose M. Behcet und den Nationalitäten deutsch- türkisch, so ergibt sich mit einem p- Wert von 0.8637 des Mutationsallelträgerstatus von +48892 IL6R [C] und +24013 IL6R [A] hinsichtlich der Nation und einem p- Wert von 0.1195 hinsichtlich der Diagnose M. Behcet auch hier keine statistisch signifikante Differenz.

Die Allelfrequenzen der untersuchten Polymorphismen in Patienten- und Kontrollgruppen waren ähnlich der in der Literatur beschriebenen (+24013 IL6R: G= 0.861 , A= 0.139 ; +48892 IL6R: A= 0.638 , C= 0.362).

Somit konnten diese Gruppen, um eine höhere Fallzahl zu erreichen, in der statistischen Auswertung zusammengefasst werden.

Erneut wird die statistische Aussagekraft dieser Untersuchung durch die geringe Fallzahl eingeschränkt, alle angeführten Kritikpunkte finden auch hier ihre uneingeschränkte Gültigkeit.

Dies gilt vor allem für die Kombination der Genloci +48892 und +24013 des Interleukin 6 Rezeptorgens. Eine statistische Zusammenfassung des jeweiligen Mutationsallels dieser Polymorphismen wurde auf eine mögliche Assoziation mit M. Behcet und den Nationalitäten deutsch- türkisch hin untersucht. Allerdings limitiert diese Zusammenfassung die Fallzahl noch einmal, so dass zufallsbedingte Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden können.

Sowohl das funktionell wirksame, von dem man *a priori* durchaus einen Zusammenhang hätte erwarten können, als auch das mit weniger Erwartungen verknüpfte, da funktionell wirkungslos +24013 IL6R- SNP ergaben in dieser Arbeit keinerlei Assoziation mit M. Behcet, ebenso zeigte sich auch in der Kombination der zwei Genloci +48892 und +24013 des Interleukin 6 Rezeptorgens keine Assoziation mit M. Behcet.

Andere Polymorphismen im Interleukin 6 Rezeptor- Gen könnten für eine mögliche Assoziation mit M. Behcet in Frage kommen, auch wenn ein möglicher funktioneller Effekt auf transkriptionale oder post-transkriptionale Regulationsmechanismen aufgrund von möglichen Koppelungsungleichgewichten oder multigenetischer Ursache im Einzelnen schwierig nachzuweisen ist und sicherlich eine relativ große Fallzahl erfordern würde.

Eine endgültige Klärung der Überexpression von IL6 bei M. Behcet Patienten kann diese Arbeit nicht geben, allerdings kann festgestellt werden, dass bezüglich der Polymorphismen im Interleukin6 Rezeptor- Gen an den Positionen +24013(G/A) und +48892 (A/C) keinerlei Assoziation, auch in Kombination, hergestellt werden konnte.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Zusammenhang der untersuchten Polymorphismen -238 TNFalpha, +2607 IL8RA, +48892 IL6R und +24013 IL6R mit M. Behcet hergestellt werden, auch wenn die statistische Aussagekraft dieser Arbeit durch die geringe Fallzahl limitiert ist.

Die Fragestellung, ob davon auszugehen ist, dass entweder andere Polymorphismen in den Zytokin- oder Zytokinrezeptor- Genen als die hier untersuchten oder doch post-transkriptionale Faktoren für die Dysregulation der beschriebenen Zytokine TNFalpha, IL6 und IL8 bei M. Behcet Patienten verantwortlich sind, werden daher weitere Arbeiten klären.

5. Zusammenfassung

M. Behcet ist eine systemische Vaskulitis, die sowohl die Venen als auch die Arterien jeglicher Größe betrifft. Charakteristisch sind rezidivierende orale und genitale Ulzera, Augenmanifestationen und eine Beteiligung des zentralen Nervensystems, des Gastrointestinaltrakts und der Haut. Der am besten untersuchte Genlocus in Bezug auf M. Behcet ist der HLA –Komplex auf Chromosom 6p21. Vor allem der Polymorphismus des HLA-B51 Gens wird mit der Erkrankung assoziiert, insbesondere unter den Patienten, die entlang der Seidenstrasse leben. Letztendlich jedoch bleibt die Pathogenese der Erkrankung bis zum jetzigen Zeitpunkt immer noch ungeklärt, sicher spielen multifaktorielle Ursachen eine Rolle.

IL-6, IL-8 und TNF alpha sind proinflammatorische Zytokine und ihre erhöhten Serumspiegel bei M. Behcet Patienten sind seit längerem bekannt und dokumentiert.

Polymorphismen im Rezeptor- und Zytokin- Gen könnten im pathophysiologischem Sinne regulatorischen Einfluss auf Expression und Aktivität dieser Zytokine nehmen und wurden deshalb in dieser Arbeit näher untersucht.

Der Polymorphismus -238 TNF alpha (G/A) in der Promoterregion des TNF alpha Gens wurde mit Hilfe der LightCycler- PCR- Methode bei 92 deutschen und 30 türkischen Patienten mit M. Behcet und bei 51 gesunden deutschen und 20 gesunden türkischen Kontrollen analysiert. Ein nonsynonymes SNP (+2607 G/C) auf Exon 2 des IL8RA- Gens und zwei weitere SNP des IL6R- Gens, ein synonymes auf Exon 2 (+24013 A/G) und ein nonsynonymes auf Exon 9 (+48892 A) wurden sowohl bei 94 deutschen und 30 türkischen Patienten als auch bei 50 deutschen und 20 türkischen gesunden Kontrollen untersucht, erneut mit der LightCycler- PCR- Methode.

Bezüglich des -238 TNF alpha (G/A) Polymorphismus wiesen 85% der Deutschen und 94% der Türken den homozygoten Wildtyp GG auf, während 15% der Deutschen und 6% der Türken den heterozygoten Genotyp AG zeigten. 87% der insgesamten Patienten- und Kontrollgruppe präsentierten den homozygoten Wildtyp GG und 13% den heterozygoten Genotyp AG.

85% der deutschen Patienten- und Kontrollgruppe wiesen den homozygoten Wildtyp GG auf, 15% den heterozygoten Genotyp. Der Patientenanteil von 4% Heterozygoten-Proben aus der Türkei steht einem 10%igem Anteil aus der Kontrollgruppe gegenüber.

Trägerstatus und Allelfrequenz wurden hinsichtlich der Nationalitäten deutsch-türkisch und hinsichtlich der Diagnose M. Behcet auf statistisch signifikante Zusammenhänge untersucht. Mit einem p-Wert von 0.1280 hinsichtlich der Nationalität und einem p- Wert von 0.8649 hinsichtlich der Diagnose ergab sich hier bezüglich der Allelfrequenz kein statistisch signifikanter Zusammenhang. Ebenso ergab sich hinsichtlich des Trägerstatus kein statistisch signifikanter Zusammenhang, da keine homozygoten Mutationen bei -238 TNFalpha detektiert wurden. Somit gleichen sich die Ergebnisse des Trägerstatus mit den Ergebnissen der Allelfrequenz ($p= 0.1206$ bzw. 0.8872).

Mit einem p- Wert von 0.6765 der Allelfrequenz bzw. des Trägerstatus ($p= 0.6657$) hinsichtlich der Nationalität bzw. der Diagnose ($p= 0.2378$ und $p=0.2222$) konnte bei dem untersuchten Polymorphismus +2607 IL8RA (G/C) kein signifikanter Zusammenhang hergestellt werden. Insgesamt waren 11% der deutschen und 14% der türkischen Proben heterozygot GC, während 89% der deutschen und 86% der türkischen Proben den homozygoten Wildtyp GG trugen. Homozygot mutierte Proben konnten nicht detektiert werden. Beim Vergleich der Patienten- zu den Kontrollproben aus Deutschland hinsichtlich des heterozygoten Genotyps ergibt sich ein Unterschied von 5%, bei den türkischen Proben eine Differenz von 10%. Im Gesamtvergleich ergibt sich eine Abweichung von 6% der Patientenproben aus Deutschland und Türkei gegenüber der Kontrollgruppe Deutschland/ Türkei.

+48892 IL6R war der einzige Polymorphismus, bei dem alle Genotypen identifiziert werden konnten. 35% der deutschen und 37% der türkischen Proben zeigten den homozygot mutierten Genotyp CC, ebenfalls CC präsentierten 40% der gesamten Patienten- und 28% der gesamten Kontrollgruppe. Den heterozygoten Genotyp wiesen 52% der Deutschen und 57% der Türken auf, bei den Patienten insgesamt waren 49% und bei den Gesunden insgesamt 60% heterozygot. Den homozygoten Wildtyp zeigten schließlich 13% der deutschen und 6% der türkischen Proben, während sich

die Patientengruppe insgesamt in 11% und die Kontrollgruppe insgesamt in 13% mit diesem Genotyp präsentierte.

Es ergab sich ein Unterschied der Patientenproben zu den Kontrollproben aus Deutschland von 10% hinsichtlich der Anzahl der homozygot mutierten Proben, von 6% bezüglich der heterozygoten Proben und von 4% bei den homozygoten Wildtyp- Proben. Die Ergebnisse der türkischen Proben sind ähnlich, so dass sich im Gesamten ein Unterschied von 12% bei den homozygot mutierten, 10% bei den heterozygoten und 2% bei den homozygoten Wildtyp- Proben ergibt.

Es ergibt sich auch hier kein signifikanter Unterschied der Allelfrequenz und des Trägerstatus sowohl bezüglich der Nationalität ($p=0.3164$ bzw. $p= 0.1586$) als auch hinsichtlich der Diagnose ($p= 0.0871$ bzw. $p= 0.5753$).

Ebenso konnte für das +24013 IL6R SNP kein statistisch signifikanter Zusammenhang ermittelt werden. Der p- Wert der Allelfrequenz und des Trägerstatus betrug hinsichtlich der Nationalität 0.6497 bzw. 0.7423 und bezüglich der Diagnose 0.7989 bzw. 0.8433.

3% der deutschen und 2% der türkischen Proben zeigten den homozygot mutierten Genotyp AA und 97% der Deutschen und 98% der Türken den homozygot mutierten Genotyp GG. Des weiteren präsentierten 2% der gesamten Patienten und 3% der gesamten Kontrollen den homozygot mutierten Genotyp, während 98% der Patienten und 97% der Gesunden insgesamt den homozygoten Wildtyp aufwiesen, da keine heterozygote Probe detektiert werden konnte. In der Gegenüberstellung der deutschen Patienten- zu Kontrollproben ergab sich eine Differenz von 2% bezüglich der homozygot mutierten Proben sowie von 2% hinsichtlich der homozygoten Wildtyp- Proben. Ein Unterschied von 3% fand sich im selben Vergleich der türkischen Proben.

Kombiniert man die zwei Genloci +48892 und +24013 des Interleukin 6 Rezeptorgens miteinander und untersucht die Assoziation des sich ergebenden Mutationsallelträgerstatus mit der Diagnose M. Behcet und den Nationalitäten deutsch- türkisch, so ergibt sich mit einem p- Wert von 0.8637 des Mutationsallelträgerstatus von +48892 IL6R [C] und +24013 IL6R [A] hinsichtlich der Nation und einem p- Wert von 0.1195 hinsichtlich der Diagnose M. Behcet auch hier keine statistisch signifikante Differenz.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Polymorphismen im -238 TNFalpha Gen, im +2607 IL8RA Gen, im +48892 IL6R Gen und im +24013 IL6R Gen nicht mit M. Behcet assoziiert sind und keine Rolle in der erhöhten Expression von TNF alpha, IL8 und IL6 bei M. Behcet Patienten spielen. Generell erweist es sich jedoch als schwierig, die alleinige Funktion eines Polymorphismus zu untersuchen, da mögliche Koppelungsungleichgewichte und multifaktorielle Ursachen für Effekte auf transkriptionale oder post-transkriptionale Regulationsmechanismen mitberücksichtigt werden müssen.

Gerade der Polymorphismus an Position -238 TNF alpha zum Beispiel befindet sich in einem starken Koppelungsungleichgewicht, sowohl mit HLA- Genen, als auch mit anderen beschriebenen TNF alpha- Polymorphismen. Jedoch gilt dieser Umstand auch für die anderen in dieser Arbeit näher untersuchten Polymorphismen +2607 IL8RA, +48892 IL6R und +24013 IL6R. Die Erforschung dieser Rezeptorgene hinsichtlich einer möglichen Assoziation mit verschiedensten Erkrankungen, meist entzündlicher Genese, wurde darüber hinaus erst seit kurzem aufgenommen, so dass zum einen erst relativ wenig Material hierzu verfügbar ist, zum anderen könnten sich auf diesem Sektor noch wesentlich mehr Erkenntnisse in der genauen Funktionalität und Effektivität dieser (mutierten) Rezeptorgene ergeben.

Des Weiteren limitiert natürlich die niedrige Fallzahl die statistische Aussagekraft dieser Arbeit. Eine größere Gruppenbildung mit M. Behcet Patienten erweist sich jedoch als schwierig, da die Krankheit selten ist und nur wenige Klinikzentren existieren. So wiesen zahlreiche andere Studien aufgrund dieser Problematik ebenfalls nur eine begrenzte Anzahl an Patientenproben auf.

Insgesamt kann in dieser Arbeit keine Assoziation der geprüften Polymorphismen mit M. Behcet hergestellt werden. Weitere Arbeiten werden die Fragestellung klären, ob davon auszugehen ist, dass entweder andere Polymorphismen in den Zytokin- oder Zytokinrezeptor- Genen als die hier untersuchten oder doch post-transkriptionale Faktoren für die Dysregulation der beschriebenen Zytokine TNF alpha, IL6 und IL8 bei M. Behcet Patienten verantwortlich sind.

6. Literaturverzeichnis

1. Adam B, Calikoglu E (2004)
Serum interleukin-6, procalcitonin and C-reactive protein levels in subjects with active Behcet's disease
European Academy of Dermatology and Venerology JEADV, **18**, 318-320
2. Adamantiades B (1931)
Sur un cas d'irite a hypopyon recidivant
Ann Oculist (Paris), **168**, 271-278
3. Ahmad T, Wallace GR, James T (2003)
Mapping the HLA association in Behcet's disease: a role for tumour necrosis factor polymorphism?
Arthritis Rheum, **48**, 807-813
4. Akmaz O, Erel A, Gurer MA (2000)
Comparison of histopathologic and clinical evaluations of pathology test in Behcet's disease
Int J Dermatol, **37**, 929-933
5. Aksu K, Turgan N, Oksel F (2001)
Hyperhomocysteinemia in Behcet's disease
Rheumatology (Oxford), **40**, 687-690
6. Al-Dalaan A, Al-Sedairy S, Al-Balaa S, Al-Janadi M, Elramahi K, Bahabri S, Siddiqui S (1995)
Enhanced Interleukin 8 Sekretion in Circulation of Patients with Behcet's Disease
J Rheumatol, **22**, 904-907
7. Arinir U, Klein W, Rohde G, Stemmler S, Epplen JT, Schultze-Werninghaus G (2005)
Polymorphisms in the interleukin-8 gene in patients with chronic obstructive pulmonary disease
Electrophoresis, **26**, 2888-2891
8. Atsumi T, Ishihara K, Kamimura D, Ikushima H, Ohtani H, Hirohata S, Kobayashi H, Park SJ, Saeki Y, Kitamura Y, Hirano T (2000)
A Point Mutation of Tyr-759 in Interleukin 6 Family Cytokine Receptor Subunit gp130 Causes Autoimmune Arthritis
J Exp Med, **196**, 979-990

9. Bardak Y, Aridogan BC (2004)
The demonstration of serum interleukin 6-8, tumor necrosis factor-alpha, complement, and immunoglobulin levels in Behcet's disease with ocular involvement
Ocul Immunol Inflamm, **1**, 53-58
10. Barton A, Platt H, Salway F, Symmons D, Barrett E, Bukhari M, Lunt M, Zeggini E, Eyre S, Hinks A, Tellam D, Brintnell B, Ollier W, Worthington J, Silman A (2004)
Polymorphisms in the tumour necrosis factor gene are not associated with severity of inflammatory polyarthritis
Ann Rheum Dis, **63**, 280-284
11. Behcet H (1937)
Über rezidivierende, aphtöse, durch ein Virus verursachte Geschwüre am Mund, am Auge und an den Genitalien
Dermatol Wochenschr, **105**, 1152-1157
12. Benamour S, Zeroual B, Alaoui FZ (1998)
Joint manifestations in Behcet's disease. A review of 340 cases
Revue Rheumatologie (English Edition), **65**, 299-307
13. Bendicho MT, Guedes JG, Silva NN, Santana GO, Roch dos Santos R, Lyra AC, Lyra LG, Meyer R, Lemaire DC (2005)
Polymorphism of Cytokine Genes (TGF-beta1, IFNgamma, IL-6, IL-10, and TNF alpha) in Patients With Chronic Pancreatitis
Pancreas, **30**, 333-336
14. Bouma G, Xia B, Crusius JB, Bioque G, Koutroubakis I, von Blomberg BM, Meuwissen SG, Pena AS (1996)
Distribution of four polymorphisms in the tumour necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD).
Clin Exp Rheumatol, **103**, 391-395
15. Breen EC, Gage JR, Guo B, Magpantay L, Narazaki M, Kishimoto T, Miles S, Matinez-Maza (2001)
Viral interleukin 6 stimulates human peripheral blood B cells that are unresponsive to human interleukin 6
Cell Immunol, **212**, 118-125
16. Celik Y, Dagli U, Kilic MY, Toruner M, Ozen SC, Ozkan M, Soykan I, Cetinkaya H, Ulker A, Ozden A, Bozdayi AM (2006)
Cytokine gene polymorphisms in Turkish patients with inflammatory bowel disease
Scand J Gastroenterol, **41**, 559-565

17. Chang HK, Jang WC, Park SB, Han SM, Nam YH, Lee SS, Kim JU, Lee HS (2005)
Association between interleukin 6 gene polymorphism and Behcet's disease in Korean people
Ann Rheum Dis, **64**, 339-340
18. Choy E (2003)
Interleukin 6 receptor as a target of rheumatoid arthritis
Ann Rheum Dis, **62(Suppl II)**, ii68-ii69
19. Chuntharapai A, Kim KJ (1995)
Regulation of the Expression of IL-8 Receptor A/B by IL-8: Possible Functions of Each Receptor
The Journal of Immunology, **155**, 2587-2594
20. Coskun M, Bacanli A, Sallakci N, Alpsoy E, Yavuzer U, Yegin O (2005)
Specific interleukin-1 gene polymorphisms in Turkish patients with Behcet's disease
Exp Dermatol, **14**, 124-129
21. D'Alonso S, Momigliano F, Richiardi P (1994)
A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region
Immunogenetics, **39**, 150-154
22. Daig R, Andus T, Aschenbrenner E, Falk W, Scholmerich J, Gross V (1996)
Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease
Gut, **2**, 216-222
23. Dellinger RP (2003)
Inflammation and coagulation: Implications for the septic patient
Clin Infect Dis, **36**, 1259-1265
24. Direskeneli H (2001)
Behcet's disease: infectious aetiology, new autoantigens, and HLA-B51
Ann Rheum Dis, **60**, 996-1002
25. Dymaz-Tozki J, Gül A, Uvar FA, Ozbek U, Saruhan-Direskeneli G (2003)
Tumour necrosis factor- α gene promoter region -308 and -376 G>A polymorphisms in Behcet's disease
Clin Exp Rheumatol, **21**, 15-18

26. Dymaz-Tozkir J, Yilmaz V, Uyar FA, Hajeer AH, Saruhan-Direskeneli G, Gül A (2005)
Polymorphisms of the IL-8 and CXCR2 Genes Are Not Associated with Behcet's Disease
The Journal of Rheumatology, **32**, 93-97
27. Erdem H, Pay S, Serdar M, Simsek I, Dinc A, Musaback U, Pekel A, Turan M (2005)
Different ELR(+) angiogenic CXC chemokine profiles in synovial fluid of patients with Behcet's disease, familial Mediterranean fever, rheumatoid arthritis, and osteoarthritis
Rheumatol Int, **2**, 162-167
28. Espinosa G, Font J, Tassies D (2002)
Vascular involvement in Behcet's disease: relation with thrombophilic factors, coagulation activation, and thrombomodulin
Am J Med, **112**, 37-43
29. Fabris M, Di Pio E, D'elia A, Damante G, Sinigaglia L, Ferraccioli G (2002)
Tumor Necrosis Factor alpha Gene Polymorphism in Severe and Mild-Moderate Rheumatoid Arthritis
The Journal of Rheumatology, 29-33
30. Fargion S, Valenti L, Dongiovanni P, Francanzani AL (2004)
TNF alpha promoter polymorphisms
Methods Mol Med, **98**, 47-58
31. Fishman D, Faulds G, Jeffrey R, Mohammed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S et al (1998)
The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma levels, and an association with system-onset juvenile chronic arthritis
J Clin Invest, **102**, 1369-1376
32. Frassinato MA, Dammacco R, Cafforio P, Dammacco F (1999)
Th1 polarization of the immune response in Behcet's disease: a putative pathogenetic role of Interleukin-12
Arthritis Rheum, **42**, pp1967-1974
33. Freire A, Bertolo MB, Phino AJ, Samara AM, Fernandes SRM (2004)
Increased serum levels of interleukin-8 in polyarthritis nodosa and Behcet's disease
Clin Rheumatol, **23**, 203-205
34. Galicia JC, Tai H, Komatsu Y, Shimada Y, Akazawa K, Yoshie H (2004)
Polymorphisms in the IL-6 receptor (IL-6R) gene: strong evidence that serum levels of soluble IL-6R are genetically influenced
Genes Immun, **6**, 513-516

35. Guimbaud R, Bertrand V, Chauvelot-Moachon L, Quartier G, Vidon N, Giroud JP, Couturier D, Chaussade S (1998)
Network of inflammatory cytokines and correlation with disease activity in ulcerative colitis
Am J Gastroenterol, **12**, 2397-2404
36. Gül A (2001)
Behcet's disease:An update on the pathogeneses
Clin Exp Rheumatol, **19**, S6-S12
37. Hajeer AH Hutchinson IV (2001)
Influence of TNF α Gene Polymorphisms on TNF α Produktion and Disease
Hum Immunol, **62**, 1191-1199
38. Hamuryudan V, Yurdakul S, Moral F (1994)
Pulmonary arterial aneurysms in Behcet's syndrome:a report of 24 cases
Br J Rheumatol, **33**, 48-51
39. Hirano T (1998)
Interleukin 6 and its receptor: ten years later
Int Rev Immunol, **16**, 249-284
40. Hirohata Shunsei Kikuchi Hirotohi (2003)
Behcet's disease
Arthritis Res Ther, **5**, 139-146
41. Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijers V, Brinkman BM, Langermans JA, Breedveld FC, Verweij CL, van de Gaer L, van Oosten BW, Polman CH, Peria AS (1997)
TNF- α promoter polymorphism, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients
J Neuroimmunol, **27**, 149-153
42. Hulkkonen J, Pertovaara M, Anttonen J, Pasternack A, Hurme M (2001)
Elevated interleukin-6 plasma levels are regulated by the promoter region polymorphism of the IL6 gene in primary Sjögren's syndrome and correlate with the clinical manifestations of the disease
Rheumatology (Oxford), **40**, 656-661
43. Hull J, Ackermann H, Isles K, Usen S, Pinder M, Thomson A, Kwiatkowski D (2001)
Unusual Haplotypic Structure of IL8, a Susceptibility Locus for a Common Respiratory Virus
Am J Hum Genet, **69**, 413-419

44. Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D (2000)
Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families
Thorax, **55**, 1023-1027
45. International Study Group for Behcet's disease, C. f. d. o. B. d. (1990)
International Study Group for Behcet's disease
Lancet, **335**, 1078-1080
46. Itoga S, Nanmoku T, Uchimoto T, Sunaga M, Nezu M, Tomonaga T, Harada S, Nomura F (2004)
Comparative Analyses of Four Different Methods of Genotyping ALDH2
Alcohol Clin Exp Res, **28**, 117S-122S
47. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2005)
Immunobiology:the immune system in health and disease
Churchill Livingstone, **6th edition**
48. Kamali- Saverstani E, Nikseresth AR, Aliparasti MR, Vessal M (2006)
IL-8 (-251 A/T) and CXCR2 (+1208 C/T) gene polymorphisms and risk of multiple sclerosis in Iranian patients
Neurosci Lett, ahead of print
49. Kamimura D, Ishihara K, Hirano T (2003)
IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model
Rev Physiol Biochem Pharmacol, **149**, 1-38
50. Kera J, Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Pivetti-Pezzi P, Ohno S, Inoko H (1999)
Significant associations of HLA-B5101* and B 5108*, and a lack of association of class II alleles with Behcet's disease in Italian patients
Tissue Antigens, **54**, 565-571
51. Kim LH, Lee HS, Kim YJ, Jung JH, Kim JY, Park BL, Shin HD (2003)
Identifikation of Novel SNPs in the Interleukin 6 Receptor Gene (IL6R)
Human Mutation Mutation in brief, **#601 Online**,
52. Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Kohler G (1994)
Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice
Nature, **368**, 339-342
53. Korkmaz C, Bozan B, Kosar M (2002)
Is there an association of plasma homocysteine levels with vascular involvement in patients with Behcet's syndrome?
Clin Exp Rheumatol, **20**, S30-S34

54. Kotter I, Gunaydin I, Stubinger N, Yazici H, Fresko I, Zouboulis CC, Adler Y, Steiert I, Kurz B, Wernet D, Braun B, Muller CA (2001)
Comparative analyses of the association of HLA-B51* suballeles with Behcet's disease in patients of German and Turkish origin
Tissue Antigens, **58**, 166-170
55. Krause I, Rosen Y, Kaplan I (1999)
Recurrent aphthous stomatitis in Behcet's disease: clinical features and correlation with systemic disease expression and severity
J Oral Pathol Med, **28**, 193-196
56. Kural-Seyahi E, Fresko I, Seyahi N (2003)
The long-term mortality and morbidity of Behcet syndrome: a 2-decade outcome survey of 387 patients followed at a dedicated center
Medicine (Baltimore), **82**, 60-76
57. Landi S, Moreno V, Gioia-Patricola L, Guino E, Navarro M, de Oca J, Capella G, Canzian F (2003)
Association of Common Polymorphisms in Inflammatory Genes Interleukin (IL) 6, IL8, Tumor necrosis factor alpha, NFkB1, and Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma with Colorectal Cancer
Cancer Res, **63**, 3560-3566
58. Lee CR, Kim WH, Cho YS (2001)
Colonoscopic findings in Behcet's disease
Inflamm Bowel Dis, **7**, 243-249
59. Lee EB, Kim YJ, Lee YJ, Park ME, Song YW (2003)
TNF and TNF Receptor Polymorphisms in Korean Behcet's Disease Patients
Hum Immunol, **64**, 614-620
60. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh R (2003)
IL-8 Directly Enhanced Endothelial Cell Survival, Proliferation, and Matrix Metalloproteinases Production And Regulated Angiogenesis
The Journal of Immunology, **170**, 3369-3376
61. Lippert U, Artuc M, Grützkau A, Möller A, Kenderessy-Szabo A, Schadendorf D, Norgauer J, Hartmann K, Schweitzer-Stenner R, Zuberbier T, Henz BM, Krüger-Krasagakes S (1998)
Expression and Functional Activity of the IL-8 Receptor Type CXCR1 and CXCR2 on Human Mast Cells
The Journal of Immunology, **161**, 2600-2608
62. Low AS, Azmy I, Sharaf N, Cannings C, Wilson AG (2002)
Association between two tumour necrosis factor intronic polymorphisms and HLA alleles
Eur J Immunogenet, **29**, 31-34

63. Mantas C, Direskeneli H, Eksioglu-Demiralp E, Akoglu T (1999)
Serum levels of Th2 cytokines IL-4 and IL-10 in Behcet's disease
The Journal of Rheumatology, **26**, 510-512
64. Marshall E.Sara (2004)
Behcet's disease
Clin Rheumatol, **18**, 291-311
65. Mege JL, Dilsen N, Sanguedolce V, Gul A, Bongrand P, Roux H, Ocal L, Inanc M, Capo C (1993)
Overproduction of monocyte derived tumour necrosis factor alfa, Interleukin(IL) 6, IL-8 and increased neutrophil superoxide generation in Behcet's disease. A comparative study with familial mediterranean fever and healthy subjects
J Rheumatol, **20**, 1544-1549
66. Mycko M, Kowalski W, Kwinkowski M, Buenafe AC, Szymanska B, Tronczynska E, Plucienniczak A, Selmaj K (1998)
Multiple sclerosis: the frequency of allelic forms of tumour necrosis factor and lymphotoxin alpha
J Neuroimmunol, **84**, 198-202
67. Nakae K, Masaki F, Hashimoto T, Inaba G, Mochizuki M, Sakane T (1993)
Recent epidemiological features of Behcet's disease in Japan
Wechsler B, Godeau P, eds Behcet's disease Amsterdam:Experta Medica, 145-151
68. Nakahara H, Song J, Sugimoto M, Hagihara K, Kishimoto T, Yoshizaki K, Nishimoto N (2003)
Anti-Interleukin-6 Receptor Antibody Therapy Reduces Vascular Endothelial Growth Factor Production in Rheumatoid Arthritis
Arthritis Rheum, **48**, 1521-1529
69. Nishimoto N, Kishimoto T, Yoshizaki K (2000)
Anti-interleukin 6 receptor antibody treatment in rheumatic disease
Ann Rheum Dis, **59**, 21-27
70. Ohtani T, Ohtani H, Oki M, Naganuma H, Nagura H (2002)
CXC chemokine receptor 1 (CXCR1) is expressed mainly by neutrophils in inflamed gut and stomach tissue
Tohoku J Exp Med, **3**, 179-184
71. Orchard TR, Chua CN, Ahmad T, Cheng H, Welsh KI, Jewell DP (2002)
Uveitis and erythema nodosum in inflammatory bowel disease: clinical features and the role of HLA-genes
Gastroenterology, **123**, 714-718

72. Park SH, Park KS, Seo YI, Min DJ, Kim WU, Kim TG, Cho CS, Mok JW, Park KS, Kim HY (2002)
Association of MICA polymorphism with HLA-B51 and disease severity in Korean patients with Behcet's disease
J Korean Med Sci, **17**, 366-370
73. Pfeffer K (2003)
Biological functions of tumour necrosis factor cytokines and their receptors
Cytokine Growth Factor Rev, **14**, 185-191
74. Puthutho B, Krueger M, Heinze J, Forster J, Heinzmann A (2006)
Impact of IL8 and IL8- Receptor alpha polymorphisms on the genetics of bronchial asthma ad severe RSV infections
Clin Mol Allergy, 4:2-6
75. Radstake TRDJ, van Lent PLEM, Pesman GJ, Sweep FGJ, Rönnelid J, Adema GJ, Barrera P, van den Berg WB (2003)
High produktion of proinflammatory and TH1 Cytokines by dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis, and down regulation upon FcgammaR triggering
Ann Rheum Dis, **63**, 696-702
76. Rasmussen SK, Urhammer SA, Jensen JN, Hansken T, Borch- Johnsen K, Pedersen O (2000)
The -238 and 308 G-->A Polymorphisms of the Tumour Necrosis Factor alpha Gene Promotor Are Not Associated with Features of the Insulin Resistance Syndrom or Altered Birth Weight in Danish Caucasians
J Clin Endocrinol Metab, **85**, 1731-1734
77. Renzoni E, Lympany P, Sestini P (2000)
Distribution of novel polymorphisms of the IL-8 and CXC receptor 1 and 2 genes in systemic sclerosis and cryptogenic fibrosing alveolitis
Arthritis Rheum, **43**, 1633-1640
78. Richardson RM, Marjoram Rj, Barak LS, Snyderman R (2003)
Role of the Cytoplasmatic Tails of CXCR1 and CXCR2 in Mediating Leukocyte Migration, Activation, and Regulation
The Journal of Immunology, **170**, 2904-2911
79. Rincon M, Anguita J, Nacamura T, Fikrig E, Flavell RA (1997)
Interleukin 6 (IL-6) directs the differentiation of IL-4 producing CD4+ T cells
J Exp Med, **185**, 461-469
80. Riott IM, Brostoff J, Male DK (1995)
Kurzes Lehrbuch der Immunologie
Thieme, **3.neubearbeitete Auflage**,

81. Roth MP, Nogueira L, Coppin H, Clanet M, Clayton J, Cambon-Thomson A (1994)
Tumour necrosis polymorphisms in multiple sclerosis: no additional association independent of HLA
J Neuroimmunol, **51**, 93-99
82. Sakane T, Takeno M, Suzuki N, Inaba G (1999)
Behcet's Disease
The New England Journal of Medicine, **341**, 1284-1291
83. Savage SA, Abnet CC, Mark SD, Qiao YL, Dong ZW, Dawsey SM, Taylor PR, Chanock SJ (2004)
Variants of the IL8 and IL8RB Genes and Risk for Gastric Cardia Adenocarcinoma and Esophagel Squamous Cell Carcinoma
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, **12**, 2251-2257
84. Sayinalp N, Özcebe OI, Özdemir O, Haznedaroglu IC, Dündar S, Kirazli S (1996)
Cytokines in Behcet's disease
J Rheumatol, **23**, 321-322
85. Serdaroglu P (1998)
Behcet's disease and the nervous system
J Neurol, **245**, 197-205
86. Sfikakis PP (2002)
Behcet's disease: a new target for anti-tumour necrosis factor treatment
Ann Rheum Dis, **61**, ii51-ii53
87. Sprenger H, Lloyd AR, Meyer RG, Johnston JA, Kelvin DJ (1994)
Genomic Structure, Charakterization, and identifikation of the Promoter of the Human IL-8 Receptor A Gene
The Journal of Immunology, **153**, 2524-2527
88. Sturm A, Baumgart DC, Harder d'Heureuse J, Hotz A, Wiedenmann B, Dignass AU (2005)
CXCL8 modulates human intestinal epithelial cells through a CXCR1 dependent pathway
Cytokine, **29**, 42-48
89. Tsiavou A, Hatziagelaki E, Chaidaroglou A, Manginas A, Koniavitou K, Degiannis D, Raptis SA (2004)
TNFalpha, TGFbeta, IL10, IL6, Gene Polymorphisms in Latent Autoimmune Diabetes of Adults (LADA) and Type 2 Diabetes mellitus
J Clin Immunol, **24**, 591-599

90. Verity DH, Wallace GR, Vaughan RW, Kondeatis E, Madanat W, Zureikat H, Fayyad F, Marr JE, Kanawati CA, Stanford MR (1999)
HLA and tumour necrosis factor (TNF) polymorphisms in ocular Behcet's disease
Tissue Antigens, **54**, 264-272
91. Waldron- Lynch F, Adams C, Amos C, Zhu DK, McDermott MF, Shanahan F (2001)
Tumour necrosis factor 5' promoter single nucleotide polymorphisms influence susceptibility to rheumatoid arthritis (RA) in immunogenetically defined multiplex RA families
Genes Immun, **2**, 82-87
92. Wang LM, Kitteringham N, Mineshita S, Wang JZ, Nomura Y, Koike Y, Miyashita E (1997)
The demonstration of serum interleukin-8 and superoxide dismutase in Ahmantiades-Behcet's disease
Arch Dermatol, **289**, 444-447
93. Williams EJ, Haque S, Banks C, Johnson P, Sarsfield P, Sheron N (2000)
Distribution of the interleukin-8 receptors, CXCR1 and CXCR2, in inflamed gut tissue
J Pathol, **192**, 533-539
94. Ying Song, Kai Chun Wu, Li Zhang, Zi Ming HaoHong Tao Li, Ling (2005)
Correlation between a gene polymorphism of tumour necrosis factor and inflammatory bowel disease
Chinese Journal of Digestive Disease, **6**, 160-164
95. Yoon MS, Lee SH, Bang DS, Lee S (1987)
Cutaneous manifestations of Behcet' syndrome
Yonsei Med J, **28**, 291-296
96. Yurdakul S, Hamuryudan V, Yazici H (2003)
Behcet's syndrome
Curr Opin Rheumatol, **16**, 38-42
97. Yurdakul S, Tüzüner N, Yurdakul I (1996)
Gastrointestinal involvement in Bechet's syndrome: a controlled study
Ann Rheum Dis, **55**, 208-210
98. Zipperlen K, Peddle L, Melay B, Hefferton D, Rahmann P (2005)
Association of TNFalpha polymorphisms in Crohn disease
Hum Immunol, **66**, 56-59

99. Zouboulis CC, Kötter I, Djawari D (1997)
Epidemiological features of Adamantiades-Behcet's disease in Germany
and Europe
Yonsei Med J, **38**, 411-422

Danksagung

An allererster Stelle gilt mein besonderer Dank meiner Doktormutter PD Dr. med. Ina Kötter, ohne deren stete Förderung und geduldige Unterstützung die vorliegende Arbeit nicht entstanden wäre.

Ebenso bin ich PD Dr. Jürgen Löffler zu Dank verpflichtet, der den Entstehungsprozess meiner Arbeit stets mit Interesse und Rat begleitet hat, zunächst von Tübingen, später dann von Würzburg aus. Ebenso möchte ich allen Labormitarbeitern für ihre Unterstützung danken.

Ohne die wiederholte, viel Geduld an den Tag legende Hilfe von Dr. Vonthein wäre es mir wohl nicht gelungen, die statistischen Hürden, die sich mir im Zuge der Arbeit mehrfach stellten, erfolgreich zu überwinden. Auch ihm möchte ich an dieser Stelle meinen Dank zukommen lassen.

Für die unermüdliche Unterstützung im oftmals nervenaufreibenden Kampf mit den Tücken von Computer und Software, ebenso für die stete Bereitschaft, dem Entstehungsprozess der Arbeit mit eben nicht selbstverständlichem Rat und wiederholter Tat zur Seite zu stehen, gilt mein herzlicher Dank Markus Günther und Nadine Schultze.

Curriculum vitae

Name: Storz

Vorname: Kristina Ulrike Anna

Geburtsdatum: 14. 10. 1980

Geburtsort: Kempten/ Allgäu

Eltern: Dr. med. Peter Storz
Ulrike Lassig- Storz

Geschwister: Joanna Storz, geb. 16.04.1968

Schulbildung: 1986- 1990 Grundschule Betzigau
1990- 2000 Carl- von- Linde- Gymnasium Kempten

Schulabschluss: Abitur 2000
Carl- von-Linde- Gymnasium Kempten

Studium: seit dem Wintersemester 2000 Studium der Humanmedizin
an der Eberhard- Karls- Universität Tübingen
Physikum: März 2003
derzeit im 12 Fachsemester

