

Aus der Medizinischen Klinik 3 -  
Rheumatologie und Immunologie  
der  
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen/Nürnberg  
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Schett

**Auswirkungen eines  
Einzelnukleotid - Polymorphismus  
im Adiponectin - Gen  
auf Pathogenese und klinische Manifestation der  
Systemischen Sklerose**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der  
Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

Konstantin Huhn

aus Augsburg



**Gedruckt mit Erlaubnis der  
Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen-Nürnberg**

**Dekan:** Prof. Dr. med. J. Schüttler  
**Referent:** Priv.-Doz. Dr. med. J. Distler  
**Korreferent:** Prof. Dr. med. G. Schett  
**Tag der mündlichen Prüfung:** 30.11.2011

# **Widmung**

Meiner Familie in Dankbarkeit und Liebe gewidmet

# Inhalt

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Summary</b>	<b>3</b>
<b>3. Einleitung</b>	<b>5</b>
3.1. Überblick über die Sklerodermie	5
3.1.1. Epidemiologie und klinische Manifestation	5
3.1.2. Pathogenese und Histopathologie	9
3.2. Genetische Faktoren bei SSc	10
3.2.1. Konkordanz und familiäre Assoziation	10
3.2.2. HLA-Antigene	11
3.2.3. Suszeptibilitätsgene	11
3.2.4. Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs)	12
3.3. Das Protein Adiponectin	14
3.3.1. Aufbau und Nomenklatur	14
3.3.2. Effekte des Adiponectin	15
3.4. Das Gen Adiponectin	17

3.4.1. Struktur des Gens	17
3.4.2. ADIPOQ als potentielles Suszeptibilitäts-gen für SSc	17
3.4.3. SNPs im Adiponectin-Gen	21
3.4.4. Der +45T>G SNP rs2241766	22
3.5. Aufgabenstellung	24
<b>4. Material, Methoden und Patienten</b>	<b>25</b>
4.1. DNA-Isolation	25
4.2. Bestimmung der DNA-Konzentration	27
4.3. Qualitative RealTime-Polymerase-Kettenreaktion	28
4.3.1. Prinzip der TaqMan RealTime PCR	28
4.3.2. Anwendung der TaqMan RealTime-PCR für SNP-Assays	29
4.4. Patienten und Kontrollen	33
4.4.1. Erlanger Kohorte	33
4.4.2. Französische Kohorte	33
4.5. Statistische Auswertung	34
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>35</b>
5.1. Erlanger Kohorte	35
5.1.1. Charakteristika der Kohorte	35

5.1.2. Grundlagen der SNP-Genotypisierung	38
5.1.3. Verteilung der Genotypen	40
5.1.4. Korrelation der Genotypen mit klinischen Parametern	42
5.1.5. Korrelation der Genotypen mit serologischen Parametern	47
5.2. Kohorte der Université Descartes, Paris	49
5.2.1. Charakteristika der Kohorte	49
5.2.2. Ergebnisse der Genotypisierung	50
5.2.3. Assoziation der Genotypen mit klinischen Parametern	53
5.2.4. Assoziation der Genotypen mit serologischen Parametern	57
5.3. Zusammenfassung beider Kohorten	59
5.3.1. Ergebnisse der Genotypisierung	59
5.3.2. Assoziation der Genotypen mit klinischen Parametern	61
5.3.3. Assoziation der Genotypen mit serologischen Parametern	65
<b>6. Diskussion</b>	<b>68</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>8. Abkürzungen</b>	<b>92</b>

<b>9. Danksagung</b>	<b>98</b>
<b>10. Lebenslauf</b>	<b>100</b>

# **1. Zusammenfassung**

## **1.1. Hintergrund und Ziele**

Die systemische Sklerose (SSc) ist eine Bindegewebserkrankung unbekannter Ursache, welche in ihrem klinischen Krankheitsbild stark variiert und deren pathogenetische Hauptmerkmale Entzündung, Vaskulopathie und Fibrose darstellen. Bisher wurden in genetischen Untersuchungen über 1.800 Suszeptibilitätsgene der SSc festgestellt, die zu einem beträchtlichen Teil über Analysen von Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNP) identifiziert wurden. Das Protein Adiponectin (ADIPOQ) wurde in ähnlicher Weise bisher meist im Zusammenhang mit Faktoren des metabolischen Syndroms untersucht und war damit assoziiert. Da es aber nachgewiesene Wirkung auf Entzündung, Fibrosierung und Vaskulopathie, also wichtigen Pathogenese-Faktoren der SSc, hat, wurde in dieser Arbeit der SNP +45T>G (rs2241766) im Exon 2 des ADIPOQ-Gens auf Korrelation mit Pathogenese und klinischer Manifestation der SSc hin untersucht. Unterschiede der auftretenden Genotypen GG, TG und TT bei SSc-Patienten und gesunden Kontrollpersonen könnten dabei auf erhöhte oder erniedrigte Suszeptibilität für SSc hinweisen.

## **1.2. Methoden**

In zwei voneinander unabhängigen Fall-Kontroll-Studien wurde genetisches Material von SSc Patienten und gesunden Kontrollpersonen mit Hilfe der Real-Time-Polymerasekettenreaktion (TaqMan-RealTime-PCR) durch allelische Diskrimination hinsichtlich der verschiedenen Genotypen analysiert. Dabei wurde DNA-Material aus Blut von 188 SSc-Patienten und 634 Kontrollen in der Erlanger Kohorte, sowie von 1.012 SSc-Patienten und 998 Kontrollen in der Kohorte der Université Descartes Paris isoliert und auf Assoziation mit SSc, dcSSc, fibrosierender Alveolitis, pulmonal-arterieller Hypertonie, digitalen Ulzerationen sowie ACA und Anti-Scl70-Antikörpern hin überprüft.



### **1.3. Ergebnisse und Beobachtungen**

In unserer Untersuchung war keiner der möglichen Genotypen GG, TG oder TT des SNP +45T>G im ADIPOQ-Gen signifikant mit der SSc, den klinischen Merkmalen dcSSc, fibrosierender Alveolitis, pulmonal-arterieller Hypertonie, digitalen Ulzerationen oder positivem Antikörper-Status bezüglich Anti-Scl70 und ACA assoziiert.

### **1.4. Praktische Schlussfolgerungen**

Unsere Analyse erbrachte keinen Zusammenhang zwischen SNP rs2241766 im Adiponectin-Gen und der SSc. Um abschließend den Einfluss von Adiponectin auf die Systemische Sklerose beurteilen zu können, sollten dennoch weitere Studien auf DNA-Ebene erfolgen, da es nicht ausgeschlossen ist, dass andere SNPs im ADIPOQ-Gen mit SSc assoziiert sind und gegebenenfalls zur veränderten Expression und Wirkung des Adiponectin beitragen.

## **2. Summary**

### **2.1. Objective**

Systemic Sclerosis is a connective tissue disease of unknown origin, which is quite variable in its clinical appearance and whose pathogenetic hallmarks are inflammation, vasculopathy and fibrosis. Former genetic studies revealed more than 1.800 genes with an increased susceptibility for SSc, which were mainly based on analysis of single-nucleotide-polymorphisms (SNP). The protein adiponectin (ADIPOQ) was analyzed similarly, but, thus far, more often its association to the metabolic syndrome was investigated and found to be significantly associated with it. Because of its proven effect to fibrosis, inflammation and vasculopathy, important factors of the pathogenesis of SSc, we studied the influence of SNP +45T>G in exon 2 of the ADIPOQ-gene to pathogenesis and clinical manifestation of SSc. Differences of frequencies for the investigated genotypes GG, TG and TT between SSc-patients and healthy controls could indicate an increased or lowered susceptibility for SSc.

### **2.2. Methods**

Genetic material of SSc-patients and healthy controls was analyzed in two independent case-control-studies by Real-Time-polymerase-chain-reaction (TaqMan-RealTime-PCR) and allelic discrimination for the different genotypes. Therefore, DNA from blood of 188 SSc-patients and 634 controls in the cohort of Erlangen plus 1.012 SSc-patients and 998 controls in the cohort of the Université Descartes Paris was isolated and tested for association with SSc, dcSSc, fibrosing alveolitis, pulmonary hypertension, digital ulcerations as well as ACA and Anti-Scl70-autoantibodies.

### **2.3. Results**

Our investigation failed to show a significant association of the possible genotypes GG, TG or TT in the SNP +45T>G with SSc, the clinical signs dcSSc, fibrosing alveolitis, pulmonary hypertension, digital ulcerations or ACA- and Anti-Scl70-antibody-status.

### **2.4. Conclusion**

Our analysis did not reveal any coherence between SNP rs2241766 in the ADIPOQ-gene and SSc. To finally evaluate the influence of adiponectin to SSc, further investigations based on SNP-analysis have to be performed, especially to find out if other polymorphisms in the ADIPOQ-gene are associated with SSc, which cannot be excluded so far.

## **3. Einleitung**

### **3.1. Überblick über die Sklerodermie**

#### **3.1.1. Epidemiologie und klinische Manifestation**

Der Begriff Sklerodermie leitet sich von den beiden griechischen Wörtern *skleros* (hart) und *derma* (Haut) ab. Die Bezeichnungen Sklerodermie ist dabei der Überbegriff für alle Formen der Erkrankung, die systemischen Formen mit spezifischen Auto-Antikörpern und potentieller Organbeteiligung werden hingegen Progressive Systemische Sklerose (PSS) oder Systemische Sklerose (SSc) genannt. Der Name beschreibt also die charakteristischen äußerlichen Veränderungen, nämlich Verdickung und Verhärtung der Haut, die jedoch mit verschiedenen zusätzlichen organischen Störungen einhergehen können, sodass Sklerodermie als Sammelbegriff für eine heterogene Gruppe von Ausprägungen einer Erkrankung mit ähnlichem Grundmuster gelten kann [11].

Die SSc gehört zusammen mit dem systemischen Lupus erythematoses (SLE), der Poly- / Dermatomyositis, dem Sjögren-Syndrom (SS) und dem Sharp-Syndrom zur Gruppe der Kollagenosen, also generalisierten Erkrankungen, die sich bevorzugt am Bindegewebe abspielen und ähnliche morphologische Veränderungen aufweisen.

Epidemiologische Studien weisen auf eine Häufigkeit der seltenen Krankheit von 50 bis 300 Fällen pro eine Million Einwohner hin. Die Prävalenz steigt im Allgemeinen sowohl durch frühere Diagnosestellung aufgrund sensitiverer Diagnosemethoden, als auch durch längere Lebenserwartung aufgrund effektiverer Therapieregime. Die Inzidenz erstreckt sich von 2,3 bis 22,8 Neuerkrankungen pro eine Million Einwohner pro Jahr [17]. Frauen haben ein 3- bis 5-fach höheres Risiko als Männer an der Sklerodermie zu erkranken, die bevorzugt zwischen dem dritten und fünften Lebensjahrzehnt auftritt. Ebenso gibt es Prädispositionen bei bestimmten ethnischen Gruppen, was sich in einer leicht erhöhten Prävalenz der Sklerodermie bei Schwarzen im Vergleich zu Weißen niederschlägt [93]. Die Diagnose kann klinisch nach den 1980 vom American

College of Rheumatology (ACR) festgelegten Kriterien gestellt werden, die allerdings weniger gut für die limitierte kutane Form und Frühformen der Sklerodermie geeignet sind [64]. Deshalb werden neben dem klinischen Erscheinungsbild zusätzlich auch die Nagelfalzkapillarmikroskopie, der Nachweis von Autoantikörpern und eine Hautbiopsie zur Diagnosestellung herangezogen, wodurch sich sowohl Sensitivität als auch Spezifität der Diagnostik signifikant erhöhen [69].

ACR-Kriterien der SSc	
<b>Hauptkriterium</b>	Sklerodermie proximal der Fingergrundgelenke
<b>Nebenkriterien</b>	grübchenförmige Narben oder Substanzverlust der distalen Fingerweichteile
	Osteophyten, keine Gelenkspaltverschmälerung oder Sklerose
	bilaterale basale Lungenfibrose
	Sklerodaktylie

*Tabelle 1: ACR-Kriterien (modifiziert nach [64]). Zur klinischen Diagnose der SSc müssen mindestens das Hauptkriterium und 2 Nebenkriterien erfüllt sein.*

Der Begriff Sklerodermie bezeichnet auf der einen Seite die lokalisierte Form, auch Morphea oder zirkumskripte Sklerodermie genannt, mit ausschließlicher Verdickung und Verhärtung von Cutis und Subcutis durch überschießende Kollagenablagerung ohne weitere Beteiligung innerer Organe.

Dem gegenüber steht die systemische Sklerodermie (SSc), die sich neben der Hautsymptomatik typischerweise auch durch Organbefall auszeichnet [93].

Die heute gebräuchlichste klinische Einteilung unterscheidet dabei weitergehend limitierte kutane systemische Sklerose (lcSSc) und diffuse kutane systemische Sklerose (dcSSc) entsprechend des Ausmaßes der Hautbeteiligung [59].

Die dcSSc ist charakterisiert durch Hautverdickungen proximal der Ellen- und Kniebeuge, wobei häufig auch Gesicht und Brust sowie Rücken, Bauch und die Flanken befallen sind. Dieser Subtyp ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert, da er häufig schnell progredient verläuft und mit Fibrosierung innerer Organe einhergeht.

Bei der lcSSc ist der Hautbefall auf Abschnitte distal der Ellen- und Kniebeuge beschränkt. Diese Entität der SSc schreitet langsamer voran, hat eine geringere Rate an Organbeteiligungen und im Allgemeinen eine bessere Prognose als die dcSSc. Die lcSSc entspricht klinisch weitgehend dem CREST-Syndrom, das sich durch das Auftreten von Calcinosis cutis, Raynaud-Syndrom, Ösophagusmotilitätsstörung, Sklerodaktylie und Teleangiektasien definiert [98]. Ein CREST-Syndrom kann aber in Einzelfällen auch mit der dcSSc vergesellschaftet sein.

Treten neben diesen für die SSc typischen Erscheinungen noch Symptome anderer Kollagenosen oder der Rheumatoiden Arthritis (RA) auf, so spricht man von einem Overlap-Syndrom [62].

Die kutanen Veränderungen durchlaufen bei der Sklerodermie drei Stadien: Zuerst ödematöse Schwellung, dann Induration und schließlich Atrophie. Je nach Stadium zeigen sich dann typische Hauterscheinungen wie geschwollene Hände (*puffy hands*), Raynaud-Syndrom mit Trikolore-Phänomen, Sklerodaktylie, Kontrakturen, Ulzerationen oder Gesichtsstarre mit Mikrostomie und Tabaksbeutelmund. Die Störungen beginnen dabei meist an den Akren und schreiten zentripetal fort.

Das klinische Bild bei Organbefall hängt vom betroffenen Organsystem ab.

Die Mitbeteiligung der Niere, insbesondere bei renaler Krise, zeigte sich früher verantwortlich für einen großen Teil der Fälle mit früher Mortalität, ist aber durch moderne Behandlungsmethoden mit ACE-Hemmern selten geworden [104].

Hingegen sind pulmonale Manifestationen, wie Lungenfibrose und pulmonal arterielle Hypertonie (PAH), derzeit die lebensbedrohlichsten Komplikationen der SSc. Im Gastrointestinaltrakt ist die Ösophagusstarre mit konsekutiver Reflux- und Dysphagie-Symptomatik weit verbreitet. Ebenso kann das Kolon betroffen sein, was Obstipation oder paradoxe Diarrhoen mit Malabsorption zur Folge haben kann [66].

Generell sind die genannten sekundären Organdysfunktionen aufgrund Fibrosierung von Organewebe die Hauptursache für Morbidität und Mortalität der Sklerodermie, weshalb neuartige anti-fibrotische Therapieansätze Gegenstand intensiver Forschung sind, in der Hoffnung die Gewebsfibrosierung aufzuhalten oder sogar umzukehren [16].

Befallenes Organ	Pathologisches Korrelat	Klinische Symptome
<b>Lunge</b>	Fibrosierende Alveolitis, Bihiläre Lungenfibrose, pulmonal arterielle Hypertonie	Dyspnoe
<b>Herz</b>	Myokardfibrose, Perikarditis	Herzinsuffizienz, Reizleitungsstörungen
<b>Gastrointestinaltrakt</b>	Ösophagusstarre, Darmwandfibrose	Reflux, Dysphagie, Obstipation
<b>Niere</b>	Mikroangiopathie	Hypertonie, Proteinurie, akutes Nierenversagen
<b>Bewegungsapparat</b>	Sehnenfibrosierung, Myositis, Arthritis	Kontrakturen, Bewegungseinschränkungen, Arthralgien
<b>Urogenitaltrakt</b>	Gefäß- / Gewebssklerosierung	Erektile Dysfunktion

*Tabelle 2: pathologische und klinische Befunde bei SSc in Abhängigkeit vom betroffenen Organsystem.*

### 3. Einleitung

### 3.1.2. Pathogenese und Histopathologie

Die Ätiologie der Sklerodermie ist noch weitgehend unbekannt. Einige Noxen, unter anderem Viren (CMV), Medikamente (Bleomycin), Vinylchlorid und Siliziumdioxid, können ähnliche klinische Symptome bedingen, wie sie auch bei der SSc auftreten [72]. Die meisten SSc-Fälle sind jedoch idiopathisch, also letztlich ohne beweisende Ursache für die Krankheitsentstehung.

Histopathologisches Korrelat der späteren Stadien der SSc ist eine verstärkte Ansammlung extrazellulärer Matrix (ECM), welche durch übermäßige Produktion von ECM-Bestandteilen, wie Kollagen Typ I, III, VI und VII, Proteoglykanen oder Fibrillin, durch aktivierte Fibroblasten verursacht wird und zur fortschreitenden Fibrosierung führt [19]. Zahlreiche Veröffentlichungen implizieren, dass profibrotischen Zytokinen und deren Rezeptoren, unter anderem TGF $\beta$  und PDGF, eine Schlüsselrolle in der Fibroblastenaktivierung zukommt [36], [82], [8]. Desweiteren zeigt sich an den Gefäßen eine perivaskuläre Entzündung mit multiplen Kapillarbettschäden und Th2-Zell-Infiltraten [65], Proliferation der Gefäßintima und -media sowie eine progrediente interstitielle und perivaskuläre Fibrose [1].

Als Hinweis auf eine immunpathologische Genese der SSc kann die strukturelle Ähnlichkeit zu Hautveränderungen bei chronischer *graft-versus-host-disease* (GVHD) gelten [6]. Diese These wird zudem durch das Auftreten von verschiedenen Auto-Antikörpern gestützt. So ist die dcSSc zu 30-40 % mit Anti-Scl70, Antikörpern gegen Topoisomerase 1, die lcSSc zu 70-80 % mit Anti-Centromer-Antikörpern (ACA) und die Sklerodermie allgemein zu 90 % mit Anti-nukleären-Antikörpern (ANA) assoziiert [34].

Insgesamt ist anzunehmen, dass eine Kombination von vaskulopathischen und autoimmunologisch-entzündlichen Prozessen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der Sklerodermie spielt.



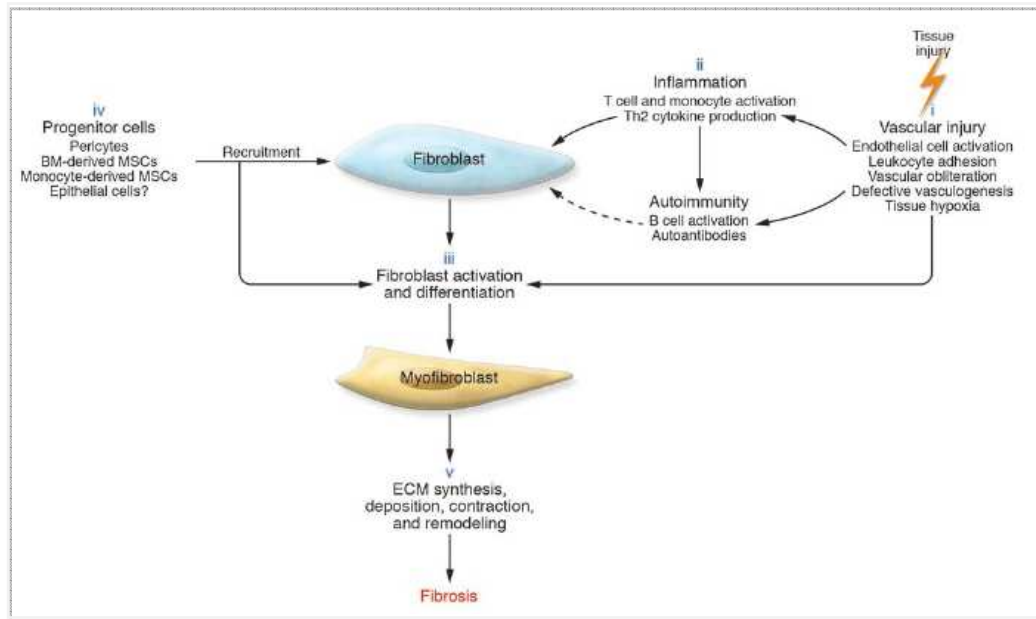


Abb. 1: Pathogenese der SSc (modifiziert nach [93]): Die Verflechtung von vaskulopathischen und immunologischen Ereignissen führt zu Fibrose. Die Pathogenese wird durch mikrovaskuläre Schäden eingeleitet (i), wodurch Entzündung und Autoimmunprozesse angeregt werden (ii). So wird direkt und indirekt die Fibroblasten-Aktivierung, das Schlüsselereignis der Fibrosierung, getriggert (iii). Die Zahl der Fibroblasten und ihrer Vorläuferzellen in betroffenen Geweben steigt dabei sowohl durch Einwandern von Fibrozyten, als auch durch Differenzierung aus mesenchymalen Stammzellen (MSC) (iv). Aktivierte Myofibroblasten bewirken im betroffenen Gewebe eine Reihe von Effekten, die schließlich zur Fibrose führen (v).

## 3.2. Genetische Faktoren bei SSc

### 3.2.1. Konkordanz und familiäre Assoziation

Zur Detektion genetisch bedingter Effekte auf die Pathogenese einer Krankheit eignen sich besonders Zwillings- oder familiäre Assoziationsstudien. Auch wenn einerseits solche Zwillingsstudien bei eineiigen und zweieiigen Zwillingen nur eine geringe Konkordanz (4,6 %) für die SSc ergaben [28], so tritt die Sklerodermie andererseits familiär (1,6 % aller SSc-Patienten haben Verwandte ersten Grades mit Sklerodermie) häufiger als in der Allgemeinbevölkerung (0,026

% Prävalenz) auf, sodass die familiäre Vorbelastung als der stärkste bisher identifizierte Risikofaktor für die Entwicklung der SSc gilt [4].

### 3.2.2. HLA-Antigene

Ein weiterer Anhaltspunkt für eine genetische Komponente in der Pathogenese der PSS besteht in der Korrelation verschiedener auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 vererbbarer MHC- oder HLA-Antigene mit bestimmten Formen der SSc. So treten z. B. HLA-DR5 und DQA1\*0501[57] vermehrt bei der dcSSc auf und die lcSSc ist oft mit dem Auftreten von HLA-DR1-, 4- und 8-Antigenen verknüpft. Die Haplotypen DRB1\*11 [61], DRB1\*1104, DQA1\*0501 und DQB1\*0301 [5] sind mit beiden Formen der PSS assoziiert. Demgegenüber sind unter anderem die Antigene DRB1\*0701, DQA1\*0201, DQB1\*0202 und DRB1\*1501 negativ mit der SSc korreliert und wirken somit möglicherweise protektiv und damit der Krankheitsentstehung entgegen [5]. Meistens sind die verschiedenen HLA-Antigene dabei stärker mit dem Auftreten gewisser Auto-Antikörper assoziiert, als mit bestimmten klinischen Entitäten der SSc selbst [3]. Die die HLA-Gene enthaltenden Loci auf Chromosom 6 können daher als Suszeptilitätsregionen für die SSc angesehen werden.

### 3.2.3. Suszeptibilitätsgene

Suszeptibilitätsgene sind Gene, die eine gesteigerte Empfänglichkeit eines Individuums für die Ausbildung einer bestimmten Erkrankung bedingen. Die vielversprechendsten Suszeptibilitäts- oder Kandidatengene der Sklerodermie sind solche, die in Signalwege involviert sind, die zu Gefäßschäden und Fibrosierung, also den Hauptmerkmalen der SSc, führen können. Bisher wurde nur eine genomweite Assoziationsstudie für die Sklerodermie veröffentlicht, in der insgesamt 17 Regionen auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert wurden, die signifikant mit dem Auftreten der SSc assoziiert sind und folglich als

Kandidatengen-beinhaltend eingestuft wurden. Darunter finden sich unter anderem die Gene für SPARC, MHC, FBN1 und TOPO1, also solche Gene, die durch ihre Genprodukte profibrotische oder autoimmunologische Prozesse modulieren [105].

Durch Erstellung von Genprofilen aus SSc-Hautbiopsien identifizierte man zudem Veränderungen in der Expression bei etwa 1.800 Genen in SSc-Haut im Vergleich zu normaler Haut [35].

Wie anhand dieser großen Zahl bereits identifizierter Kandidatengene zu vermuten ist, liegt also auch bei der SSc, wie bei vielen anderen Autoimmunkrankheiten, eine komplexe Erkrankung vor, in der mehrere genetische Loci zu Suszeptibilität und phänotypischer Expression beitragen [97].

#### 3.2.4. Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs)

Genetische Studien an großen Kollektiven sind aufgrund der niedrigen Prävalenz, der klinischen Heterogenität und der ungewöhnlichen familiären Häufung der SSc schwierig [105]. Um dennoch vorhin beschriebene Kandidatengene der komplexen, multigenetischen Erkrankung zu überprüfen, eignet es sich neben Mikrosatelliten-DNA-Untersuchungen besonders SNP-Analysen des vermutlich involvierten Gens durchzuführen [67].

Der Begriff des Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (*single nucleotide polymorphism, SNP*) bezeichnet die am weitesten verbreitete Form einer genetischen Variation und ist per definitionem die Position eines einzelnen Basenpaares der genomischen DNA, von dem verschiedene Allelvariationen häufiger als 1 % vorkommen [12]. Ein Individuum wird als heterozygot bezeichnet, wenn die zwei Allele an einem Genlocus verschieden, und als homozygot, wenn beide Allele identisch sind. SNPs können in der codierenden Sequenz (CDS) eines Gens liegen und sich als non- / missense-Mutation auf die Aminosäure-Folge des Genprodukts auswirken oder, als stille Mutation, diese unbeeinflusst lassen. Liegt ein SNP in nicht-codierenden Bereichen, z.B. in

Introns, so kann auch dies Konsequenzen für das Splicing von Genen oder die Bindung von Transkriptionsfaktoren haben. Phänotypische Unterschiede von verschiedenen, nicht verwandten Individuen sind meist auf solche genetische Variationen zurückzuführen. Im humanen Genom wurden bisher über 3 Millionen SNPs identifiziert, mit der Tendenz durch intensive Forschung diese Anzahl künftig noch deutlich steigern zu können [30].

Dieser Trend zeigt sich auch in der steigenden Zahl an SNPs, die Bezug zur SSc haben, sei es durch Effekte auf klinische Merkmale, auf autoimmun-entzündliche Prozesse oder auf den Antikörper-Status. Solche SNPs weisen folglich auf neue Suszeptibilitätsgene der Sklerodermie hin oder verifizieren bereits erforschte Kandidatengene. Eine Auswahl einiger SSc-assoziiierter SNPs gibt Abbildung 4.

SNP	Gen/Protein	Referenz
<b>-945G&gt;C (rs6918698)</b>	Promotor von CTGF	[29]
<b>+49T&gt;C (rs16961068)</b>	Intron C von FBN1	[89]
<b>+274-23582G&gt;T (rs7574865)</b>	Intron 3 von STAT 4	[21]
<b>+1147G&gt;A (rs3733197)</b>	Exon 7 von BANK 1	[22]
<b>-13+3G&gt;T (rs2004640)</b>	Intron 1 von IRF 5	[23]
<b>+1858C&gt;T (rs2476601)</b>	PTPN 22	[37]
<b>+774-1838A&gt;G (rs12434438)</b>	Intron von HIF1A	[94]
<b>g.665573A&gt;G (rs638376)</b>	Intron von IL13RA2	[39]
<b>+990-22C&gt;T (rs11650354)</b>	Intron von TBX21	[38]

*Tabelle 3: Auswahl einiger signifikant mit SSc assoziierter SNPs und entsprechender Suszeptibilitätsgene.*

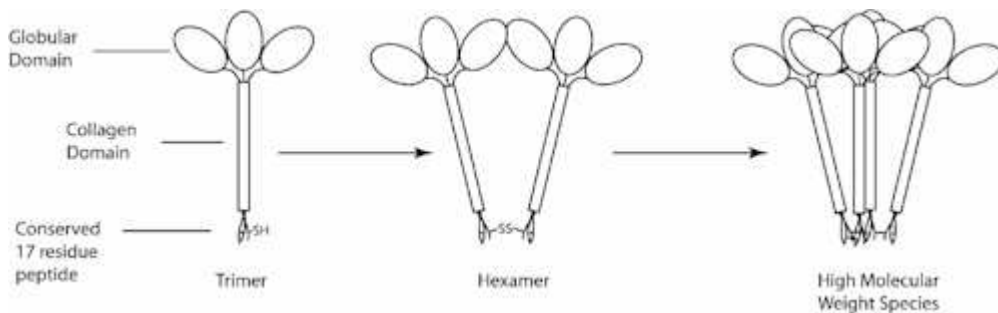
### 3. Einleitung

### 3.3. Das Protein Adiponectin

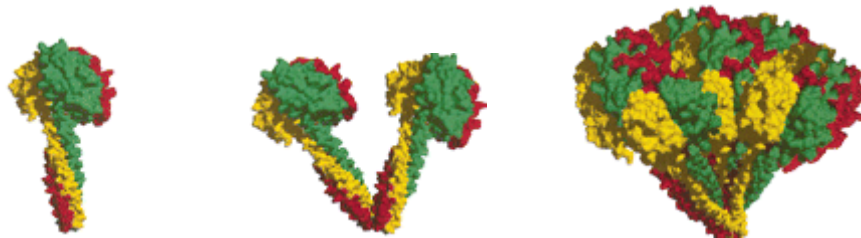
#### 3.3.1. Aufbau und Nomenklatur

Das 1995 entdeckte Protein Adiponectin besteht aus einer Kette von 244 Aminosäuren, wird vorwiegend von Adipozyten synthetisiert [77] und gehört mit Leptin, Resistin und anderen Mediatoren zur Gruppe der Adipokine, den vorwiegend von Fettgewebszellen gebildeten Zytokinen. Das Protein mit einem Molekulargewicht von 30 kD weist einen Plasmaspiegel von 5-15 µg/ml auf und ist damit eines der Plasmaproteine mit der höchsten Konzentration im Blut. Geläufige Abkürzungen sind ADPN und ADIPOQ (*Adiponectin*) [46], APM1 (*adipose most abundant gene transcript 1*) [63] und GBP28 (*gelatin-binding protein of 28 kD*) [70]. Die alternativen Bezeichnungen ACDC (*adipocyte, C1Q and collagen domain-containing protein*) und ACRP30 (*adipocyte complement-related protein of 30 kD*) tragen der Homologie des Adiponectins zu Kollagen VIII, X und zum Komplementfaktor C1q Rechnung [77]. Das Protein hat amino-terminal eine Kollagen-ähnliche und carboxy-terminal eine globuläre Domäne. Letztgenannte ist dafür verantwortlich, dass sich mehrere Adiponectin-Monomere über Disulfid-Brückenbindungen zu Tri-, Hexa- und Multimeren mit hohem Molekulargewicht (HMW) zusammenlagern können, wobei bislang noch unklar geblieben ist, welche Form die biologisch aktivste ist. Vieles deutet auf das Multimer hin [96].

A



B



C

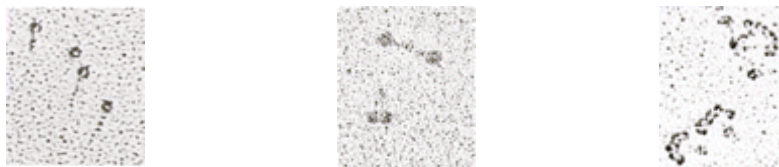


Abb. 2 (modifiziert nach [91] und [78]): schematische (A), dreidimensionale (B) und elektronenmikroskopische (C) Darstellung der verschiedenen Adiponectin-Formen. Das Trimer besteht aus drei Adiponectin-Monomeren und ist Grundbaustein der Hexa- und Multimere, die über Disulfid-Brücken (SS) miteinander verbunden sind.

### 3.3.2. Effekte des Adiponectin

Die Wirkung des als Hormon einzustufenden ADIPOQ entfaltet sich durch Bindung an zwei 7-TM-Rezeptoren, AdipoR1 überwiegend in Myozyten und AdipoR2 in Hepatozyten. Diese beiden Rezeptoren tragen im Gegensatz zu allen anderen G-Protein gekoppelten 7-TM-Rezeptoren ihren Amino-Terminus

intrazellulär und den Carboxy-Terminus extrazellulär [102]. Zudem stellt T-Cadherin eine Art Co-Rezeptor an glatten Muskel- und Endothelzellen dar und ist damit als dritter Rezeptor-Typ anzusehen [47]. Intrazellulär wird nach Bindung an die Rezeptoren eine Signalkaskade über eine AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK), die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38 MAPK) oder die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren  $\alpha$  und  $\gamma$  (PPAR $\alpha/\gamma$ ) ausgelöst und über weitere Schritte der zelluläre Effekt des Adiponectins vermittelt [102], [101]. Hauptwirkorte des Adiponectins sind der Skelettmuskel und die Leber: In der Muskulatur wird sowohl die Glucoseaufnahme aus dem Blut, als auch der Fettsäureabbau gesteigert [31]. Hepatisch wird ebenfalls die Fettsäure-Oxidation induziert und gleichzeitig die Gluconeogenese gedrosselt [18]. Die Wirkungen sind daher als Insulin-ähnlich oder -unterstützend anzusehen. Zudem hat Adiponectin auch Einfluss auf Entzündungsprozesse, wovon später im Rahmen der Suszeptibilität für SSc noch zu sprechen sein wird.

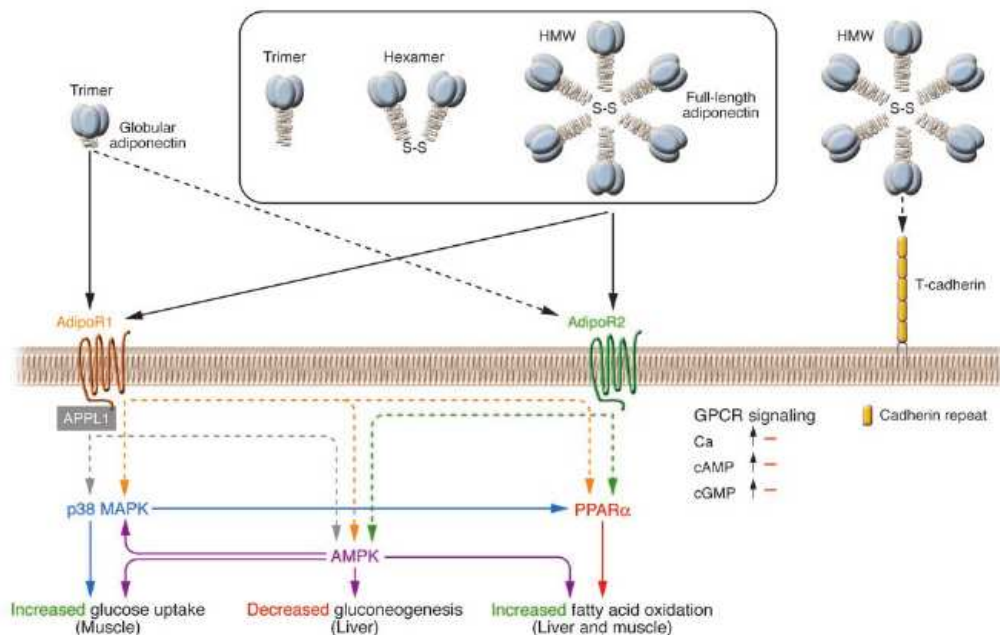


Abb. 3 (modifiziert nach [50]): Verschiedene Formen des Adiponectins können an AdipoR1, AdipoR2 oder an T-Cadherin binden und intrazellulär Signalkaskaden über AMPK, p38 MAPK oder PPAR $\alpha$  auslösen, die zu diversen Effekten in den Erfolgsorganen führen.

### 3. Einleitung

Klinisch bedeutsame Auswirkungen hat besonders die Hypoadiponectinämie im Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom: Übergewicht [2], Typ 2 Diabetes mellitus mit erhöhter Insulinresistenz [45] und koronare Herzkrankheit durch vaskuläre Atherosklerose [55] korrelieren signifikant negativ mit der Höhe des Adiponectin-Spiegels. Weiterhin zeigen sich Assoziationen mit Hyperlipidämie [100] und Hypertonie [48]. Dementsprechend werden hohen Plasmaspiegeln protektive Eigenschaften gegen das metabolische Syndrom und besonders gegen den Typ2 Diabetes via Insulin-Sensitivierung peripherer Gewebe zugesprochen [84]. Bezüglich der Leber gilt die Hypoadiponectinämie als unabhängiger Risikofaktor der nicht-alkoholischen Steatosis hepatis (NASH) und der Leberfibrose [49]<sup>[61]</sup> und auch einige Tumorarten, darunter Colon-, Magen-, Mamma- und Endometrium-Karzinome, sind signifikant mit erniedrigten ADIPOQ-Spiegeln assoziiert [51].

### **3.4. Das Gen Adiponectin**

#### 3.4.1. Struktur des Gens

Das Adiponectin-Gen erstreckt sich über eine Länge von ca. 17 kb auf dem langen Arm von Chromosom 3 im Locus 3q27 und beinhaltet 3 Exons und 2 Introns [87]. 4592 Basen werden in prä-mRNA transkribiert, die codierende Sequenz besteht letztendlich aus 734 Basen, über den genetischen Triplet-Code in der Translation die 244 Aminosäuren lange Peptidkette des Adiponectin-Proteins ergebend.

#### 3.4.2. ADIPOQ als potentiell Suszeptibilitäts-gen für SSc

Dass es sich bei ADIPOQ um ein mögliches Suszeptibilitäts-gen der SSc handelt ist aus mehreren Gründen anzunehmen und damit erforschenswert, denn neben den bereits beschriebenen Hauptwirkungen an Muskulatur und Leber werden durch ADIPOQ auch (autoimmun-)entzündliche Prozesse beeinflusst.



Zunächst wurden Adiponectin anti-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben, was sich in der Induktion der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-1-RA [49], der anti-entzündlichen Wirkung auf Endothelzellen [72] und Makrophagen [103], sowie im Beitrag zur Clearance apoptotischer Zellen aufgrund struktureller Verwandtschaft zum Komplementfaktor und Opsonin C1q äußert [88]. Mangelnde Clearance apoptotischer Zellen kann über Freisetzung von Entzündungsmediatoren zu Inflammation und verstärkter Bildung von Auto-Antikörpern führen [75]. Solche Autoimmun- und Entzündungsprozesse sind auch pathologische Merkmale der SSc. Am Endothel wirkt Adiponectin proangiogen [81] sowie antiapoptotisch [53] und damit potenziell der defekten Angiogenese [56] und vermehrten Apoptose von Endothelzellen [79] bei der Sklerodermie entgegen. Die SSc ist hinsichtlich der Gefäße zudem durch Intima- und Mediaproliferation gekennzeichnet [1], Ereignisse, die auch bei Adiponectin-Knockout-Mäusen in Folge vaskulärer Schäden nachzuweisen sind [54]. Diese Beobachtungen lassen auf eine protektive Wirkung von Adiponectin gegenüber pathogenetischen Faktoren der SSc schließen. Zudem stellte man fest, dass die Regulation des Adiponectin-Plasmaspiegels außer über die Sekretionsmenge und die Multimerisation des Adiponectins auch über Veränderungen der Genexpression des ADIPOQ-Gens erfolgen kann, und diese durch chronische Entzündung mit Makrophageninfiltration, inflammatorische Zytokine oder erhöhten oxydativen Stress durch reaktive O<sub>2</sub>-Spezies gehemmt wird [13], [14], [32]. Diese pathogenetisch bedeutsamen Befunde wurden in Studien bezüglich der Hypoadiponectinämie bei Adipositas und beim metabolischen Syndrom erhoben, lassen sich aber ebenso in der Pathogenese der Fibrose bei SSc feststellen [34].

Andererseits wurden zuletzt außer den anti-inflammatorischen auch pro-inflammatorische Effekte des Adiponectins beschrieben, weshalb die rein protektive Wirkung des ADIPOQ angezweifelt werden kann. So ist anzunehmen, dass es sich bei ADIPOQ um ein Kandidatengen mit pro-inflammatorischer Wirkung handelt, da bei diversen Autoimmunkrankheiten, unter anderem SLE [20] und RA [26], erhöhte Adiponectin-Spiegel festgestellt wurden, und bei der Kollagenose SSc Autoimmunprozesse ebenfalls eine entscheidende Rolle in der

Pathogenese spielen [93]. Die strukturelle Verwandtschaft des ADIPOQ mit Komplementfaktor C1q und dem Entzündungsmediator TNF $\alpha$  innerhalb der C1q-TNF-Superfamilie, deren Mitglieder von einem gemeinsamen Vorläufer-Molekül abstammen sollen und denen eine gemeinsame pro-inflammatorische Funktion zugeschrieben wird, legt zusätzlich nahe, dass durch ACRP30 Entzündungsprozesse unterstützt werden [80], auch wenn der Einfluss von TNF $\alpha$  auf die Sklerodermie noch unklar ist [24]. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Synthese von Adiponectin nicht, wie lange Zeit angenommen, auf Fettzellen beschränkt ist [77], sondern auch Osteoblasten [9] und Fibroblasten in Haut und Synovia [26] dieses Protein bilden können. Besonders die ADIPOQ-Bildung durch Fibroblasten, die sich zudem aus Adipozyten entdifferenzieren können [86], scheint hinsichtlich der SSc von großer Bedeutung, da die Überaktivierung der Kollagen- und Zytokinsynthese in diesen Zellen die wichtigste Einflussgröße in der Pathogenese darstellt [93]. Eines dieser Zytokine, TGF $\beta$ , ein überexprimiertes Schlüsselmolekül im Fibrosierungsprozess bei SSc, das die Kollagen- und Proteoglykan-Synthese in Fibroblasten steigert, kann in diesem Effekt von PPAR-Agonisten wie den Thiazolidindionen gehemmt werden [74]. Da Adiponectin intrazellulär ebenfalls als Agonist am PPAR-Pathway seine Wirkung erzielt, lässt sich eine zusätzliche antifibrotische Komponente im Wirkspektrum des ADIPOQ vermuten. Zudem konnte gezeigt werden, dass TGF $\beta$  über gesteigerte Expression von CTGF, die auch bei SSc nachgewiesen ist [83], ein Absinken der Fettzell-Reifemarker PPAR $\gamma$  und Adiponectin und damit eine Hemmung der Adipozytenreifung bedingt [90]. Das CTGF-Gen wurde nach Ergebnissen neuester Studien aufgrund mehrerer mit SSc assoziierter SNPs und der bereits erwiesenen Beteiligung an der Pathogenese der Erkrankung ebenfalls zum Kandidatengenen für die Systemische Sklerose erklärt [29], [40]. Der profibrotische Effekt von TGF $\beta$  mag also zu gewissem Teil auch durch Verminderung der antifibrotischen Wirkung von ADIPOQ gefördert werden.

Eine neue Studie, in der in vivo und in vitro der Einfluss von Adiponectin speziell auf die SSc untersucht wurde, weist darauf hin, dass Adiponectin durch Steigerung der Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen wie MCP1

Entzündungsprozesse unterstützt [25]. Diese Theorie wird außerdem dadurch gestützt, dass bei ADIPOQ-Knockout-Mäusen mit Bleomycin induzierter Hautfibrose weniger Inflammation zu beobachten ist als bei ADIPOQ-suffizienten Tieren. Hinsichtlich der Fibrosierung bei SSc ergaben sich auch in dieser Untersuchung Ergebnisse, die eine differentielle Betrachtung nötig machen. So induziert ADIPOQ einerseits die Synthese der Enzyme MMP1/3, die Bestandteile der extrazellulären Matrix degradieren und somit Einfluss auf Akkumulation von ECM-Proteinen nehmen können. Zudem wird die Bildung der Kollagene 1A2 und 14 gehemmt, was zusammen an eine protektive antifibrotische Wirkung bei Sklerodermie denken lässt. Andererseits ist von allen Adipokinen nur die Adiponectin-Expression sowohl auf Gen-, als auch auf Protein-Ebene in SSc-Haut und Fibroblasten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht, und das obwohl die Menge an subkutanem Fettgewebe, das den Hauptteil der ADIPOQ-Sekretion übernimmt, deutlich reduziert ist. Da außerdem bei ADIPOQ-Knockout-Mäusen durch Radiatio nur geringere Schweregrade der Lungenfibrose auszulösen waren, lassen diese Ergebnisse eher auf profibrotische Eigenschaften des Adiponectins schlussfolgern. Zusammengefasst ergaben sich in dieser Untersuchung einerseits direkte Effekte des Adiponectins auf Fibroblasten, die zu einer Steigerung der Kollagensynthese führen, andererseits aber auch antiinflammatorische Eigenschaften, die der sekundären Fibroblastenaktivierung durch Entzündungszellen entgegenwirken. Somit scheint Adiponectin in frühen entzündungsabhängigen Stadien durch Hemmung der Effekte von Entzündungszellen antifibrotische Wirkung zu besitzen, dagegen in späteren, nicht-entzündlichen Stadien profibrotisch zu wirken. Die Ergebnisse dieser Studie deuten daher darauf hin, dass dieses Protein eine wichtige, wenn auch noch nicht abschließend geklärte Rolle in der Interaktion zwischen Haut- und Fettgewebe einnimmt und damit auch in der Pathogenese der SSc. Über Veränderungen der Adiponectin-Konzentration könnte man in diesen Regelkreis eingreifen und damit womöglich ein vielversprechendes Ziel neuer Behandlungsmethoden in der Therapie der SSc anvisieren [25].

### 3.4.3. SNPs im Adiponectin-Gen

Bisher sind gemäß der HapMap-Datenbank schon weit über 100 Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) im Adiponectin-Gen festgestellt worden, von denen etwa 5 % in kodierenden Regionen liegen und somit in funktionellen Änderungen der Proteinstruktur resultieren ([http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap3r2\\_B36/?name=Sequence:NM\\_004797](http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap3r2_B36/?name=Sequence:NM_004797)). Die meisten davon wurden hinsichtlich ihrer Assoziation mit Symptomen des metabolischen Syndroms oder mit der Höhe des Adiponectin-Spiegels im Plasma untersucht, von denen einige beispielhaft erläutert werden sollen.

Zunächst sind SNPs zu nennen, die durch Basenaustausch in der codierenden Sequenz zu einer Missense-Mutation mit veränderter Peptidkette führen. Dabei können Mutationen in der Kollagen-ähnlichen Domäne (z.B. Gly90Ser und Tyr111His) gestörte Multimer-Bildung und damit eine funktionelle Hypoadiponectinämie auslösen. Ebenso kann es durch eine veränderte Aminosäuresequenz und Tertiärstruktur zu einer Störung in der Proteinsekretion kommen (z.B. Arg112Cys) [95]. Auch Einzelnukleotid-Polymorphismen in der Promotor-Region des ADIPOQ-Gens können durch Veränderungen an der Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren oder andere DNA-bindende Proteine Einfluss auf die Genexpression nehmen und damit zu Hypo- oder Hyperadiponectinämie führen (z.B. rs17300539 und rs266729) [58]. SNPs in Introns (z.B. rs1501299) üben Einfluss auf die Menge des synthetisierten Proteins aus, indem sie Splicing-Regionen verändern oder die prä-mRNA destabilisieren und so verringerte mRNA-Kopien resultieren, die dann zu verminderter Protein-Translation beitragen [85].

In der Literatur finden sich oft differenziert zu betrachtende Angaben, was die Assoziation verschiedener SNPs mit ADIPOQ-Spiegel oder Krankheitssymptomen anbelangt. Dies mag unterschiedliche Ursachen haben, unter anderem zu geringe Probandenzahlen oder Untersuchungen in verschiedenen ethnischen Gruppen [43]. Tabelle 4 zeigt einige analysierte Polymorphismen im ADIPOQ-Gen.

SNP	Lokalisation	AS-Austausch	Assoziation
<b>+45T&gt;G</b> (rs2241766)	Exon 2	Gly15Gly	Typ 2 Diabetes [42] Übergewicht [85] KHK [15] Hypoadiponectinämie [87] Hyperadiponectinämie [43], [94]
<b>+331T&gt;C</b> (rs17366743)	Exon 3	Tyr111His	Typ 2 Diabetes[44], [94] Hypoadiponectinämie [94] Hyperadiponectinämie [43]
<b>+268G&gt;A</b> (rs62625753)	Exon 3	Gly90Ser	Typ 2 Diabetes [94] Hypoadiponectinämie [94]
<b>-11.391G&gt;A</b> (rs17300539)	Promotor	-	Typ 2 Diabetes [94] Hyperadiponectinämie [43], [94] Hypoadiponectinämie [94]
<b>-11.377C&gt;G</b> (rs266729)	Promotor	-	Typ 2 Diabetes [44], [94] Hypoadiponectinämie [94] Übergewicht [73]
<b>+276G&gt;T</b> (rs1501299)	Intron 2	-	Typ 2 Diabetes [42] Hypoadiponectinämie [42], [94]

Tabelle 4: Charakteristika und klinische Assoziation einiger SNPs im ADIPOQ-Gen.

#### 3.4.4. Der SNP +45T>G (rs2241766)

Beim SNP rs2241766 handelt es sich um eine stille Mutation von Thymin (T) zu Guanin (G) an Basenposition 45 in Exon 2 der CDS des ADIPOQ-Gens, da dadurch weiterhin Glycin an 15. Position der Aminosäurekette des Proteins bestehen bleibt (Gly15Gly).

Zunächst war das seltenere G-Allel, das mit einer Minor-Allel-Frequenz von etwa 25 % in der Bevölkerung auftritt, mit niedrigerem ADIPOQ-Level als bei T-Allel-

Trägern korreliert [87]. Nachfolgende Studien ergaben im Gegensatz dazu Assoziationen des SNP mit erhöhten ADIPOQ-Spiegeln [43], [94], aber auch Resultate, die der T>G Mutation jegliche Korrelation mit Hypo-, Hyperadiponectinämie oder dem metabolischen Syndroms absprechen [73], [76]. In vaskulärer Hinsicht wurden für den SNP rs2241766 neuerdings auch schwache protektive Eigenschaften gegenüber koronarer Herzkrankheit (KHK), Dyslipidämie und arterieller Hypertonie nachgewiesen [10], [15], [33].

Es ist jedoch noch unklar, wie die stille Mutation rs2241766 zu Veränderungen im Adiponectin-Spiegel oder klinisch bemerkbaren Symptomen führen kann. Einige Theorien erklären diesen Sachverhalt durch Bestehen eines *linkage disequilibrium* (LD) zu anderen SNPs. Durch gehäuftes, nicht unabhängiges Auftreten zusammen mit einem anderen noch nicht identifizierten, aber funktionell relevanten SNP kann dabei eine stille Mutation indirekt doch Einfluss auf das Gen nehmen. Solche SNPs liegen beispielsweise in der Promotor-Region oder in Introns und beeinflussen über Veränderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren oder des Splicings die Genexpression [85]. Ein Anhaltspunkt dafür ist das gemeinsame Auftreten der SNPs rs1501299, rs266729 oder rs17300539 mit dem SNP rs2241766, der dadurch signifikant höhere Assoziation zu Veränderungen im ADIPOQ-Plasmaspiegel und Typ 2 Diabetes bekommt [42], [94].

Da aber auch bei diesem Einzelnukleotid-Polymorphismus widersprüchliche Angaben hinsichtlich der Assoziation mit Adiponectin-Spiegeln oder Faktoren des metabolischen Syndroms bestehen, sollten weitere Analysen zur Bestätigung oder Widerlegung der beschriebenen Auswirkungen durchgeführt werden.

Zusätzliche Studien sind zudem nötig um die Auswirkungen der Mutation 45T>G oder anderer Polymorphismen auf die Sklerodermie zu erforschen. Da das Adiponectin-Gen durch seinen Einfluss auf (autoimmun-)entzündliche Prozesse und die Fibrosierung als Suszeptibilitätsgen der SSc angesehen werden kann, könnten aus solchen SNP-Analysen wichtige Erkenntnisse bezüglich der Folgen veränderter Adiponectin-Spiegel auf Pathogenese und klinische Manifestation der Sklerodermie gewonnen werden.

### 3.5. Aufgabenstellung

In dieser Dissertation wird der Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) 45T>G (rs2241766) in der kodierenden Sequenz (CDS) des Adiponectin-Gens in Bezug auf die Systemische Sklerose analysiert.

Adiponectin wurde dafür als Gen-Locus ausgewählt, weil sein Genprodukt Entzündungs- und Fibrosierungsprozesse, wie sie bei der Sklerodermie zu beobachten sind, beeinflusst. Dabei werden intrazellulär zum Teil die gleichen Signalkaskaden durchlaufen, die im Laufe der Pathogenese der SSc dereguliert sind und damit eine wichtige Rolle spielen. ADIPOQ ist also ein potentielles Kandidaten-Gen dieser Erkrankung. Im Exon 2 dieses Gens findet sich der SNP 45T>G, der in mehreren Studien bereits mit Hypo- oder Hyperadiponectinämie und dem metabolischen Syndrom korreliert war, über veränderte Regulation des Expressionslevels des ADIPOQ-Gens möglicherweise auch bei SSc-Patienten pathogenetisch von Bedeutung sein kann und weitergehend untersucht werden muss.

Zu diesem Zweck soll in zwei verschiedenen Fall-Kontroll-Studien, mit SSc-Patienten als Untersuchungsgruppe und gesunden Probanden als Kontrollpopulation, die Häufigkeit der bestimmten Genotypen, also GG, GT oder TT, bei Erkrankten und nicht Betroffenen ermittelt werden. Auftretende Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung könnten dabei auf eine erhöhte oder erniedrigte Suszeptibilität für SSc hindeuten.

In einem zweiten Schritt wird überprüft, ob bestimmte Genotypen eine signifikante Assoziation zu ausgewählten klinischen Symptomen der Erkrankung oder serologischen Befunden, wie dem Antikörper-Status, bei SSc-Patienten aufweisen.

## 4. Material, Methoden und Patienten

### 4.1. DNA-Isolation

Zur Gewinnung von DNA aus humanen Leukozyten wurden in EDTA-Monovetten<sup>®</sup> (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) abgenommene Vollblutproben mit dem Extraktionssystem NucleoSpin<sup>®</sup> Blood (Macherey-Nagel, Dühren, Deutschland) gemäß der Herstellerangaben behandelt.

Prinzipiell wird dabei die nötige Zelllyse durch Zugabe einer Proteinase K/SDS-Lösung und chaotroper Salze erreicht. Durch Hinzufügen von Ethanol zum Lysat wird die Bindung der freigesetzten DNA an eine Silikagelmembran ermöglicht. In der Folge werden potentielle Verunreinigungen durch mehrere Waschpuffer entfernt, sodass am Ende des Prozesses mit einem schwach alkalischen Puffer hochreine genomische DNA gewonnen werden kann.

Die einzelnen Isolationschritte sind im Folgenden beschrieben:

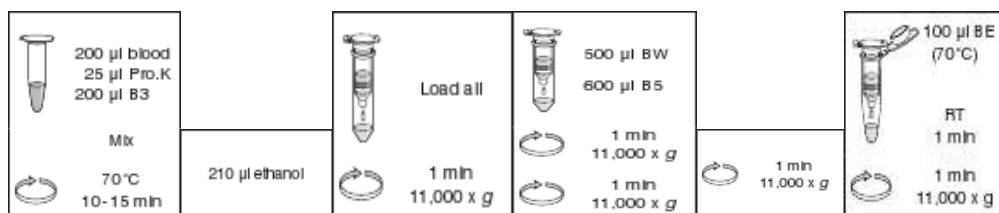


Abb. 4: schematische Darstellung der aufeinanderfolgenden Schritte der DNA-Extraktion (modifiziert nach User Manual NucleoSpin<sup>®</sup> Blood, Macherey-Nagel)



### *1. Lyse der Blutzellen*

Zu 200 µl EDTA-Blut werden 25 µl Proteinase K und 200 µl Puffer B3 in einen 1,5 ml Eppendorf-Cup (Greiner, Nürtingen, Deutschland) addiert und gut vermischt. Anschließend inkubiert man das Lysat für 10 – 15 Minuten bei 70°C.

### *2. Erstellen eines DNA bindenden Milieus*

Zu den Proben wird jeweils 210 µl Ethanol (96 – 100%) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) beigemengt und wiederum gut gemischt.

### *3. DNA-Bindung*

Jeder Ansatz wird in einen NucleoSpin® Blood Cup pipettiert und dieser in ein Sammelröhrchen eingesetzt.

Nach Zentrifugieren bei 11.000 x g für 1 Minute wird der abgetrennte Überstand verworfen. Die freigesetzte DNA ist nun an die Silikagelmembran gebunden.

### *4. Erstes Waschen der Silikagelmembran*

Zugabe von 500 µl BW Puffer zum Lysat und erneutes Zentrifugieren für 1 Minute bei 11.000 x g. Danach kann der Überstand erneut verworfen werden.

### *5. Zweites Waschen der Silikagelmembran*

Zugabe von 600 µl B5 Puffer. Den bei 11.000 x g für 1 Minute abzentrifugierten Durchfluss wiederum beseitigen.

### *6. Trocknen der Silikagelmembran*

Zentrifugation des Cups für 1 Minute bei 11.000 x g entfernt überschüssiges Ethanol.

### *7. Elution der hochreinen DNA*

Der NucleoSpin<sup>®</sup> Blood Cup wird in einen neuen Mikrozentrifugen-Cup eingesetzt. Anschließend fügt man 100 µl des auf 70°C vorgewärmten Elutionspuffers BE hinzu und inkubiert das Gemisch für 1 Minute bei Raumtemperatur. Zuletzt erfolgt noch ein abschließender - wie alle vorangegangenen - mit der Zentrifuge 5417 R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführter Zentrifugationsschritt bei 11.000 x g für 1 Minute. Im Mikrozentrifugen-Cup liegt nun eine Lösung hochreiner genomischer DNA vor. Die gewonnene DNA wurde bis zur weiteren Analyse bei - 20°C aufbewahrt.

## **4.2. Bestimmung der DNA-Konzentration**

Anschließend wurde die Konzentration der isolierten genomischen DNA bestimmt.

Dafür wurde eine Messung der optischen Dichte mit dem BioPhotometer plus (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die DNA wird dabei mit dH<sub>2</sub>O im Mischungsverhältnis 95 µl dH<sub>2</sub>O zu 5 µl DNA-Probe zum Gesamtvolumen von 100 µl verdünnt und in passenden UVetten<sup>®</sup> (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in das Photometer eingesetzt. Nachdem ein Bezugsleerwert mit reinem dH<sub>2</sub>O im Strahlengang erhoben wurde, wird nach Einstellung am Gerät der Gehalt an dsDNA in µg/ml in den Proben bestimmt. Dies geschieht im UV-Bereich am Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm und bei 280 nm Wellenlänge durch Analyse der Absorptionen  $A_{260}$  und  $A_{280}$  des Lichtstrahles beim Durchlaufen der Probe. Eine  $A_{260}$  von 1 entspricht dabei im Allgemeinen bei reiner DNA einer Konzentration von 50 µg/ml. Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  zeigt zudem den Reinheitsgrad der DNA an und sollte bei von Verunreinigungen freien Proben im Intervall 1,6 – 1,8 liegen.

### **4.3. Qualitative RealTime-Polymerase-Kettenreaktion (qRealTime-PCR / TaqMan RealTime PCR)**

#### 4.3.1. Prinzip der TaqMan RealTime PCR

Die qualitative RealTime-PCR, auch TaqMan RealTime PCR genannt, basiert auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase-chain-reaction*, PCR), mit der spezifische DNA-Stücke selektiv amplifiziert werden können.

Hierzu werden zwei synthetische Einzelstrang-Oligonukleotide, die Forward- und Reverse-Primer, benötigt, die jeweils mit einem Ende der zu amplifizierenden Sequenz hybridisieren [68]. Außerdem kommen freie dNTPs, also dATP, dCTP, dGTP und dTTP, sowie thermostabile DNA-Polymerasen zum Einsatz um den entsprechenden Genabschnitt komplementär zu vervielfältigen. Das wiederholte Auftrennen und Rehybridisieren der doppelsträngigen DNA wird dabei durch mehrfaches abwechselndes Erhitzen und Abkühlen des Ansatzes in einem Thermocycler erreicht.

Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR wird bei der TaqMan RealTime PCR außer den beiden Primern und den dNTPs auch ein Oligonukleotid zugegeben, das komplementär zu einem spezifisch ausgewählten DNA-Abschnitt ist und am 5'-Ende einen fluoreszenzmarkierten Reporter (z.B. VIC<sup>®</sup> oder FAM<sup>™</sup>), am 3'-Ende einen nicht-fluoreszierenden Quencher (NFQ) gebunden hat, der das Fluoreszenzsignal des Reporters bei räumlichem Abstand im Oligonukleotidbereich zu unterdrücken vermag [60]. Am Beginn der PCR wird also lediglich eine geringe Hintergrund-Fluoreszenz emittiert. Eine Signalzunahme entsteht erst durch die spezielle 5' → 3'-Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase, durch die, während der Synthese des komplementären Stranges unter Einbau des markierten Oligonukleotids in der PCR, der Reporter am 5'-Ende von der Sonde abgetrennt wird und der am 3'-Ende verbleibende Quencher seinen fluoreszenzunterdrückenden Einfluss verliert. Die zunehmende Emission v.a. in der exponentiellen Phase der PCR kann zur Quantifizierung der Expression der Zielgene herangezogen werden (quantitative oder RealTime-PCR). Der Beginn der exponentiellen Phase ist durch den C<sub>T</sub>-Wert (engl. *Threshold Cycle*,

Schwellenwertzyklus) gekennzeichnet, also den Wert, der den Zyklus beschreibt, bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal über die Hintergrund-Fluoreszenz steigt. Wenn zusätzlich zwei - wie im Rahmen dieser Arbeit - oder mehr Oligonukleotide mit verschiedenen Basenfolgen eingesetzt werden, die zudem mit verschiedenen Reportern versehen sind, so kann diese Methode auch für qualitative Untersuchungen allelischer Diskrimination oder SNP-Assays angewendet werden (qualitative RealTime-PCR, TaqMan RealTime-PCR oder multiplex PCR).

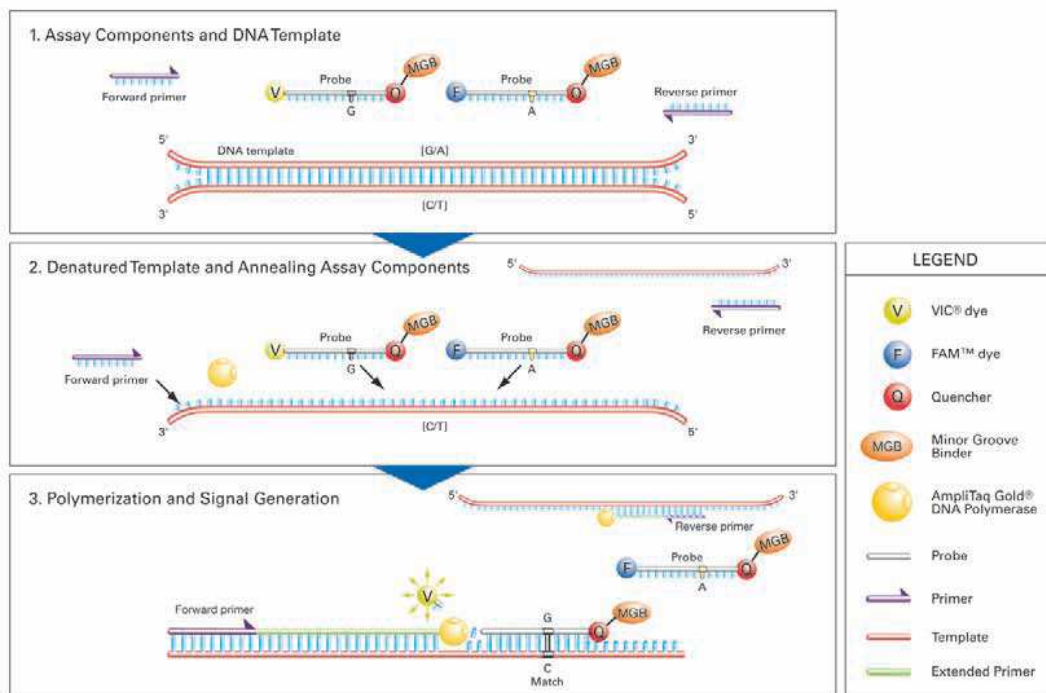


Abb. 5: Prinzip der TaqMan Real-Time PCR (modifiziert nach TaqMan® Genotyping Assay Reference Guide, Applied Biosystems)

#### 4.3.2. Anwendung der TaqMan RealTime-PCR für SNP-Assays

In dieser Dissertation wurde mit der qualitativen RealTime-PCR in einem allelischen Diskriminationsassay ermittelt, ob die Substitution eines einzigen

Nucleotids (SNP) im Adiponectin-Gen bei den Probanden der untersuchten Population auf keinem Allel (homozygot, Wildtyp), auf einem (heterozygot) oder auf beiden Allelen (homozygot, Mutante) vorliegt.

Die Auswahl des Custom TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) beruhte dabei auf Daten der Internationalen HapMap Datenbank (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.en>).

Der untersuchte SNP rs2241766 ist folgendermaßen charakterisiert:

SNP	
<b>Assay ID</b>	C_26426077_10
<b>dbSNP ID</b>	rs2241766
<b>Transcript Accession</b>	NM_004797.2
<b>Gen</b>	Adiponectin / ACDC / ACRP30 / ADIPOQ / ADPN / APM1 / GBP28
<b>Base</b>	188.053.586
<b>Allele /Polymorphismus</b>	Silent Mutation, Substitution c.45T>G
<b>Codonaustausch</b>	GGG/GGT
<b>Aminosäureaustausch</b>	synonym G15G
<b>MAF (Minor-Allel-Frequenz)</b>	0,27
<b>Position</b>	3q27
<b>Lokus</b>	CDS, Position 45; Exon 2
<b>Reporter</b>	FAM <sup>™</sup> (Wildtyp, T), VIC <sup>®</sup> (Mutante, G)
<b>Quencher</b>	an MGB gebunden
<b>Oligonukleotid-Basenfolge</b>	TTCTACTGCTATTAGCTCTGCCCGG[G/T] CATGACCAGGAAACCACGACTCAAG
<b>Forward-Primer</b>	5'-AGAAAGCAGCTCCTAGAAGT-3'
<b>Reverse-Primer</b>	5'-GGCACCATCTACACTCATCC-3'
<b>Primer-Annealing-Temperatur</b>	53°C

*Tabelle 5: tabellarische Darstellung der wichtigsten Charakteristika des verwendeten Custom TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays*

#### 4. Material, Methoden und Patienten

Der SNP ist an Basenposition 188.053.586 auf Chromosom 3q27 an der 45. Base in der codierenden Sequenz (CDS) des Adiponectin-Gens lokalisiert und definiert sich durch eine Substitution von Thymin zu Guanin. Diese wirkt sich jedoch nicht auf die Aminosäuresequenz des Proteins aus, da sowohl bei der Mutante als auch beim Wildtyp Glycin (G) an Position 15 in die Aminosäurekette des Adiponectins transferiert wird. Es liegt also eine stille Mutation vor. Die verwendeten Oligonukleotide waren mit FAM<sup>TM</sup> (Wildtyp, T) und VIC<sup>®</sup> (Mutante, G) am 5'-Ende fluoreszenzmarkiert und am 3'-Ende mit einem Quencher versehen, der an MGB gekoppelt wurde. Durch die Anlagerung des MGB in die kleine Furche der DNA-Helix wird der Oligonukleotid-Template-Komplex stabilisiert.

Für den allelischen Diskriminations-Assay kamen außer dem Custom TaqMan<sup>®</sup> Genotyping Assay (40x) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), der die fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide, sowie die Forward- und Reverse-Primer enthielt, noch der TaqMan<sup>®</sup> GTXpress<sup>TM</sup> Master Mix (2x) 10 ml (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), der die AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA-Polymerase und die freien dNTPs beinhaltete, zur Anwendung.

Zu diesen beiden Komponenten musste zuletzt noch dH<sub>2</sub>O und die jeweilige DNA-Probe zum Gesamtansatzvolumen von 10 µl addiert werden. Da der DNA-Gehalt aller photometrisch gemessenen DNA-Lösungen deutlich über den für den TaqMan<sup>®</sup> Genotyping Assay geforderten 1-10 ng lag, wurde in der Folge jeweils ein Standardvolumen von 3 µl DNA-Template für die RealTime-PCR eingesetzt.

Zusammensetzung des 10 µl RealTime PCR-Ansatzes (pro Probe)	
<b>Custom TaqMan<sup>®</sup> Genotyping Assay (40x)</b>	0,175 µl
<b>TaqMan<sup>®</sup> GTXpress<sup>TM</sup> Master Mix (2x)</b>	3,5 µl
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	3,5 µl
<b>DNA-Probe</b>	3 µl

Tabelle 6: Bestandteile des 10 µl PCR-Ansatzes für den SNP Genotyping Assay

#### 4. Material, Methoden und Patienten

Jeweils 10  $\mu\text{l}$  der Mischung wurden dann in eine MicroAmp<sup>TM</sup> Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 ml (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) pipettiert und mit MicroAmp<sup>TM</sup> Optical Adhesive Film (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) abgedeckt und vor Kontamination geschützt.

In jeder 96er-Platte liefen zudem stets mehrere Non-Template-Controls (NTCs) als Negativkontrollen mit, bei denen anstatt der 3  $\mu\text{l}$  DNA-Probe jeweils 3  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O eingesetzt wurde.

Im Anschluss daran erfolgte die RealTime-PCR unter Verwendung des StepOnePlus<sup>TM</sup> RealTime PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Der Verlauf der PCR, die durch das Fast-Cycle-System ca. 30 Minuten dauerte, ist in Abbildung 12 veranschaulicht. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels der StepOne Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) am Ende der PCR.

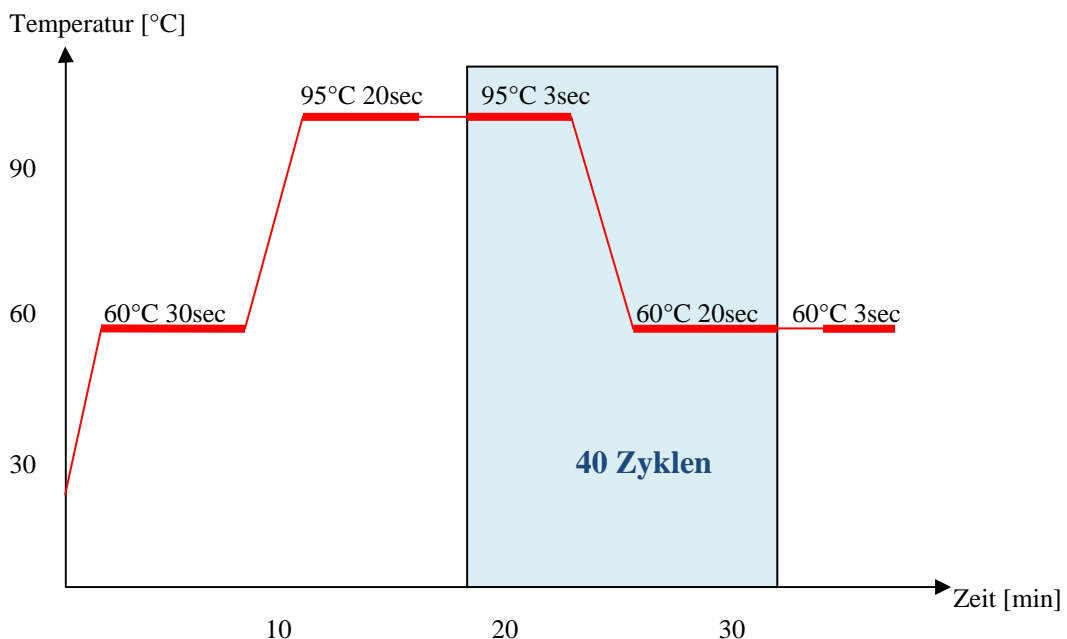


Abb. 6: schematischer Verlauf der Temperaturkurve während der 40 Zyklen der TaqMan RealTime-PCR

#### 4. Material, Methoden und Patienten

## **4.4. Patienten und Kontrollen**

### 4.4.1. Erlanger Kohorte

In die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 188 unverwandte Patienten der Medizinischen Klinik 3 des Universitätsklinikums Erlangen mit der Diagnose Systemische Sklerose (SSc), unabhängig vom jeweiligen Stadium oder Schweregrad der Erkrankung, aufgenommen und analysiert. Es wurden dabei genomische DNA-Proben und klinische Daten verwendet, wofür die Patienten im Vorfeld eine schriftliche Einwilligung zur wissenschaftlichen Verwendung des Materials abgegeben hatten.

Weiterhin dienten Proben von 634 freiwilligen gesunden Spendern aus Erlangen und Umgebung als Kontrollgruppe, wovon 76 im Rahmen dieser Studie neu rekrutiert und 558 dankenswerterweise von Prof. Dr. Winkler aus dem Lehrstuhl für Genetik des Universitätsklinikums Erlangen überlassen wurden.

Die Kontrollgruppe wurde in Alter und Geschlecht an die Patientengruppe angeglichen ausgewählt.

### 4.4.2. Kohorte der Université Descartes, Paris

Für Untersuchungen des gleichen SNP wurden uns freundlicherweise Proben von weiteren 1.012 Patienten und 998 Kontrollen von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Allanore aus dem Service de Rhumatologie A (Hôpital Cochin) der Université Descartes in Paris überlassen. Die Resultate dieser ebenfalls in Alter und Geschlecht angepassten Kohorte wurden später mit denen aus Erlangen verglichen, sowie in einem letzten Schritt mit dem Erlanger Kollektiv zu einer großen Kohorte zusammengefasst und analysiert.



## 4.5. Statistische Auswertung

Für die genetische Assoziationsstudie wurde die statistische Auswertung mit dem Programm Haploview V.3.32 , das frei auf der Internetseite des Broad Institute of MIT and Harvard (<http://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>) erhältlich ist, vollzogen.

Die Berechnung der Signifikanzen beruhte dabei auf dem EM- (*expectation-maximization*) Algorithmus, wobei die Informationen der Population der NCBI-Variation-Databse (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) als Referenz dienten. So wurde die Wahrscheinlichkeitsverteilung des Einzellocus, also des SNPs, und seine Assoziation mit klinischen Merkmalen der SSc berechnet. Für alle Bewertungen von Assoziationen wurde das Signifikanzniveau für Fehler erster Art auf 5 % festgelegt, was einem p-Wert von  $< 0,05$  entspricht.

Das korrigierte Chancenverhältnis (*Odds Ratio*, OR), die jeweiligen 95 %-Konfidenzintervalle (95 %-CI) und die anschließende Signifikanzanalyse mit Fisher`s Exact-Test bzw.  $\chi^2$  -Test wurde mit dem Programm Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) berechnet.

## **5. Ergebnisse**

### **5.1. Erlanger Kohorte**

#### **5.1.1. Charakteristika der Kohorte**

Proben von 188 Patienten mit der Diagnose SSc unabhängig von Schweregrad und Stadium der Erkrankung wurden in der Erlanger Kohorte untersucht. Als Kontrollgruppe für diese Fall-Kontroll-Studie diente dabei ein Kollektiv von insgesamt 634 freiwilligen gesunden Spendern aus Erlangen und Umgebung.

Das Durchschnittsalter belief sich dabei auf 52,8 Jahre (range: 24-81 Jahre) in der Gruppe der an SSc Erkrankten und auf 54,1 Jahre (range: 19-91 Jahre) bei den Gesunden.

Die Geschlechterverteilung lag bei 26,7 % Männern zu 73,3 % Frauen bei den Patienten bzw. 28,6 % zu 71,4 % bei den Kontrollen.

Die Patienten wurden weiterhin nach klinischen und serologischen Parametern charakterisiert:

Bei der Einteilung in Subgruppen der Sklerodermie konnten 72,4 % der limitierten kutanen SSc und 27,6 % der diffusen kutanen SSc zugeordnet werden. Hinsichtlich des Antikörper-Status waren 95,6 % der Patienten positiv für Anti-nukleäre-Antikörper (ANA), 27,9 % positiv für Anti-Centromer-Antikörper (ACA) und 25,4 % positiv für Anti-Scl70-Antikörper gegen Topoisomerase 1. Bezüglich kutaner Symptome ergab sich ein durchschnittlicher modifizierter Rodnan-Skin-Score [92] von 8,2 (range: 0-24), bei 97,2 % bestand Raynaud-Symptomatik und bei 46,5 % konnten digitale Ulzerationen nachgewiesen werden. Am Bewegungsapparat wurden bei 43,4 % der an SSc-Erkrankten Synovitiden und bei 14,0 % Kontrakturen belegt, eine CK-Erhöhung fand sich bei 8,3 %.

Auch das Ausmaß der Organbeteiligung wurde ermittelt:

Die in der Literatur als am häufigsten beschriebene Dysphagie- bzw. Reflux-Symptomatik aufgrund der Ösophagusstarre war auch in unserer Untersuchung mit 91,4 % die häufigste Organmanifestation.

Desweiteren bestand hinsichtlich des Respirationstraktes bei 40,2 % Dyspnoe, bei 15,7 % eine restriktive Ventilationsstörung in der Lungenfunktionsprüfung. Die Diffusionskapazität der Lunge für Kohlenmonoxid (DLCO) lag durchschnittlich bei 72,1 % (range: 30-117 %). In Röntgen-Thorax-Aufnahmen konnte bei 30,4 % eine Lungenfibrose diagnostiziert werden.

Am Herz-Kreislauf-System zeigte sich in 7,0 % der Fälle eine reduzierte Ejektionsfraktion (EF) und in 2,8 % eine abnorme diastolische Phase. Palpitationen traten bei 3,7 % der Patienten auf, Reizleitungsstörungen wie AV-Blöcke bei 5,6 %. 20 % der Patienten wiesen echokardiographisch oder per Rechtsherzkatheter ermittelt eine pulmonal arterielle Hypertonie auf.

Renale Krisen sind anamnestisch bei 7,5 % der Betroffenen eruiert worden.

48,8 % der SSc-Patienten wurden mit Basistherapeutika wie Methotrexat, Mycophenolatmofetil und Cyclophosphamid therapiert.

Die Verteilung der klinischen und serologischen Parameter der Erlanger SSc-Kohorte ist in Tabelle 7 zusammengefasst.

Untersuchter Parameter	Auftreten / relative Häufigkeit in der Erlanger SSc-Kohorte (n=188)
<b>Alter</b>	Ø 52,8Jahre (range: 24-81 Jahre)
<b>Geschlecht</b>	♀ 73,3 % ♂ 26,7 %
<b>SSc-Subgruppen</b>	72,4 % lcSSc 27,6 % dcSSc
<b>Auto-Antikörper</b>	95,6 % ANA + 27,9 % ACA + 25,4 % Anti-Scl70 +
<b>mRSS</b>	Ø 8,2 (range: 0-24)
<b>Raynaud-Symptomatik</b>	97,2 %
<b>Digitale Ulzerationen</b>	46,5 %
<b>Synovitis</b>	43,4 %
<b>Gelenkkontrakturen</b>	14,0 %
<b>CK-Erhöhung</b>	8,3 %
<b>Reflux / Dysphagie</b>	91,4 %
<b>Dyspnoe</b>	40,2 %
<b>Restriktive Ventilationsstörung</b>	15,7 %
<b>DLCO</b>	Ø 72,1 % (range: 30-117 %)
<b>Lungenfibrose</b>	30,4 %
<b>Pulmonale Hypertonie</b>	20,0 %
<b>Reduzierte EF</b>	7,0 %
<b>Abnorme Diastole</b>	2,8 %
<b>Palpitationen</b>	3,7 %
<b>Reizleitungsstörungen</b>	5,6 %
<b>Renale Krise</b>	7,5 %
<b>Therapie mit Basistherapeutika</b>	48,8 %

*Tabelle 7: Klinische und serologische Charakteristika der 188 untersuchten Patienten der Erlanger SSc-Kohorte.*

### 5.1.2. Grundlagen der SNP-Genotypisierung

Das untersuchte Adiponectin-Gen erstreckt sich auf dem langen Arm von Chromosom 3 von Basenpaar 188.043.157 bis 188.058.944 in der Region 3q27. An Basenposition 188.053.586 ist der Einzelnukleotid-Polymorphismus rs2241766 überliefert, der an 45. Stelle in der codierenden Sequenz des ADIPOQ-Gens lokalisiert ist. Da es sich dabei um einen biallelischen SNP handelt, sind zwei verschiedene Allel-Konstellationen möglich: Die häufigere Pyrimidinbase Thymin (T) als Normvariante, sowie die, im Sinne eines Polymorphismus davon abweichende, seltenere Purinbase Guanin (G).

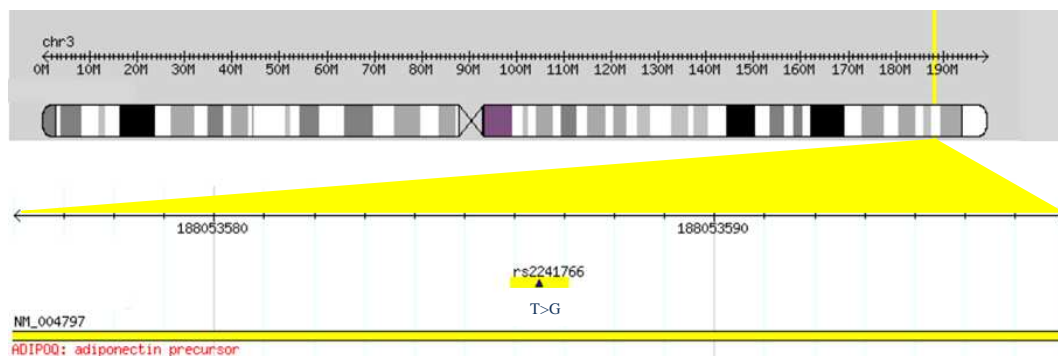


Abb. 7: Lokalisation des SNP T>G rs2241766 im ADIPOQ-Gen an Basenposition 188.053.586 auf Chromosom 3q27 (modifizierte Abbildung aus der HapMap-Datenbank ([http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap3r2\\_B36/](http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap3r2_B36/))).

Die Genotypisierung des Polymorphismus an diesem Gen-Locus basierte auf der qualitativen RealTime-PCR und wurde mit Hilfe von TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays durchgeführt (siehe Kapitel 4.3.). Das in Abbildung 8 exemplarisch dargestellte Ergebnis eines SNP-Assays verdeutlicht, dass mit dieser Methode eine Unterscheidung von heterozygoten und homozygoten Allelträgern möglich ist.

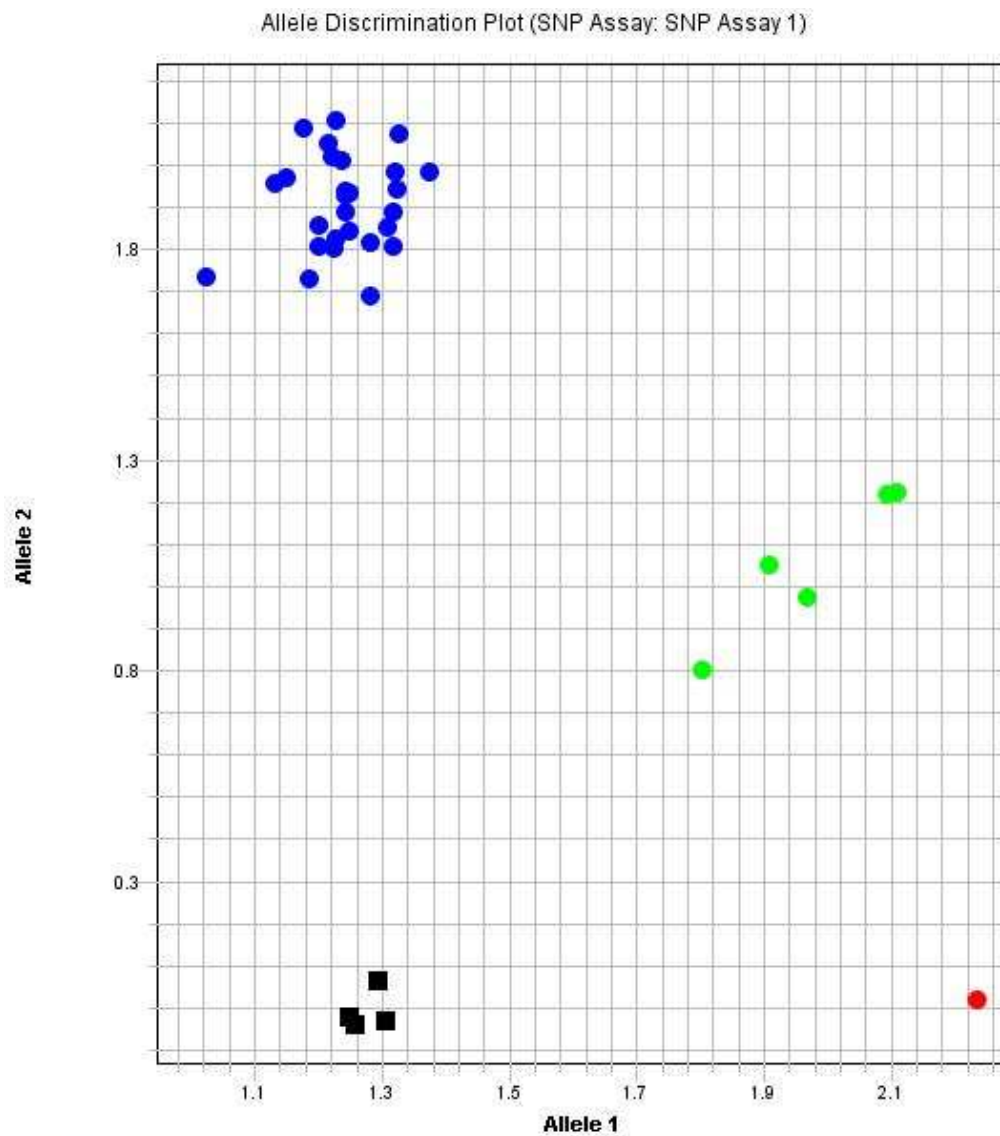


Abb. 8: Exemplarische Darstellung eines Genotypisierungsergebnisses mit Hilfe von SNP-Assays. Durch allelische Diskrimination mit SNP-Assays, die auf dem Prinzip der TaqMan Real-Time PCR basieren, können die einzelnen Allele der unterschiedlichen Spender-DNAs als homozygot oder heterozygot identifiziert werden. Homozygote zeigen nur ein Signal für ein Allel (G oder T), Heterozygote für beide Allele (G und T).

x-Achse: Signal für Allel 1=Guanin (G); y-Achse: Signal für Allel 2=Thymin (T);

Einheit: RFU=relative fluorescence units;

● = homozygot GG, ● = homozygot TT, ● = heterozygot GT/TG, ■ = NTC/Negativkontrolle.

Die statistische Auswertung der Genotypisierungsergebnisse wurde mit Hilfe des Programms Haploview V.3.32 durchgeführt, das basierend auf dem EM-Algorithmus die Wahrscheinlichkeitsverteilung der verschiedenen Allele für den Einzellokus und damit für den SNP berechnet. Da es sich bei der Berechnung der Assoziation um eine Fall-Kontroll-Studie handelt, sind  $\chi^2$ - und p-Werte für die Allel- und Genotyphäufigkeiten der SSc-Patienten (Fälle) im Vergleich zu gesunden Spendern (Kontrollen) berechnet worden. Als signifikant wurden dabei p-Werte für Fehler erster Art von  $< 0,05$  angesehen (= 5 %-Signifikanzniveau). Es erfolgte ebenfalls mit dem Program GraphPad Prism 5.0 die Berechnung des korrigierten Chancenverhältnisses (*Odds Ratio*, OR), der 95 %-Konfidenzintervalle (95 %-CI) und eine anschließende Signifikanzanalyse, die auf Fisher's Exact-Test bzw.  $\chi^2$ -Test beruhte.

### 5.1.3. Verteilung der Genotypen

Die Auswertungen der TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays ergaben bei den SSc-Patienten eine relative Häufigkeit von Genotyp TT von 80,3 %, von GT bzw. TG von 14,9 % und von GG von 0,5 %. Im Kontroll-Kollektiv betrug die relative Häufigkeit 78,4 % für TT, 16,9 % für TG und 2,1 % für GG. Die Verteilung der verschiedenen Genotypen wich nicht vom nach Hardy-Weinberg-Equilibrium erwarteten Wert von 1,67 ab. Der Genotyp GG war nicht signifikant mit SSc korreliert ( $p = 0,2110$ ) und zeigte eine reduzierte Odds Ratio (OR = 0,2596), die jedoch im 95 %-Konfidenzintervall von 0,0337–1,999 lag. Für die Heterozygotie TG ergab sich ebenfalls kein signifikanter Bezug zur SSc ( $p = 0,6517$ ) und eine OR von 0,8780 im 95 %-CI [0,5577-1,382]. Auch wenn man den Genotyp TT mit SSc in Verbindung brachte, fehlte ein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,3304$ ). Die OR lag dabei bei 1,257 im 95 %-CI [0,8059-1,961].

Die Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens der verschiedenen Basenvarianten zwischen Erkrankten und Gesunden waren damit nicht signifikant.

Genotypen	Absolute (relative) Häufigkeit bei SSc-Patienten (n=188)	Absolute (relative) Häufigkeit bei Kontrollen (n=634)
<b>TT</b>	151 (80,3 %)	497 (78,4 %)
<b>TG</b>	28 (14,9 %)	107 (16,9 %)
<b>GG</b>	1 (0,5 %)	13 (2,1 %)

Tabelle 8: Verteilung der verschiedenen Genotypen im Erlanger Patienten- und Kontroll-Kollektiv.

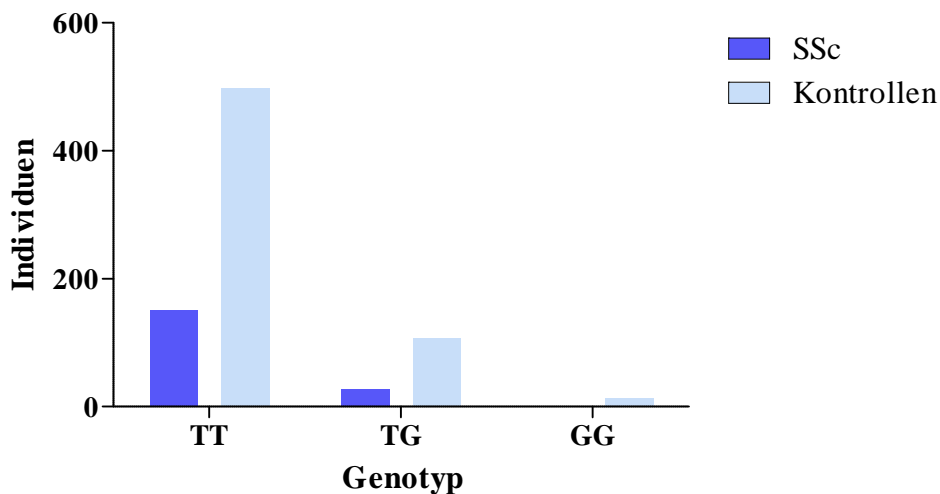


Abb. 9: Verteilung der Genotypen TT, TG und GG in der Erlanger Kohorte

Hinsichtlich der Allel-Frequenzen war das Allel T mit einer Major-Allel-Frequenz von 0,878 bei SSc bzw. 0,866 bei den Kontrollen nachweisbar. Die Minor-Allel-Frequenz (MAF) für Allel G lag bei 0,080 bzw. 0,105 und unterscheidet sich damit von der bisher überlieferten MAF der NCBI-Variation-Database ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=rs2241766](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs2241766)), für die in größeren Studienkollektiven eine MAF des Allels G von 0,273 ermittelt wurde.



Auch bezüglich der Allel-Frequenz bestand kein signifikanter Unterschied zwischen SSc-Erkrankten und dem Kontrollkollektiv.

Allele	Absolute (relative) Häufigkeit bei SSc-Patienten (n=188)	Absolute (relative) Häufigkeit bei Kontrollen (n=634)
<b>T</b>	330 (87,8 %)	1101 (86,8 %)
<b>G</b>	30 (8,0 %)	133 (10,5 %)

*Tabelle 9: Allel-Frequenzen bei Patienten und Kontrollen der Erlanger SSc-Kohorte.*

Merkmal	P- Wert	OR	95%- CI
<b>Allel G</b>	0,3920	0,8155	0,5259 – 1,264
<b>Genotyp GG</b>	0,2110	0,2596	0,0337 – 1,999
<b>Genotyp TG</b>	0,6517	0,8780	0,5577 – 1,382
<b>Genotyp TT</b>	0,3304	1,257	0,8059 – 1,961

*Tabelle 10: Signifikanz, Odds Ratio und 95 %- Konfidenzintervall genetischer Merkmale bei Patienten mit SSc.*

#### 5.1.4. Korrelation der Genotypen mit klinischen Parametern

Zuerst wurden die verschiedenen Genotypen beim Subtyp der diffusen kutanen SSc (dcSSc) mit dem Auftreten beim Kontrollkollektiv verglichen. 95,3 % zeigten Genotyp TT, 4,7 % TG und 0 % GG. Die Minor-Allel-Frequenz beträgt dabei 0,024.

Genotypen	Absolute (relative ) Häufigkeiten bei dcSSc Patienten (n=21)	Absolute (relative ) Häufigkeiten bei Kontrollen (n=634)
<b>TT</b>	20 (95,3 %)	497 (78,4 %)
<b>TG</b>	1 (4,7 %)	107 (16,9 %)
<b>GG</b>	0 (0,0 %)	13 (2,1 %)

*Tabelle 11: Verteilung der Genotypen bei Patienten mit dcSSc.*

Weder Allel G oder T alleine, noch die Genotypen GG, TG oder TT waren auf dem 5 %- Signifikanzniveau mit der dcSSc assoziiert.

Merkmal	P – Wert	OR	95 %-CI
<b>Allel G</b>	0,2338	0,2397	0,0319 – 1,800
<b>Genotyp GG</b>	1,000	1,041	0,0598 – 18,11
<b>Genotyp TG</b>	0,2305	0,2383	0,0316 – 1,796
<b>Genotyp TT</b>	0,1511	4,829	0,6414 – 36,36

*Tabelle 12: Signifikanz, Odds Ratio und 95 %-Konfidenzintervall genetischer Merkmale bei Patienten mit dcSSc.*

Desweiteren wurde der Zusammenhang mit fibrosierender Alveolitis untersucht, wobei 95,2 % der Patienten mit Fibrose-Zeichen in der Röntgen-Thorax-Aufnahme als TT, 0,0 % als TG und 4,8 % als GG genotypisiert wurden. Die Minor-Allel-Frequenz belief sich dabei auf 0,05.

Genotyp	Absolute (relative) Häufigkeiten bei Patienten mit fibrosierender Alveolitis (n=21)	Absolute (relative) Häufigkeiten bei Kontrollen (n=634)
<b>TT</b>	20 (95,2 %)	497 (78,4 %)
<b>TG</b>	0 (0,0 %)	107 (16,9 %)
<b>GG</b>	1 (4,8 %)	13 (2,1 %)

*Tabelle 13: Verteilung der Genotypen bei SSc-Patienten mit fibrosierender Alveolitis.*

Homozygotie (GG oder TT) war bei Patienten mit fibrosierender Alveolitis nicht signifikant korreliert, jedoch trat für Heterozygotie mit dem Genotyp TG ein signifikanter p-Wert ( $p = 0,0343$ , damit  $< 0,05$ ) auf. Die Odds Ratio beträgt 0,1104, liegt jedoch im 95 %-Konfidenzintervall von 0,0066 bis 1,839, d.h. die Wahrscheinlichkeit als SSc-Kranker mit Lungenfibrose Genotyp TG aufzuweisen ist statistisch nicht sicher seltener als bei Gesunden zu vermuten.

Merkmal	P – Wert	OR	95 %-CI
<b>Allel G</b>	0,2666	0,1562	0,7209 – 3,385
<b>Genotyp GG</b>	0,3772	2,323	0,2894 – 18,64
<b>Genotyp TG</b>	<b>0,0343</b>	<b>0,1104</b>	<b>0,0066 – 1,839</b>
<b>Genotyp TT</b>	0,1511	4,829	0,6414 – 36,36

*Tabelle 14: Signifikanz, Odds Ratio und 95 %-Konfidenzintervall genetischer Merkmale bei Patienten mit fibrosierender Alveolitis. Der Genotyp TG zeigte sich auf dem 5 %- Niveau als signifikant.*

Bei der Analyse des SNPs bei SSc-Patienten mit pulmonal-arterieller Hypertonie (PAH) erwiesen sich alle 14 Betroffenen als homozygot für TT.

Genotyp	Absolute (relative) Häufigkeiten bei Patienten mit pulmonal-arterieller Hypertonie (n=21)	Absolute (relative) Häufigkeiten bei Kontrollen (n=634)
<b>TT</b>	14 (100,0 %)	497 (78,4 %)
<b>TG</b>	0 (0,0 %)	107 (16,9 %)
<b>GG</b>	0 (0,0 %)	13 (2,1 %)

*Tabelle 15: Verteilung der Genotypen bei SSc-Patienten mit pulmonal-arterieller Hypertonie.*

Bezüglich der PAH ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge mit bestimmten Genotypen im Vergleich zu Gesunden.

Merkmal	P – Wert	OR	95 %-CI
<b>Allele G</b>	0,1426	0,1730	0,0102 – 2,922
<b>Genotyp GG</b>	1,000	1,544	0,0875 – 27,26
<b>Genotyp TG</b>	0,1432	0,1638	0,0097 – 2,768
<b>Genotyp TT</b>	0,0838	7,024	0,4158 – 118,7

*Tabelle 16: Signifikanz, Odds Ratio und 95 %-Konfidenzintervall genetischer Merkmale bei Patienten mit pulmonal-arterieller Hypertonie.*

Letztes untersuchtes klinisches Merkmal war das Auftreten von digitalen Ulzerationen. Es zeigte sich, dass 90,6 % dem Genotyp TT, 9,4 % TG und 0,0 % GG angehörten. Die Minor-Allel-Frequenz für die Base Guanin lag bei 0,049.

Genotyp	Absolute (relative) Häufigkeiten bei Patienten mit digitalen Ulzerationen (n=32)	Absolute (relative) Häufigkeiten bei Kontrollen (n=634)
<b>TT</b>	29 (90,6 %)	497 (78,4 %)
<b>TG</b>	3 (9,4 %)	107 (16,9 %)
<b>GG</b>	0 (0,0 %)	13 (2,1 %)

*Tabelle 17: Verteilung der Genotypen bei SSc-Patienten mit digitalen Ulzerationen.*

Kein Genotyp trat in der SSc-Gruppe mit digitalen Ulzerationen signifikant häufiger auf als in der Kontroll-Gruppe.

Merkmal	P – Wert	OR	95 %-CI
<b>Allel G</b>	0,4927	0,6292	0,2184 – 1,812
<b>Genotyp GG</b>	0,5215	1,452	0,1841 – 11,45
<b>Genotyp TG</b>	0,3380	0,4766	0,1428 – 1,591
<b>Genotyp TT</b>	0,2443	2,334	0,6991 – 7,792

*Tabelle 18: Signifikanz, Odds Ratio und 95 %-Konfidenzintervall genetischer Merkmale bei Patienten mit digitalen Ulzerationen.*

### 5.1.5. Korrelation der Genotypen mit serologischen Parametern

Die Relation zwischen Polymorphismus und Antikörper-Status der SSc-Patienten wurde durch Vergleich des gemeinsamen Auftretens verschiedener Genotypen mit Auto-Antikörpern gegen Topoisomerase 1 (Anti-Scl70) und Anti-Centromer-Antikörpern (ACA) im SSc-Patienten-Gut überprüft.

Dabei hatten bei den Anti-Scl70-Positiven 80,0 % den Genotyp TT, 20,0 % TG und 0,0 % GG. Die MAF betrug 0,11.

Genotyp	Absolute (relative) Häufigkeiten bei Anti-Scl70 + - Patienten (n=15)	Absolute (relative) Häufigkeiten bei Kontrollen (n=634)
<b>TT</b>	12 (80,0 %)	497 (78,4 %)
<b>TG</b>	3 (20,0 %)	107 (16,9 %)
<b>GG</b>	0 (0,0 %)	13 (2,1 %)

Table 19: Verteilung der Genotypen bei SSc-Patienten mit positivem Anti-Scl70 Antikörperstatus.

Merkmal	P – Wert	OR	95 %-CI
<b>Allel G</b>	1,000	1,007	0,2869 – 3,532
<b>Genotyp GG</b>	1,000	1,444	0,082 – 25,43
<b>Genotyp TG</b>	0,7332	1,192	0,3305 – 4,297
<b>Genotyp TT</b>	1,000	0,9658	0,2682 – 3,477

Table 20: Signifikanz, Odds Ratio und 95 %-Konfidenzintervall genetischer Merkmale bei Patienten mit positivem Anti-Scl70-Antikörperstatus.

Bei den ACA-Positiven war der Genotyp TT mit 89,5 %, TG mit 10,5 % und GG mit 0,0 % vertreten. Die MAF für Allel G errechnete sich zu 0,05.

In Bezug auf den Antikörperstatus war weder Positivität für Anti-Sc170 noch für Anti-Centromer-Antikörper signifikant mit bestimmten Genotypen korreliert (siehe Tabelle 21 und 22).

Genotyp	Absolute (relative) Häufigkeiten bei ACA+ - Patienten (n=15)	Absolute (relative) Häufigkeiten bei Kontrollen (n=634)
<b>TT</b>	17 (89,5 %)	497 (78,4 %)
<b>TG</b>	2 (10,5 %)	107 (16,9 %)
<b>GG</b>	0 (0,0 %)	13 (2,1 %)

*Tabelle 21: Verteilung der Genotypen bei SSc-Patienten mit positivem ACA-Antikörperstatus.*

Merkmal	P – Wert	OR	95 %-CI
<b>Allel G</b>	0,5548	0,5298	0,1218 – 2,305
<b>Genotyp GG</b>	1,000	1,148	0,0658 – 2,305
<b>Genotyp TG</b>	0,7557	0,5607	0,1276 – 2,464
<b>Genotyp TT</b>	0,5525	2,052	0,4676 – 9,007

*Tabelle 22: Signifikanz, Odds Ratio und 95 %-Konfidenzintervall genetischer Merkmale bei Patienten mit positivem Anti-Centromer-Antikörperstatus.*

## 5.2. Kohorte der Université Descartes, Paris

### 5.2.1. Charakteristika der Kohorte

Proben für eine zweite Kohorte zur zusätzlichen Bestätigung der Ergebnisse, die in der Erlanger Kohorte auftraten, wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Allanore aus dem Service de Rhumatologie A (Hôpital Cochin) der Université Descartes in Paris zur Auswertung überlassen. Es handelte sich dabei um DNA-Material und klinische Daten von 1.012 SSc-Patienten und 998 Kontrollen aus Frankreich.

Das Durchschnittsalter belief sich auf 57,7 Jahre (range: 31-83 Jahre) und die Geschlechterverteilung lag bei 16,1 % Männern zu 83,9 % Frauen. Die Kontroll-Individuen wurden in Alter, Geschlecht und ethnischer Herkunft an die Fall-Gruppe angepasst ausgewählt. Keine der Kontrollpersonen hatte eine positive Familiengeschichte hinsichtlich Autoimmunkrankheiten oder war mit einer anderen Kontrollperson verwandt.

Auch dieses SSc-Kollektiv wurde mittels aus Paris übergebener Daten nach klinischen und serologischen Parametern charakterisiert:

Alle Patienten konnten nach der von LeRoy eingeführten Einteilung verschiedenen Subtypen der SSc zugeordnet werden [59]. Diese waren zu 69,1 % die limitierte kutane SSc (lcSSc) und zu 30,9 % die diffuse kutane SSc (dcSSc).

Die Analyse des Auto-Antikörper-Status ergab bei 86,4 % Positivität für ANA, bei 36,6 % für ACA und schließlich bei 24,4 % für Anti-Scl70.

Digitale Ulzerationen wurden bei 32,5 % anamnestisch eruiert.

Die Lungenbeteiligung äußerte sich bei 34,3 % mit dem Auftreten einer fibrosierenden Alveolitis in der Computer-Tomographie und bei 6,4 % mit pulmonal-arterieller Hypertonie (PAH) in der Rechtsherzkatheteruntersuchung.

2,0 % der Patienten wiesen in ihrer Krankengeschichte eine renale Krise auf.



Untersuchter Parameter	Auftreten / relative Häufigkeit in der französischen SSc-Kohorte (n=1012)
<b>Alter</b>	Ø 57,7 Jahre (range: 31-83 Jahre)
<b>Geschlecht</b>	♀ 83,9 % ♂ 16,1 %
<b>SSc-Subtyp</b>	69,1 % lcSSc 30,9 % dcSSc
<b>Auto-Antikörper</b>	86,4 % ANA + 36,6 % ACA + 24,4 % Anti-Scl70 +
<b>Digitale Ulzerationen</b>	32,5 %
<b>Fibrosierende Alveolitis</b>	34,3 %
<b>Pulmonale Hypertonie</b>	6,4 %
<b>Renale Krise</b>	2,0 %

*Tabelle 23: Klinische und serologische Charakteristika der 1.012 untersuchten Patienten der französischen SSc-Kohorte.*

### 5.2.2. Ergebnisse der Genotypisierung

Die Genotypisierung und die statistische Auswertung dieser Fall-Kontroll-Studie erfolgte in Analogie zur Vorgehensweise in der Erlanger Kohorte.

Im französischen SSc-Kollektiv lag der Genotyp TT zu 76,0 %, TG zu 22,0 % und GG zu 2,0 % vor. Bei den Kontrollen wies der Genotyp TT eine relative Häufigkeit von 74,7 %, TG von 24,1 % und GG von 1,3 %. Die Genotyp-Frequenzen befanden sich im Hardy-Weinberg-Equilibrium von 1,67.

Der Genotyp GG war nicht signifikant mit SSc korreliert ( $p = 0,2646$ ) und zeigte eine erhöhte Odds Ratio (OR = 1,490), die jedoch im 95 %-Konfidenzintervall von 0,736-3,018 lag. Für die Heterozygotie TG ergab sich ebenfalls kein signifikanter Bezug zur SSc ( $p = 0,3222$ ) und eine OR von 0,900 im 95 %-CI [0,731-1,109]. Auch wenn man den Genotyp TT mit SSc in Verbindung brachte,

fehlte ein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,4864$ ). Die OR lag dabei bei 0,930 im 95 %-CI [0,760-1,140].

Genotypen	Absolute (relative) Häufigkeit bei SSc-Patienten (n=1.012)	Absolute (relative) Häufigkeit bei Kontrollen (n=998)
<b>TT</b>	769 (76,0 %)	745 (74,7 %)
<b>TG</b>	223 (22,0 %)	240 (24,1%)
<b>GG</b>	20 (2,0 %)	13 (1,3 %)

Tabelle 24: Verteilung der verschiedenen Genotypen im französischen Patienten- und Kontrollen-Kollektiv.

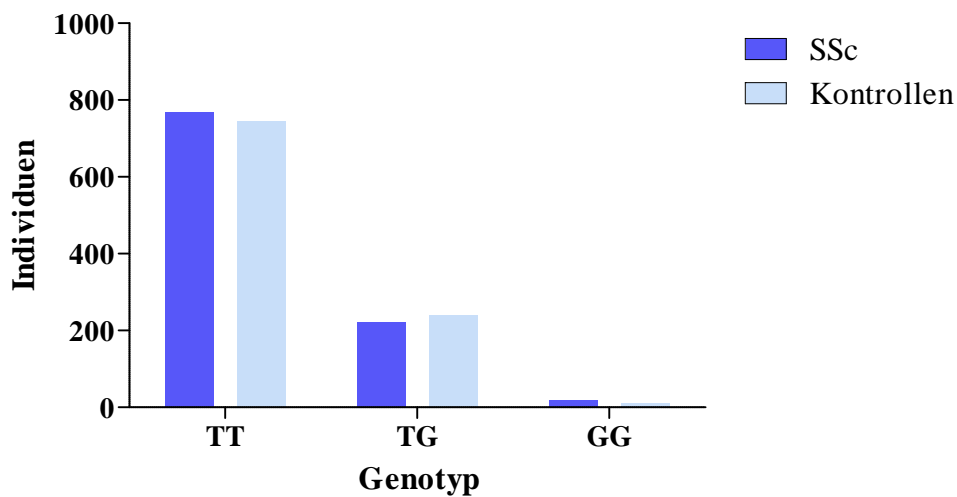


Abb. 10: Verteilung der Genotypen TT, TG und GG in der Kohorte der Université Descartes Paris.

Hinsichtlich der Einzelallele waren 87,0 % der SSc-Patienten und 86,7 % der Kontrollindividuen T-Allelträger, 13,0 % bzw. 13,1 % wiesen ein G-Allel auf. Auch in der französischen Fall-Kontroll-Studie wurde daher mit 0,130 bei den SSc-Patienten bzw. 0,131 bei den Kontrollen eine niedrigere Minor-Allel-Frequenz (MAF) für Allel G festgestellt als im Bezugskollektiv der NCBI-Variation-Database

([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=rs2241766](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs2241766)).

Das G-Allel war ebenfalls ohne signifikante Korrelation zur SSc ( $p = 0,7551$ ), die OR lag bei 0,971 im 95 %-CI [0,809-1,116].

Allele	Absolute (relative ) Häufigkeit bei SSc-Patienten (n=1.012)	Absolute (relative) Häufigkeit bei Kontrollen (n=998)
<b>T</b>	1.761 (87,0 %)	1.730 (86,7 %)
<b>G</b>	263 (13,0 %)	266 (13,1 %)

*Tabelle 25: Allel-Frequenzen bei Patienten und Kontrollen der französischen SSc-Kohorte.*

Merkmal	P- Wert	OR	95 %- CI
<b>Allel G</b>	0,7551	0,971	0,809 – 1,116
<b>Genotyp GG</b>	0,2646	1,490	0,736 – 3,018
<b>Genotyp TG</b>	0,3222	0,900	0,731 – 1,109
<b>Genotyp TT</b>	0,4864	0,930	0,760 – 1,140

*Tabelle 26: Signifikanz, Odds Ratio und 95 %- Konfidenzintervall genetischer Merkmale bei SSc-Patienten*

### 5.2.3. Assoziation der Genotypen mit klinischen Parametern

Zunächst wurde das Auftreten der verschiedenen Genotypen beim Subtyp der diffusen kutanen SSc (dcSSc) mit den oben bereits dargestellten Werten aus dem Kontrollkollektiv verglichen. 76,7 % der Patienten mit dcSSc wiesen Genotyp TT, 21,4 % TG und 1,9 % GG auf. Die Minor-Allel-Frequenz für Allel G lag bei 0,126.

Im Vergleich zum Kollektiv der Gesunden war weder Allel G oder T allein, noch die Genotypen GG, TG und TT auf dem 5 %-Signifikanzniveau mit der dcSSc assoziiert (siehe Tabelle 28).

Genotypen	Absolute (relative) Häufigkeit bei dcSSc-Patienten (n=313)	Absolute (relative) Häufigkeit bei Kontrollen (n=998)
<b>TT</b>	240 (76,7 %)	745 (74,7 %)
<b>TG</b>	67 (21,4 %)	240 (24,1%)
<b>GG</b>	6 (1,9 %)	13 (1,3 %)

Tabelle 27: Verteilung der Genotypen bei Patienten mit diffuser kutanen SSc (dcSSc).

Merkmal	P - Wert	OR	95 %-CI
<b>Allel G</b>	0,6480	0,939	0,718 – 1,229
<b>Genotyp GG</b>	0,4690	1,433	0,539 – 3,811
<b>Genotyp TG</b>	0,3610	0,867	0,637 – 1,178
<b>Genotyp TT</b>	0,4689	0,896	0,665 – 1,207

Tabelle 28.: Signifikanz, Odds Ratio und 95 %-Konfidenzintervall genetischer Merkmale bei Patienten mit dcSSc.

Weiterhin wurde der Zusammenhang mit der fibrosierenden Alveolitis begutachtet, wobei 74,4 % der entsprechenden Patienten als TT, 23,9 % als TG und 1,6 % als GG genotypisiert wurden. Die MAF belief sich auf 0,137.

Genotypen	Absolute (relative) Häufigkeit bei SSc-Patienten mit fibrosierender Alveolitis (n=347)	Absolute (relative) Häufigkeit bei Kontrollen (n=998)
<b>TT</b>	258 (74,4 %)	745 (74,7 %)
<b>TG</b>	83 (23,9 %)	240 (24,1%)
<b>GG</b>	6 (1,7 %)	13 (1,3 %)

*Tabelle 29.: Verteilung der Genotypen bei Sklerodermie-Patienten mit Lungenfibrose.*

Der im Erlanger Kollektiv gefundene signifikante p-Wert für Genotyp TG konnte in der Kohorte der Universität Descartes nicht bestätigt werden. Auch fehlte für die übrigen möglichen Genotypen ein statistisch relevanter Zusammenhang.

Merkmal	P – Wert	OR	95 %-CI
<b>Allel G</b>	0,8095	1,031	0,802 – 1,327
<b>Genotyp GG</b>	0,5634	1,333	0,501 – 3,543
<b>Genotyp TG</b>	0,9925	0,999	0,750 – 1,331
<b>Genotyp TT</b>	0,9126	1,016	0,665 – 1,207

*Tabelle 30: Signifikanz, Odds Ratio und 95 %-Konfidenzintervall genetischer Merkmale bei SSc-Patienten mit fibrosierender Alveolitis.*

Die SNP-Analyse bei Patienten mit pulmonal-arterieller Hypertonie (PAH) bezeichnete 78,5 % als homozygot für T, 20,0 % als heterozygot und 1,5 % als homozygot für G. Die MAF betrug 0,115.

Genotypen	Absolute (relative) Häufigkeit bei SSc-Patienten mit pulmonal-arterieller Hypertonie (n=65)	Absolute (relative) Häufigkeit bei Kontrollen (n=998)
<b>TT</b>	51 (78,5 %)	745 (74,7 %)
<b>TG</b>	13 (23,9 %)	240 (24,1%)
<b>GG</b>	1 (1,7 %)	13 (1,3 %)

*Tabelle 31: Verteilung der Genotypen bei Sklerodermie-Patienten mit PAH.*

Auch hinsichtlich der PAH ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen bestimmten Genotyp-Konstellationen bei Patienten verglichen mit den Gesunden.

Merkmal	P – Wert	OR	95 %-CI
<b>Allel G</b>	0,5597	0,848	0,488 – 1,475
<b>Genotyp GG</b>	0,9113	1,124	0,144 – 8,761
<b>Genotyp TG</b>	0,4627	0,791	0,423 – 1,480
<b>Genotyp TT</b>	0,4923	0,808	0,440 – 1,485

*Tabelle 32: Signifikanz, Odds Ratio und 95 %-Konfidenzintervall genetischer Merkmale bei SSc-Patienten mit pulmonal-arterieller Hypertonie.*

Als letztes klinisches Merkmal wurde in dieser Kohorte das Auftreten digitaler Ulzerationen untersucht. Es zeigte sich, dass 76,9 % dem Genotyp TT, 22,5 % TG und 0,6 % GG angehörten. Die Minor-Allel-Frequenz für die Base Guanin lag bei 0,119.

Genotypen	Absolute (relative) Häufigkeit bei SSc-Patienten mit digitalen Ulzerationen (n=329)	Absolute (relative) Häufigkeit bei Kontrollen (n=998)
<b>TT</b>	253 (76,9 %)	745 (74,7 %)
<b>TG</b>	74 (22,5 %)	240 (24,1%)
<b>GG</b>	2 (0,6 %)	13 (1,3 %)

*Tabelle 33: Verteilung der Genotypen bei Sklerodermie-Patienten mit digitalen Ulzera.*

Die Patienten mit digitalen Ulzerationen hatten keinen Genotyp und kein Allel signifikant häufiger oder seltener als die Probandengruppe.

Merkmal	P – Wert	OR	95 %-CI
<b>Allel G</b>	0,3294	0,875	0,668 – 1,145
<b>Genotyp GG</b>	0,2871	0,453	0,102 – 2,021
<b>Genotyp TG</b>	0,5239	0,908	0,675 – 1,222
<b>Genotyp TT</b>	0,4123	0,885	0,660 – 1,186

*Tabelle 34: Signifikanz, Odds Ratio und 95 %-Konfidenzintervall genetischer Merkmale bei SSc-Patienten mit digitalen Ulzerationen.*

#### 5.2.4. Assoziation der Genotypen mit serologischen Parametern

Um auch in der französischen Kohorte den Zusammenhang zwischen Polymorphismus und Antikörper-Status der Patienten zu überprüfen, wurden die Genotypen mit dem Auftreten von Auto-Antikörpern gegen Topoisomerase I (Anti-Scl70) und Anti-Centromer-Antikörpern (ACA) verglichen.

Dabei hatten bei den Anti-Scl70 positiven SSc-Kranken 76,9 % den Genotyp TT, 21,5 % TG und 1,6 % GG. Die MAF betrug 0,124.

Genotypen	Absolute (relative) Häufigkeit bei Anti-Scl70+-SSc-Patienten (n=247)	Absolute (relative) Häufigkeit bei Kontrollen (n=998)
<b>TT</b>	190 (76,9 %)	745 (74,7 %)
<b>TG</b>	53 (21,5 %)	240 (24,1%)
<b>GG</b>	4 (1,6%)	13 (1,3 %)

*Tabelle 35: Verteilung der Genotypen bei Sklerodermie-Patienten mit positivem Antitopoisomerase I-Antikörperstatus.*

Bei ACA-Positiven war TT mit 75,1 %, TG mit 22,7 % und GG mit 1,9 % vertreten. Die G Minor-Allel-Frequenz errechnete sich zu 0,132.

Auch in Bezug auf den Antikörper-Status war weder Positivität für Anti-Scl70 noch für ACA signifikant mit bestimmten Genotypen korreliert (siehe Tabelle 37 und 38).



Genotypen	Absolute (relative) Häufigkeit bei ACA+ -SSc-Patienten (n=370)	Absolute (relative) Häufigkeit bei Kontrollen (n=998)
<b>TT</b>	279 (75,4 %)	745 (74,7 %)
<b>TG</b>	84 (22,7 %)	240 (24,1%)
<b>GG</b>	7 (1,9 %)	13 (1,3 %)

*Tabelle 36.: Verteilung der Genotypen bei Sklerodermie-Patienten mit positivem Anti-Centromer-Antikörperstatus.*

Merkmal	P – Wert	OR	95 %-CI
<b>Allel G</b>	0,5643	0,916	0,680 – 1,234
<b>Genotyp GG</b>	0,7448	1,206	0,389 – 3,742
<b>Genotyp TG</b>	0,4027	0,866	0,618 – 1,213
<b>Genotyp TT</b>	0,4594	0,883	0,636 – 1,227

*Tabelle 37: Signifikanz, Odds Ratio und 95 %-Konfidenzintervall genetischer Merkmale bei SSc-Patienten mit positivem Anti-Scl70-Status.*

Merkmal	P – Wert	OR	95 %-CI
<b>Allel G</b>	0,9545	0,993	0,774 – 1,273
<b>Genotyp GG</b>	0,4413	1,438	0,568 – 3,641
<b>Genotyp TG</b>	0,6406	0,935	0,704 – 1,242
<b>Genotyp TT</b>	0,7746	0,960	0,729 – 1,266

*Tabelle 38: Signifikanz, Odds Ratio und 95 %-Konfidenzintervall genetischer Merkmale bei SSc-Patienten mit positivem ACA-Status.*

### 5.3. Zusammenfassung beider Kohorten

Zur weiteren Überprüfung der Ergebnisse und um eine bessere Aussagekraft mit höherer statistischer Power zu erhalten, wurden zuletzt beide Kohorten zu einer Gruppe mit größerer Patienten-Zahl zusammengefasst. Damit erreichten wir ein Kollektiv von 1200 SSc-Patienten, sowie die Zahl von 1632 gesunden Kontroll-Personen. Es wurden dieselben Parameter wie zuvor in den beiden Einzel-Kohorten überprüft.

#### 5.3.1 Ergebnisse der Genotypisierung

87,1 % der Patienten waren Träger des Allels T, 12,2 % des Allels G, bei den Gesunden ließ sich bei 86,7 % ein T- und bei ebenfalls 12,2 % ein G-Allel nachweisen.

Allele	Absolute (relative ) Häufigkeit bei SSc-Patienten (n=1.200)	Absolute (relative) Häufigkeit bei Kontrollen (n=1.632)
<b>T</b>	2.091 (87,1 %)	2831 (86,7 %)
<b>G</b>	293 (12,2 %)	399 (12,2 %)

*Tabelle 39: Allel-Frequenzen bei Patienten und Kontrollen der zusammengefassten Kohorte.*

Bei Bestimmung des Genotyps zeigten 76,6 % TT, 20,9 % TG und 1,8 % der Patienten GG. Damit unterschieden sie sich nur unwesentlich von der genetischen Konstellation der Kontrollgruppe mit 76,1 % TT, 21,3 % TG und 1,6 % GG. Die Verteilung der verschiedenen Genotypen wich nicht vom nach Hardy-Weinberg-Equilibrium erwarteten Wert von 1,67 ab. Weder Genotyp GG, noch die Heterozygotie TG oder Genotyp TT waren signifikant ( $p$  jeweils  $> 0,05$ ) mit

erhöhtem oder erniedrigten Risiko für SSc in Verbindung zu bringen (OR jeweils bei Werten um 1).

Genotypen	Absolute (relative) Häufigkeit bei SSc-Patienten (n=1200)	Absolute (relative) Häufigkeit bei Kontrollen (n=1.632)
<b>TT</b>	920 (76,7 %)	1.242 (76,1 %)
<b>TG</b>	251 (20,9 %)	347 (21,3 %)
<b>GG</b>	21 (1,8 %)	26 (1,6 %)

Tabelle 40: Verteilung der verschiedenen Genotypen im zusammengefassten Patienten- und Kontroll-Kollektiv.

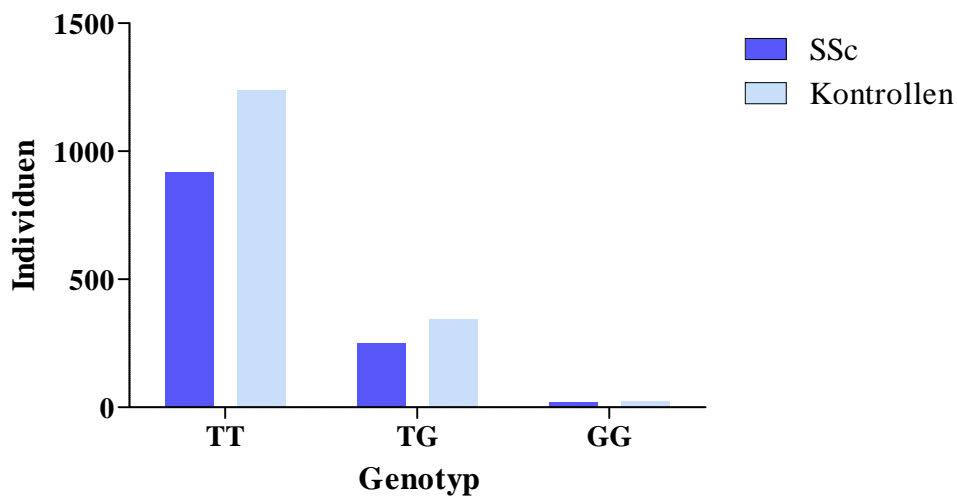


Abb. 11: Verteilung der Genotypen TT, TG und GG in der zusammengefassten Kohorte

Merkmal	P- Wert	OR	95 %- CI
<b>Allel G</b>	0,9764	0,9942	0,8463 – 1,168
<b>Genotyp GG</b>	0,8743	1,095	0,6131 – 1,956
<b>Genotyp TG</b>	0,8198	0,9747	0,8117 – 1,170
<b>Genotyp TT</b>	0,8988	1,016	0,8501 – 1,214

*Tabelle 41: Signifikanz, Odds Ratio und 95 %- Konfidenzintervall genetischer Merkmale bei SSc-Patienten der zusammengefassten Kohorte.*

### 5.3.2. Assoziation der Genotypen mit klinischen Parametern

Bei der Analyse der SSc-Patienten mit diffus kutaner SSc ergaben sich für Genotyp TT 77,8 % für TG 68 % und für GG 1,8 %. Hinsichtlich der dcSSc war kein Genotyp signifikant damit verknüpft.

Genotypen	Absolute (relative) Häufigkeit bei dcSSc-Patienten (n=334)	Absolute (relative) Häufigkeit bei Kontrollen (n=1.632)
<b>TT</b>	260(77,8 %)	1.242 (76,1 %)
<b>TG</b>	68 (20,4 %)	347 (21,3 %)
<b>GG</b>	6 (1,8 %)	26 (1,6 %)

*Tabelle 42: Verteilung der verschiedenen Genotypen im zusammengefassten dcSSc-Patienten- und Kontroll-Kollektiv.*

Merkmal	P- Wert	OR	95 %- CI
<b>Allel G</b>	0,8325	0,9611	0,7290 – 1,267
<b>Genotyp GG</b>	0,8127	1,118	0,4564 – 2,738
<b>Genotyp TG</b>	0,0772	1,312	0,9729 – 1,770
<b>Genotyp TT</b>	0,7749	1,055	0,7951 – 1,400

*Tabelle 43: Signifikanz, Odds Ratio und 95 %- Konfidenzintervall genetischer Merkmale bei dcSSc-Patienten der zusammengefassten Kohorte.*

Bei der Genotypisierung der SSc-Kranken mit fibrosierender Alveolitis führte TT mit 75,5 %, gefolgt von TG mit 22,5 % und GG mit 1,9 %.

Genotypen	Absolute (relative) Häufigkeit bei Patienten mit fibrosierender Alveolitis (n=368)	Absolute (relative) Häufigkeit bei Kontrollen (n=1.632)
<b>TT</b>	278 (75,5 %)	1.242 (76,1 %)
<b>TG</b>	83 (22,5%)	347 (21,3 %)
<b>GG</b>	7 (1,9 %)	26 (1,6 %)

*Tabelle 44: Verteilung der verschiedenen Genotypen der zusammengefassten Patienten mit fibrosierender Alveolitis und des Kontroll-Kollektivs.*

Wie schon in der französischen Kohorte ließ sich auch im zusammengefassten Studienkollektiv kein signifikanter p-Wert ( $p = 0,6742$ ) feststellen. Zudem trat dabei auch eine OR von 1,064 im 95 % Konfidenzintervall von 0,8109 bis 1,397 auf. Damit konnte der signifikante p-Wert für Genotyp TG beim Kollektiv der

Patienten mit fibrosierender Alveolitis aus der Erlanger Kohorte im Vergleich zur Kontrollpopulation nicht bestätigt werden.

Merkmal	P- Wert	OR	95 %- CI
<b>Allel G</b>	0,3770	1,128	0,8791 – 1,448
<b>Genotyp GG</b>	0,6538	1,185	0,5103 – 2,752
<b>Genotyp TG</b>	0,6742	1,064	0,8109 – 1,397
<b>Genotyp TT</b>	0,5852	0,9277	0,7121 – 1,208

*Tabelle 45: Signifikanz, Odds Ratio und 95 %- Konfidenzintervall genetischer Merkmale bei Patienten mit Lungenfibrose in der zusammengefassten Kohorte.*

In der Subgruppe der SSc-Patienten mit pulmonal arterieller Hypertonie hatten 75,6 % TT, 15,1 % TG und 1,2 % GG in der genetischen Analyse. Kein Genotyp war signifikant mit PAH korreliert.

Genotypen	Absolute (relative) Häufigkeit bei Patienten mit pulmonal arterieller Hypertonie (n=86)	Absolute (relative) Häufigkeit bei Kontrollen (n=1.632)
<b>TT</b>	65 (75,6 %)	1.242 (76,1 %)
<b>TG</b>	13 (15,1%)	347 (21,3 %)
<b>GG</b>	1 ( 1,2 %)	26 (1,6 %)

*Tabelle 46: Verteilung der verschiedenen Genotypen im zusammengefassten Kollektiv der Patienten mit pulmonaler Hypertonie und Kontrollen.*

Merkmal	P- Wert	OR	95 %- CI
<b>Allel G</b>	0,4395	0,7646	0,4281 – 1,366
<b>Genotyp GG</b>	1,000	0,7835	0,1049 – 5,862
<b>Genotyp TG</b>	1,000	1,011	0,5493 – 1,862
<b>Genotyp TT</b>	0,3362	1,394	0,7736 – 2,513

*Tabelle 47: Signifikanz, Odds Ratio und 95 %- Konfidenzintervall genetischer Merkmale bei Patienten mit pulmonal arterieller Hypertonie in der zusammengefassten Kohorte.*

Betrachtet man die Genotypen der Patienten, die zusätzlich digitale Ulzerationen aufweisen, so findet man bei 78,1 % TT, 21,3 % TG und 0,5 % GG. Diese waren jedoch nicht relevant mit dem klinischen Merkmal assoziiert.

Genotypen	Absolute (relative) Häufigkeit bei Patienten mit digitalen Ulzerationen (n=361)	Absolute (relative) Häufigkeit bei Kontrollen (n=1.632)
<b>TT</b>	282 (78,1 %)	1.242 (76,1 %)
<b>TG</b>	77 (21,3 %)	347 (21,3 %)
<b>GG</b>	2 (0,5 %)	26 (1,6 %)

*Tabelle 48: Verteilung der verschiedenen Genotypen bei Patienten mit digitalen Ulzerationen und Kontrollen.*

Merkmal	P- Wert	OR	95 %- CI
<b>Allel G</b>	0,7535	0,9493	0,7266 – 1,240
<b>Genotyp GG</b>	0,3389	0,5107	0,1537 – 1,697
<b>Genotyp TG</b>	1,000	0,9873	0,7474 – 1,304
<b>Genotyp TT</b>	0,6776	1,072	0,8142 – 1,412

*Tabelle 49: Signifikanz, Odds Ratio und 95 %- Konfidenzintervall genetischer Merkmale bei Patienten mit digitalen Ulzerationen in der zusammengefassten Kohorte.*

### 5.3.3. Assoziation der Genotypen mit serologischen Parametern

Die Genotypisierung der an SSc-Erkrankten mit positivem Anti-Topoisomerase1-Antikörperstatus (=Anti-Scl70+) ordnete 77,1 % der Patienten Genotyp TT, weiterhin 20,2 % TG und 1,5 % GG zu, ohne jedoch einen signifikanten Zusammenhang zwischen Genotyp und Positivität für Anti-Scl70 nachzuweisen.

Genotypen	Absolute (relative) Häufigkeit bei Anti-Scl70+-Patienten (n=262)	Absolute (relative) Häufigkeit bei Kontrollen (n=1.632)
<b>TT</b>	202 (77,1 %)	1.242 (76,1 %)
<b>TG</b>	53 (20,2 %)	347 (21,3 %)
<b>GG</b>	4 (1,5 %)	26 (1,6 %)

*Tabelle 50: Verteilung der verschiedenen Genotypen bei Patienten mit positivem Anti-Scl70-Antikörperstatus und im Kontroll-Kollektiv.*



Merkmal	P- Wert	OR	95 %- CI
<b>Allel G</b>	0,9867	0,9907	0,7319 – 1,341
<b>Genotyp GG</b>	1,000	0,9475	0,3279 – 2,738
<b>Genotyp TG</b>	1,000	0,9934	0,7225 – 1,366
<b>Genotyp TT</b>	1,000	1,011	0,7411 – 1,379

*Tabelle 51: Signifikanz, Odds Ratio und 95 %- Konfidenzintervall genetischer Merkmale bei Anti-Scl-positiven Patienten der zusammengefassten Kohorte.*

Bei den Anti-Centromer-Antikörper-positiven (ACA+) Patienten fielen 76,9 % auf die Basenkonstellation TT, 22,4 % auf TG und 1,8 % auf GG. Auch für diese Antikörper-Gruppe mangelte es an signifikanter Assoziation eines Genotyps mit dem serologischen Status, sodass letztendlich keine Assoziation des SNP rs2241766 mit den überprüften klinischen und serologischen Parametern bei SSc festzustellen war.

Genotypen	Absolute (relative) Häufigkeit bei ACA+-Patienten (n=385)	Absolute (relative) Häufigkeit bei Kontrollen (n=1.632)
<b>TT</b>	296 (76,9 %)	1.242 (76,1 %)
<b>TG</b>	86 (22,4 %)	347 (21,3 %)
<b>GG</b>	7 (1,8 %)	26 (1,6 %)

*Tabelle 52: Verteilung der verschiedenen Genotypen im zusammengefassten ACA-positiven Patienten- und Kontroll-Kollektiv.*

Merkmal	P- Wert	OR	95 %- CI
<b>Allel G</b>	0,8280	1,037	0,8051 – 1,336
<b>Genotyp GG</b>	0,6550	1,179	0,5075 – 2,737
<b>Genotyp TG</b>	0,8423	1,037	0,7938 – 1,355
<b>Genotyp TT</b>	0,6621	0,9357	0,7226 – 1,212

*Tabelle 53: Signifikanz, Odds Ratio und 95 %- Konfidenzintervall genetischer Merkmale bei ACA-positiven Patienten der zusammengefassten Kohorte.*

## **6. Diskussion**

Bei der Pathogenese vieler Autoimmunkrankheiten wie der Multiplen Sklerose, dem Systemischen Lupus Erythematoses, der Rheumatoiden Arthritis aber auch der Systemischen Sklerose spielen genetische Risikofaktoren eine bedeutende Rolle. Die Bestimmung genetischer Assoziationen mit unterschiedlichen Krankheiten basiert dabei häufig auf der Identifizierung einzelner Suszeptibilitätsgene und -loci im humanen Genom.

Bezüglich der Systemischen Sklerose wurden so schon über 1800 Kandidatengene identifiziert, beispielsweise die Gene für SPARC, MHC, FBN1 und TOPO1, also solche Gene, die durch ihre Genprodukte profibrotische oder autoimmunologische Prozesse modulieren [105].

Auch verschiedenen SNPs in Genen wie BANK1, STAT4, FBN1 oder CTGF konnte ein signifikanter Zusammenhang mit Merkmalen der SSc nachgewiesen werden (vgl. Kap. 3.2.4., Tabelle 3). Polymorphismen speziell im ADIPOQ-Gen wurden bisher jedoch meist mit Erkrankungen des metabolischen Syndroms in Verbindung gebracht (vgl. Kap. 3.4.3., Tabelle 4). Aufgrund wiederholt nachgewiesener Einflüsse von ADIPOQ auf Inflammation, Angiogenese und Fibrose (vgl. Kap. 3.4.2.), wichtigen Faktoren in der Pathogenese der SSc, ergibt sich die Notwendigkeit, die Auswirkungen von Veränderungen in diesem Gen auf die SSc zu untersuchen.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in dieser Dissertation der Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) +45T>G (rs2241766) in der kodierenden Sequenz (CDS) des Adiponectin-Gens in Bezug auf die Systemische Sklerose analysiert. Unsere Hypothese lautete, dass dieser Polymorphismus die Suszeptibilität für SSc oder das Auftreten klinischer und serologischer Parameter beeinflussen könnte.

Zu diesem Zweck wurde in zwei verschiedenen Fall-Kontroll-Studien, mit SSc-Patienten als Untersuchungsgruppe und gesunden Probanden als Kontrollpopulation, die Häufigkeit der bestimmten Genotypen, also GG, GT oder

TT, bei Erkrankten und nicht Betroffenen ermittelt. Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der Allele könnten dabei auf eine erhöhte oder erniedrigte Suszeptibilität für SSc hindeuten. In einem zweiten Schritt wurde in beiden Kohorten überprüft, ob bestimmte Genotypen eine signifikante Assoziation zu ausgewählten klinischen Symptomen der Erkrankung oder serologischen Befunden, wie dem Antikörper-Status, aufweisen.

Zusammengefasst konnten wir in unserer Studie keine signifikante Assoziation der Genotypen GG, TG oder TT mit der SSc finden. Ebenso wenig waren die Subgruppe der dcSSc-Patienten, die klinischen Parameter fibrosierende Alveolitis, pulmonal arterielle Hypertonie und digitale Ulzerationen, oder der Auto-Antikörperstatus bezüglich Anti-Scl70 und ACA mit bestimmten Genotypen assoziiert. Obwohl es schwierig sein dürfte, den ursächlichen Grund für das Misslingen des Nachweises signifikanter Assoziationen nachzuweisen, sollten mehrere Möglichkeiten, unter anderem Beschränkungen im Studiendesign, in Betracht gezogen werden, die im Folgenden dargestellt werden.

Der einzige in der Erlanger Kohorte signifikante p-Wert von 0,0343 bezüglich des Genotyps TG bei fibrosierender Alveolitis konnte in der französischen Kohorte nicht bestätigt werden. Dies mag an der zu kleinen und damit nicht ausreichend repräsentativen Zahl an SSc-Patienten im Erlanger Kollektiv (188) liegen, die im Vergleich zur Kohorte der Université Descartes (1.012) deutlich geringer war und damit falsch-positive Resultate produzieren könnte. Die niedrige Zahl an SSc-Patienten erklärt auch die deutliche Abweichung der gefundenen Allelfrequenzen für Allel G (0,080) und T (0,105) vom zu erwartenden Wert aus der HapMap Datenbank ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=rs2241766](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs2241766)), wonach Allel G (0,273) häufiger auftreten müsste als in unserer Untersuchung. Dies mag jedoch auch Folge differierender Allelfrequenzen bei ethnisch verschiedenen Populationen sein, weshalb dieser SNP in Gruppen unterschiedlichen ethnischen Ursprungs weitergehend überprüft werden sollte.

Zudem könnte inadäquates Studiendesign aufgrund Patienten-Rekrutierung aus dem SSc-Kollektiv nur einer Klinik, deren diagnostische Kriterien zur Zuordnung

zur SSc sich möglicherweise von anderen Kliniken unterscheiden, einen nicht zu unterschätzenden Selektions-Bias darstellen.

Zu beachten ist auch, dass in Folge der multifaktoriellen Genese der SSc die Summe anderer genetischer Riskofaktoren (z. B. bei familiärer Prädisposition) stärkere Effekte auf die Pathogenese ausüben wird, als der Polymorphismus +45T>G alleine, der dadurch in seinem Beitrag zur Krankheitsentstehung unterschätzt werden könnte und deswegen in der genetischen Untersuchung nicht signifikant mit SSc assoziiert erscheint. Eine genauere Bewertung ist also nur in Zusammenschau mit anderen genetischen Veränderungen zielführend.

Um die multifaktorielle Genese dieser Erkrankung weiterhin zu berücksichtigen, sollten außerdem weitere SNPs im ADIPOQ-Gen analysiert werden, da diese entweder für sich alleine oder über gemeinsames, nicht-unabhängiges Auftreten mit dem SNP rs2241766 im Sinne eines *linkage disequilibrium* (LD) Einfluss nehmen könnten. So wurde bereits nachgewiesen, dass der SNP +45T>G in einem *linkage disequilibrium* Abschnitt lokalisiert ist, der von Intron 1 bis Exon 3 des Adiponectin-Gens reicht, womit andere Polymorphismen indirekt Effekte bewirken können [87]. Solche SNPs liegen beispielsweise in der Promotor-Region oder in Introns und beeinflussen über Veränderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren, der Stabilität der mRNA oder des Splicings die Genexpression [85]. Ein Anhaltspunkt dafür ist das gemeinsame Auftreten der SNPs rs1501299, rs266729 oder rs17300539 mit dem SNP rs2241766, der dadurch signifikant stärkere Assoziation zu Veränderungen im ADIPOQ-Plasmaspiegel und Typ 2 Diabetes bekommt [42], [94]. Es ist nicht auszuschließen, dass solch ein *linkage disequilibrium* auch bei Patienten mit SSc besteht, weshalb die Untersuchung mehrerer Polymorphismen nützlich wäre.

Um genauere Aussagen bezüglich der Auswirkung dieser multifaktoriellen genetischen Veränderungen auf die Proteinsynthese des Adiponectin treffen zu können, ist es zudem sinnvoll, zusätzlich zur Genotypisierung die Adiponectin-Serumspiegel oder -Genexpression bei Patienten und Kontrollen zu bestimmen. Damit könnte nachgewiesen werden, ob bestimmte Genotypen, auch wenn sie

nicht unmittelbar mit erhöhtem Auftreten bei SSc assoziiert sind, aber indirekt über veränderte Adiponectin-Spiegel in die Pathogenese dieser Erkrankung involviert sind. Derartige Einflüsse auf den Adiponectin-Spiegel wurden für den SNP rs2241766 schon für Typ 2 Diabetes mellitus, koronare Herzkrankheit und Adipositas untersucht und bestätigt (vgl. Kap. 3.4.3., Tabelle 4).

Die untersuchte, an sich stille Mutation +45 T>G, durch die weiterhin Glycin an Position 15 in der Aminosäuresequenz des Proteins bestehen bleibt (Gly15Gly), kann durch oben beschriebene Prozesse ebenfalls die transferierte Proteinmenge verändern. Nützlich wäre es jedoch zusätzlich SNPs zu untersuchen, die durch Missense- oder Dissense-Mutationen direkt die Aminosäurefolge beeinflussen. Solche wären beispielsweise der SNP +331T>C, der in Exon 3 den Wandel von Tyrosin zu Histidin (Tyr111His) bewirkt, oder SNP +268G>A, der ebenfalls in Exon 3 liegt und den Austausch von Glycin gegen Serin (Gly90Ser) verursacht. Beiden Polymorphismen wurde ein signifikanter Zusammenhang mit erhöhtem Risiko für Typ 2 Diabetes mellitus und verändertem Adiponectin-Serumspiegel nachgewiesen (vgl. Kap. 3.4.3., Tabelle 4).

Eine neuere Studie, die speziell die Auswirkungen der Polymorphismen rs2241766 und rs1501299 im Adiponectin-Gen hinsichtlich der Korrelation zum Systemischen Lupus Erythematodes analysiert hat, ergab dabei ebenfalls keine relevante Assoziation dieser SNPs mit der untersuchten Erkrankung [27]. Da der SLE auch dem Formenkreis der Kollagenosen zugerechnet wird und damit der SSc in Pathogenese als entfernt verwandt betrachtet werden kann [7], besteht auch die Möglichkeit, dass tatsächlich keiner der erwähnten Polymorphismen signifikant mit SSc assoziiert ist. Somit wäre die Hypothese, dass Adiponectin als Suszeptibilitäts-gen der SSc anzusehen ist, abzulehnen.

Andererseits muss berücksichtigt werden, dass nicht zwingend das Adiponectin-Gen oder -Protein selbst verändert sein muss um Einfluss auf die SSc zu bekommen. So könnten auch die Anzahl der Adiponectin-Rezeptoren des peripheren Gewebes oder Moleküle aus dem intrazellulärem Signalweg, durch den ADIPOQ seine Wirkung erzielt, Veränderungen erfahren, die sich auf die

Pathogenese oder das klinische Erscheinungsbild der Erkrankung auswirken. Derartige Veränderungen in der intrazellulären Signalweitergabe wurden bei der SSc bereits nachgewiesen, unter anderem im Signaling des profibrotisch wirkenden TGF $\beta$  [82].

Eine erhöhte Expression von ADIPOQ muss zudem nicht zwangsläufig mit bestimmten Polymorphismen auf Gen-Ebene assoziiert sein. Die gesteigerte Translation des Proteins kann ebenso durch erhöhtes Enhancer-Aufkommen oder andere nicht direkt auf DNA-Basis ablaufende Faktoren zurückzuführen sein. So ließe sich erklären, dass trotz unauffälliger DNA-Struktur im ADIPOQ-Gen veränderte Proteinmengen resultieren.

Aus neueren Untersuchungen hat sich außerdem ergeben, dass die Adiponectin-Synthese bei SSc nicht nur auf Adipozyten beschränkt ist, sondern auch Fibroblasten dieses Protein bilden können und zudem aus Adipozyten Fibroblasten und vice versa entstehen können. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass in SSc-Hautgewebe eben diese Fibroblasten überschießend extrazelluläre Matrix produzieren und sowohl ADIPOQ als einziges Adipozytokin, als auch, dadurch bedingt, das proinflammatorische Zytokin MCP1 überexprimiert sind [25]. Damit wurde für die SSc neben der bekannten Fibroblasten-Überaktivierung erstmals eine Interaktion zwischen Haut- und Fettgewebe aufgezeigt, wodurch anzunehmen bleibt, dass Adiponectin, als Adipozytokin mit der höchsten Serumkonzentration, ein kleines Teil im großen Konglomerat der Pathogenese der SSc darstellt [25].

In jedem Fall sind daher zusätzliche Untersuchungen nötig um abschließend eine Aussage über die Assoziation von Adiponectin und verschiedener genetischer Polymorphismen im ADIPOQ-Gen auf Pathogenese und klinisches Erscheinungsbild der Systemischen Sklerose treffen zu können, da Adiponectin aufgrund seines Einflusses auf Fibrosierung, Entzündung und Vaskulopathie weiterhin als Suszeptibilitätsgen der SSc anzusehen ist.

## **7. Literaturverzeichnis**

- [1] Abraham, D.J., und Varga, J. (2005): Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to diseasemodels. *Trends Immunol*, **26**, 587–595.
- [2] Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomuraa, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., Kuriyama, H., Nishida, M., Yamashita, S., Okubo, K., Matsubara, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T. und Matsuzawa, Y. (1999): Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 79–83.
- [3] Arnett, F.C. (1995): HLA and autoimmunity in scleroderma (systemic sclerosis). *Int Rev Immunol*, **12**, 107–128.
- [4] Arnett, F.C., Cho, M., Chatterjee, S., Aguilar, M.B., Reveille, J.D. und Mayes, M.D. (2001): Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum*, **44** (6), 1359–1362.
- [5] Arnett, F.C., Gourh, P., Shete, S., Ahn, C.W., Honey, R., Agarwal, S.K., Tan, F.K., McNearney, T., Fischbach, M., Fritzler M.J., Mayes, M.D. und Reveille, J.D. (2010): Major Histocompatibility Complex (MHC) class II alleles, haplotypes, and epitopes which confer susceptibility or protection in the fibrosing autoimmune disease systemic sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls. *Ann Rheum Dis.*, **69** (5), 822-827.
- [6] Artlett, C.M., Smith, J.B. und Jimenez, S.A. (1998): Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N Engl J Med*, **338**, 1186-91.



- [7] Assassi, S., Mayes, M.D., Arnett, F.C., Gourh, P., Agarwal, S.K., McNearney, T.A., Chaussabel, D., Oommen, N., Fischbach, N., Shah, K.R., Charles, J., Pascual, V., Reveille, J.D. und Tan F.K. (2010): Systemic sclerosis and lupus: points in an interferon-mediated continuum. *Arthritis Rheum*, **62** (2), 589-98.
- [8] Baroni, S.S., Santillo, M., Bevilacqua, F., Luchetti, M., Spadoni, T., Mancini, M., Fraticelli, P., Sambo, P., Funaro, A., Kazlauskas, A., Avvedimento, E.V. und Gabrielli, A. (2006): Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med*, **354** (25), 2667-2676.
- [9] Berner, H.S., Lyngstadaas, S.P., Spahr, A., Monjo, M., Thommesen, L., Drevon, C.A., Syversen, U. und Reseland, J.E. (2004): Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. *Bone*, **35**, 842–849.
- [10] Berthier, M.T., Houde, A., Cote, M., Paradis, A.M., Mauriege, P., Bergeron, J., Gaudet, D., Després, J.P. und Vohl, M.C. (2005): Impact of adiponectin gene polymorphisms on plasma lipoprotein and adiponectin concentrations of viscerally obese men. *J LipidRes*, **46**, 237-244.
- [11] Black, C.M. (1993): Scleroderma—clinical aspects. *J Intern Med*, **234**, 115.
- [12] Brookes, A.J. (1999): The essence of SNPs. *Gene*, **234** (2), 177-186.
- [13] Bruun, J.M., Lihn, A.S., Verdich, C., Pedersen, S.B., Toubro, S., Astrup, A. und Richelsen, B. (2003): Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **285**, 527–533.

- [14] Canello, R., Henegar, C., Viguerie, N., Taleb, S., Poitou, C., Rouault, C., Coupaye, M., Pelloux, V., Hugol, D., Bouillot, J.L., Bouloumié, A., Barbatelli, G., Cinti, S., Svensson, P.A., Barsh, G.S., Zucker, J.D., Basdevant, A., Langin, D. und Clément, K. (2005): Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery induced weight loss. *Diabetes*, **54**, 2277–2286.
- [15] Chang, Y.C., Jiang, J.Y., Jiang, Y.D., Chiang, F.T., Hwang, J.J., Lien, W.P. und Chuang, L.M. (2009): Interaction of ADIPOQ genetic polymorphism with blood pressure and plasma cholesterol level on the risk of coronary artery disease. *Circ J*, **73** (10), 1934-1938.
- [16] Charles, C., Clements, P. und Furst, D.E. (2006): Systemic sclerosis: hypothesis-driven treatment strategies *Lancet*, **367**, 1683–1691.
- [17] Chiffot, H., Fautzi, B., Sordet, C., Chatelus, E. und Sibilia, J. (2008): Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum*, **37**, 223-235.
- [18] Combs, T.P., Berg, A.H., Obici, S., Scherer, P.E. und Rossetti, L. (2001): Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest*, **108**, 1875–1881.
- [19] D'Angelo, W.A., Fries, J.F., Masi, A.T. und Shulman, L.E. (1969): Pathologic observations in systemic sclerosis (scleroderma). A study of fifty-eight autopsy cases and fifty-eight matched controls. *Am J Med*, **46**, 428-440.
- [20] De Sanctis, J.B., Zabaleta, M., Bianco, N.E., Garmendia, J.V. und Rivas, L. (2009): Serum adipokine levels in patients with systemic lupus erythemathodes. *Autoimmunity*, **42** (4), 272-274.

- [21] Dieudé, P., Guedj, M., Wipff, J., Ruiz, B., Hachulla, E., Diot, E., Granel, B., Sibilia, J., Mouthon, L., Cracowski, J.L., Carpentier, P.H., Amoura, Z., Fajardy, I., Avouac, J., Meyer, O., Kahan, A., Boileau, C. und Allanore, Y. (2009): STAT4 is a genetic risk factor for systemic sclerosis having additive effects with IRF5 on disease susceptibility and related pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum*, **60** (8), 2472-2479.
- [22] Dieudé, P., Wipff, J., Guedj, M., Ruiz, B., Melchers, I., Hachulla, E., Riemekasten, G., Diot, E., Hunzelmann, N., Sibilia, J., Tiev, K., Mouthon, L., Cracowski, J.L., Carpentier, P.H., Distler, J., Amoura, Z., Tarner, I., Avouac, J., Meyer, O., Kahan, A., Boileau, C. und Allanore, Y. (2009): BANK1 is a genetic risk factor for diffuse cutaneous systemic sclerosis and has additive effects with IRF5 and STAT4. *Arthritis Rheum*, **60** (11), 3447-3454.
- [23] Dieudé, P., Guedj, M., Wipff, J., Avouac, J., Fajardy, I., Diot, E., Granel, B., Sibilia, J., Cabane, J., Mouthon, L., Cracowski, J.L., Carpentier, P.H., Hachulla, E., Meyer, O., Kahan, A., Boileau, C. und Allanore, Y. (2009): Association between the IRF5 rs2004640 functional polymorphism and systemic sclerosis: a new perspective for pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum*, **60**, 225–233.
- [24] Distler, J.H., Schett, G., Gay, S. und Distler, O. (2008): The Controversial Role of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  in Fibrotic Diseases. *Arthritis Rheum*, **58** (8), 2228–2235.
- [25] Distler, O. (2010): Adiponectin decreases the accumulation of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis. *in submission*.
- [26] Ehling, A., Schäffler, A., Herfarth, H., Tarner, I.H., Anders, S., Distler, O., Paul, G., Distler, J., Gay, S., Schölmerich, J., Neumann, E. und Müller-

- Ladner, U. (2006): The potential of adiponectin in driving arthritis. *Journal of Immunology*, **176**, 4468–4478.
- [27] Fang, W.L., Zhou, B., Wang Y.Y., Chen, Y. und Zhang, L. (2010): Analysis of adiponectin gene polymorphisms in Chinese population with systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol*, **2010**, 401537.
- [28] Feghali-Bostwick, C., Medsger, T.A., Jr. und Wright, T.M. (2003): Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum*, **48**, 1956–1963.
- [29] Fonseca, C., Lindahl, G.E., Ponticos, M., Sestini, P., Renzoni, E.A., Holmes, A.M., Spagnolo, P., Pantelidis, P., Leoni, P., McHugh, N., Stock, C.J., Shi-Wen, X., Denton, C.P., Black, C.M., Welsh, K.I., du Bois, R.M. und Abraham, D.J. (2007): A polymorphism in the CTGF promoter region associated with systemic sclerosis. *N Engl J Med*, **357** (12), 1210-1220.
- [30] Frazer, K.A., Ballinger, D.G., Cox, D.R., Hinds, D.A., Stuve, L.L., Gibbs, R.A., Belmont, J.W., Boudreau, A., Hardenbol, P., Leal, S.M., Pasternak, S., Wheeler, D.A., Willis, T.D., Yu, F., Yang, H., Zeng, C., Gao, Y., Hu, H., Hu, W., Li, C., Lin, W., Liu, S., Pan, H., Tang, X., Wang, J., Wang, W., Yu, J., Zhang, B., Zhang, Q., Zhao, H., Zhao, H., Zhou, J., Gabriel, S.B., Barry, R., Blumenstiel, B., Camargo, A., Defelice, M., Faggart, M., Goyette, M., Gupta, S., Moore, J., Nguyen, H., Onofrio, R.C., Parkin, M., Roy, J., Stahl, E., Winchester, E., Ziaugra, L., Altshuler, D., Shen, Y., Yao, Z., Huang, W., Chu, X., He, Y., Jin, L., Liu, Y., Shen, Y., Sun, W., Wang, H., Wang, Y., Wang, Y., Xiong, X., Xu, L., Wayne, M.M., Tsui, S.K., Xue, H., Wong, J.T., Galver, L.M., Fan, J.B., Gunderson, K., Murray, S.S., Oliphant, A.R., Chee, M.S., Montpetit, A., Chagnon, F., Ferretti, V., Leboeuf, M., Olivier, J.F., Phillips, M.S., Roumy, S., Sallée, C., Verner, A., Hudson, T.J., Kwok, P.Y., Cai, D., Koboldt, D.C., Miller,

R.D., Pawlikowska, L., Taillon-Miller, P., Xiao, M., Tsui, L.C., Mak, W., Song, Y.Q., Tam, P.K., Nakamura, Y., Kawaguchi, T., Kitamoto, T., Morizono, T., Nagashima, A., Ohnishi, Y., Sekine, A., Tanaka, T., Tsunoda, T., Deloukas, P., Bird, C.P., Delgado, M., Dermitzakis, E.T., Gwilliam, R., Hunt, S., Morrison, J., Powell, D., Stranger, B.E., Whittaker, P., Bentley, D.R., Daly, M.J., de Bakker, P.I., Barrett, J., Chretien, Y.R., Maller, J., McCarroll, S., Patterson, N., Pe'er, I., Price, A., Purcell, S., Richter, D.J., Sabeti, P., Saxena, R., Schaffner, S.F., Sham, P.C., Varilly, P., Altshuler, D., Stein, L.D., Krishnan, L., Smith, A.V., Tello-Ruiz, M.K., Thorisson, G.A., Chakravarti, A., Chen, P.E., Cutler, D.J., Kashuk, C.S., Lin, S., Abecasis, G.R., Guan, W., Li, Y., Munro, H.M., Qin, Z.S., Thomas, D.J., McVean, G., Auton, A., Bottolo, L., Cardin, N., Eyheramendy, S., Freeman, C., Marchini, J., Myers, S., Spencer, C., Stephens, M., Donnelly, P., Cardon, L.R., Clarke, G., Evans, D.M., Morris, A.P., Weir, B.S., Tsunoda, T., Mullikin, J.C., Sherry, S.T., Feolo, M., Skol, A., Zhang, H., Zeng, C., Zhao, H., Matsuda, I., Fukushima, Y., Macer, D.R., Suda, E., Rotimi, C.N., Adebamowo, C.A., Ajayi, I., Aniagwu, T., Marshall, P.A., Nkwodimmah, C., Royal, C.D., Leppert, M.F., Dixon, M., Peiffer, A., Qiu, R., Kent, A., Kato, K., Niikawa, N., Adewole, I.F., Knoppers, B.M., Foster, M.W., Clayton, E.W., Watkin, J., Gibbs, R.A., Belmont, J.W., Muzny, D., Nazareth, L., Sodergren, E., Weinstock, G.M., Wheeler, D.A., Yakub, I., Gabriel, S.B., Onofrio, R.C., Richter, D.J., Ziaugra, L., Birren, B.W., Daly, M.J., Altshuler, D., Wilson, R.K., Fulton, L.L., Rogers, J., Burton, J., Carter, N.P., Clee, C.M., Griffiths, M., Jones, M.C., McLay, K., Plumb, R.W., Ross, M.T., Sims, S.K., Willey, D.L., Chen, Z., Han, H., Kang, L., Godbout, M., Wallenburg, J.C., L'Archevêque, P., Bellemare, G., Saeki, K., Wang, H., An, D., Fu, H., Li, Q., Wang, Z., Wang, R., Holden, A.L., Brooks, L.D., McEwen, J.E., Guyer, M.S., Wang, V.O., Peterson, J.L., Shi, M., Spiegel, J., Sung, L.M., Zacharia, L.F., Collins, F.S., Kennedy, K., Jamieson, R. und Stewart, J. (International HapMap Consortium) (2007): A second

generation human haplotype map of 3.1 million SNPs. *Nature*, **449** (7164), 851-861.

- [31] Fruebis, J., Tsao, T.S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M.R., Yen, F.T., Bihain, B.E. und Lodish, H.F. (2001): Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 2005–2010
- [32] Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M. und Shimomura, I. (2004): Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*, **114**, 1752–1761.
- [33] Gable, D.R., Matin, J., Whittall, R., Cakmak, H., Li, K.W., Cooper, J., Miller, G.J. und Humphries, S.E. (HIFMECH investigators) (2007): Common adiponectin gene variants show different effects on risk of cardiovascular disease and type 2 diabetes in European subjects. *Ann Hum Genet*, **71**, 453-466.
- [34] Gabrielli, A., Avvedimento, E.V. und Krieg, T. (2009): Mechanisms of disease. Scleroderma. *N Engl J Med*, **360**, 1989-2003.
- [35] Gardner, H., Shearstone, J.R., Bandaru, R., Crowell, T., Lynes, M., Trojanowska, M., Pannu, J., Smith, E., Jablonska, S., Blaszczyk, M., Tan, F.K. und Mayes, M.D. (2006): Gene profiling of scleroderma skin reveals robust signatures of disease that are imperfectly reflected in the transcript profiles of explanted fibroblasts. *Arthritis Rheum*, **54**, 1961-1973.
- [36] Gay, S., Jones, R.E., Jr., Huang, G.Q. und Gay, R.E. (1989): Immunohistologic demonstration of platelet-derived growth factor (PDGF)

and sis-oncogene expression in scleroderma. *J Invest Dermatol*, **92**, 301-303.

- [37] Gourh, P., Tan, F.K., Assassi, S., Ahn, C.W., McNearney, T.A., Fischbach, M., Arnett, F.C. und Mayes, M.D. (2006): Association of the PTPN22 R620W polymorphism with anti-topoisomerase I- and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, **54**, 3945-3953.
- [38] Gourh, P., Agarwal, S.K., Divecha, D., Assassi, S., Paz, G., Arora-Singh, R.K., Reveille, J.D., Shete, S., Mayes, D., Arnett, F.C. und Tan, F.K. (2009): Polymorphisms in TBX21 and STAT4 increase the risk of systemic sclerosis: Evidence of possible gene-gene interaction and alterations in Th1/Th2 cytokines. *Arthritis Rheum*, **60** (12), 3794-3806.
- [39] Granel, B., Allanore, Y., Chevillard, C., Arnaud, V., Marquet, S., Weiller, P.J., Durand, J.M., Harlé, J.R., Grange, C., Frances, Y., Berbis, P., Gaudart, J., de Micco, P., Kahan, A. und Dessein, A. (2006): IL13RA2 gene polymorphisms are associated with systemic sclerosis. *J Rheumatol*, **33** (10), 2015-2019.
- [40] Granel, B., Argiro, L., Hachulla, E., Fajardy, I., Weiller, P.J., Durand, J.M., Frances, Y., Dombey, A.M., Marquet, S., Lesavre, N., Disdier, P., Bernard, F., Hatron, P.Y. und Chevillard, C. (2010): Association Between a CTGF Gene Polymorphism and Systemic Sclerosis in a French Population. *J Rheumatol*, **37** (2), 351-358.
- [41] Gu, H.F., Abulaiti, A., Ostenson, C.G., Humphreys, K., Wahlestedt, C., Brookes, A.J. und Efendic, S. (2004): Single nucleotide polymorphisms in the proximal promoter region of the adiponectin (APM1) gene are associated with type 2 diabetes in Swedish caucasians. *Diabetes*, **53** (1), 31-35.

- [42] Hara, K., Boutin, P., Mori, Y., Tobe, K., Dina, C., Yasuda, K., Yamauchi, T., Otabe, S., Okada, T., Eto, K., Kadowaki, H., Hagura, R., Akanuma, Y., Yazaki, Y., Nagai, R., Taniyama, M., Matsubara, K., Yoda, M., Nakano, Y., Tomita, M., Kimura, S., Ito, C., Froguel, P. und Kadowaki, T. (2002): Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes*, **51** (2):536-40.
- [43] Heid, I.M., Wagner, S.A., Gohlke, H., Iglseder, B., Mueller, J.C., Cip, P., Ladurner, G., Reiter, R., Stadlmayr, A., Mackevics, V., Illig, T., Kronenberg, F. und Paulweber, B. (2006): Genetic Architecture of the APM1 Gene and Its Influence on Adiponectin Plasma Levels and Parameters of the Metabolic Syndrome in 1,727 Healthy Caucasians. *Diabetes*, **55** (2), 375-384.
- [44] Hivert, M.F., Manning, A.K., McAteer, J.B., Florez, J.C., Dupuis, J., Fox, C.S., O'Donnell, C.J., Cupples, L.A. und Meigs, J.B. (2008): Common Variants in the Adiponectin Gene (ADIPOQ) Associated With Plasma Adiponectin Levels, Type 2 Diabetes, and Diabetes-Related Quantitative Traits The Framingham Offspring Study. *Diabetes*, **57** (12), 3353-3359.
- [45] Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y., Takahashi, M., Matsuda, M., Okamoto, Y., Iwahashi, H., Kuriyama, H., Ouchi, N., Maeda, K., Nishida, M., Kihara, S., Sakai, N., Nakajima, T., Hasegawa, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Nakamura, T., Yamashita, S., Hanafusa, T. und Matsuzawa, Y. (2000): Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 1595–1599.
- [46] Hu, E., Liang, P., und Spiegelman, B.M. (1996): AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem*, **271**, 10697–10703.



- [47] Hug, C., Wang, J., Ahmad, N.S., Bogan, J.S., Tsao, T.S. und Lodish, H.F. (2004): T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 10308–10313.
- [48] Iwashima, Y., Katsuya, T., Ishikawa, K., Ouchi, N., Ohishi, M., Sugimoto, K., Fu, Y., Motone, M., Yamamoto, K., Matsuo, A., Ohashi, K., Kihara, S., Funahashi, T., Rakugi, H., Matsuzawa, Y. und Ogihara, T. (2004): Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension. *Hypertension*, **43**, 1318–1323.
- [49] Kadowaki, T. und Yamauchi, T. (2005): Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine Reviews*, **26**, 439–451.
- [50] Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K. und Tobe, K. (2006): Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*, **116** (7), 1784-1792.
- [51] Kamada, Y., Takehara, T. und Hayashi, N. (2008): Adipocytokines and liver disease. *J Gastroenterol*, **43** (11), 811-822.
- [52] Kelesidis, I., Kelesidis, T. und Mantzoros, C.S. (2006): Adiponectin and Cancer: A systematic review. *Br J Cancer*, **94**, 1221-1225.
- [53] Kobayashi, H., Ouchi, N., Kihara, S., Walsh, K., Kumada, M., Abe, Y., Funahashi, T. und Matsuzawa, Y. (2004): Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecularweight form of adiponectin. *Circ Res*, **94**, 27–31.
- [54] Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kubota, T., Moroi, M., Matsui, J., Eto, K., Yamashita, T., Kamon, J., Satoh, H., Yano, W., Froguel, P.,

- Nagai, R., Kimura, S., Kadowaki, T. und Noda, T. (2002): Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem*, **277**, 25863–25866.
- [55] Kumada, M., Kihara, S., Sumitsuji, S., Kawamoto, T., Matsumoto, S., Ouchi, N., Arita, Y., Okamoto, Y., Shimomura, I., Hiraoka, H., Nakamura, T., Funahashi, T. und Matsuzawa, Y. (2003): Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**, 85– 89.
- [56] Kuwana, M., Okazaki, Y., Yasuoka, H., Kawakami, Y. und Ikeda, Y. (2004): Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. *Lancet*, **364**, 603-610.
- [57] Lambert, N.C., Distler, O., Muller-Ladner, U., Tylee, T.S., Furst, D.E. und Nelson, J.L. (2000): HLA-DQA1\*0501 is associated with diffuse systemic sclerosis in Caucasian men. *Arthritis Rheum*, **43**, 2005-2010.
- [58] Laumen, H., Saningong, A.D., Heid, I.M., Hess, J., Herder, C., Claussnitzer, M., Baumert, J., Lamina, C., Rathmann, W., Sedlmeier, E.M., Klopp, N., Thorand, B., Wichmann, H.E., Illig, T. und Hauner, H. (2009): Functional Characterization of Promoter Variants of the Adiponectin Gene Complemented by Epidemiological Data. *Diabetes*, **58**(4), 984-991.
- [59] LeRoy, E.C., Black C., Fleischmajer R., Jablonska S., Krieg T. und Medsger T.A., Jr. (1988): Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*, **15**, 202-205.
- [60] Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W. und Deetz, K. (1995): Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a

quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*, **4** (6), 357-362.

- [61] Loubière, L.S., Lambert, N.C., Madeleine, M.M., Porter, A.J., Mullarkey, M.E., Pang, J.M., Galloway, D.A., Furst, D.E. und Nelson, J.L. (2004): HLA allelic variants encoding DR11 in diffuse and limited systemic sclerosis in Caucasian women. *Rheumatology (Oxford)*, **44** (3), 318-322.
- [62] Maddison, P.J. (1991): Overlap syndromes and mixed connective tissue disease. *Curr Opin Rheumatol*, **3** (6), 995-1000.
- [63] Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. und Matsubara, K.(1996): cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun*, **221**, 286–289.
- [64] Masi, A.T., Rodnan, G.P. und Medsger, T.A. (1980): Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum*, **23**, 581-590.
- [65] Mavalia, C., Scaletti, C., Romagnani, P., Carossino, A.M., Pignone, A., Emmi, L., Pupilli, C., Pizzolo, G., Maggi, E. und Romagnani, S. (1997): Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. *Am J Pathol*, **151**, 1751-1758.
- [66] Mayes, M.D., Lacey, J.V., Jr., Beebe-Dimmer, J., Gillespie, B.W., Cooper, B., Laing, T.J. und Schottenfeld, D. (2003): Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum*, **48** (8), 2246–2255.
- [67] Mayes, M.D. und Trojanowska, M. (2007): Genetic factors in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*, **9** (2), 5-12.

- [68] Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-350.
- [69] Nadashkevich, O., Davis, P. und Fritzler, M.J. (2006): Revising the classification criteria for systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, **55** (6), 992-993.
- [70] Nakano, Y., Tobe, T., Choi-Miura, N.H., Mazda, T. und Tomita, M. (1996): Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem (Tokyo)*, **120**, 803–812.
- [71] Nietert, P.J. und Silver, R.M. (2000): Systemic sclerosis: environmental and occupational risk factors. *Curr Opin Rheumatol*, **12**, 520-526.
- [72] Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Maeda, K., Kuriyama, H., Okamoto, Y., Hotta, K., Nishida, M., Takahashi, T., Nakamura, T., Yamashita, S., Funahashi, T. und Matsuzawa, Y. (1999): Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*, **100**, 2473–2476.
- [73] Pérez-Martínez, P., López-Miranda, J., Cruz-Teno, C., Delgado-Lista, J., Jiménez-Gómez, Y., Fernández, J.M., Gómez, M.J., Marín, C., Pérez-Jiménez, F. und Ordovás, J.M. (2008): Adiponectin gene variants are associated with insulin sensitivity in response to dietary fat consumption in Caucasian men. *J Nutr*, **138** (9):1609-1614.
- [74] Poleni, P.E., Bianchi, A., Etienne, S., Koufany, M., Sebillaud, S., Netter, P., Terlain, B. und Jouzeau, J.Y. (2007): Agonists of peroxisome proliferators-activated receptors (PPAR) alpha, beta/delta or gamma

reduce transforming growth factor (TGF)-beta-induced proteoglycans' production in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, **15** (5), 493-505.

- [75] Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C. und Haslett, C. (2002): A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol*, **2** (12), 965-975.
- [76] Schäffler, A., Barth, N., Palitzsch, K.D., Drobnik, W., Schölmerich, J. und Schmitz, G. (2000): Mutation analysis of the human adipocyte-specific apM-1 gene. *Eur J Clin Invest*, **30** (10), 879-887.
- [77] Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G. und Lodish, H.F. (1995): A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*, **270**, 26746–26749.
- [78] Scherer, P.E. (2006): Adipose Tissue: From Lipid Storage Compartment to Endocrine Organ. *Diabetes*, **55** (6), 1537-1545.
- [79] Sgonc, R., Gruschwitz, M.S., Dietrich, H., Recheis, H., Gershwin, M.E. und Wick, G. (1996): Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest*, **98**, 785-792.
- [80] Shapiro, L. und Scherer, P.E. (1998): The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol*, **8**, 335–338.
- [81] Shibata, R., Ouchi, N., Kihara, S., Sato, K., Funahashi, T. und Walsh, K. (2004): Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem*, **279**, 28670–28674.

- [82] Smith, E.A. und LeRoy, E.C. (1990): A possible role for transforming growth factor-beta in systemic sclerosis. *J Invest Dermatol*, **95** (6), 125-127.
- [83] Sonnylal, S., Denton, C.P., Zheng, B., Keene, D.R., He, R., Adams, H.P., VanPelt, C.S., Geng, Y.J., Deng, J.M., Behringer, R.R. und de Crombrughe, B. (2007): Postnatal induction of transforming growth factor beta signaling in fibroblasts of mice recapitulates clinical, histologic, and biochemical features of scleroderma. *Arthritis Rheum*, **56**, 334-344.
- [84] Spranger, J., Kroke, A., Mohlig, M., Bergmann, M.M., Ristow, M., Boeing, H. und Pfeiffer, A.F. (2003): Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet*, **361**, 226–228.
- [85] Stumvoll, M., Tschrutter, O., Fritsche, A., Staiger, H., Renn, W., Weisser, M., Machicao, F. und Häring, H. (2002): Association of the T-G polymorphism in adiponectin (exon 2) with obesity and insulin sensitivity: interaction with family history of type 2 diabetes. *Diabetes*, **51** (1), 37-41.
- [86] Tagami, M., Ichinose, S., Yamagata, K., Fujino, H., Shoji, S., Hiraoka, M. und Kawano, S. (2003): Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. *Cell Tissue Res*, **312**, 31–40.
- [87] Takahashi, M., Arita, Y., Yamagata, K., Matsukawa, Y., Okutomi, K., Horie, M., Shimomura, I., Hotta, K., Kuriyama, H., Kihara, S., Nakamura, T., Yamashita, S., Funahashi, T. und Matsuzawa, Y. (2000): Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **24** (7), 861-868.

- [88] Takemura, Y., Ouchi, N., Shibata, R., Aprahamian, T., Kirber, M.T., Summer, R.S., Kihara, S. und Walsh, K. (2007): Adiponectin modulates inflammatory reactions via calreticulin receptor-dependent clearance of early apoptotic bodies. *J Clin Invest*, **117** (2), 375–386.
- [89] Tan, F.K., Wang, N., Kuwana, M., Chakraborty, R., Bona, C.A., Milewicz, D.M. und Arnett, F.C. (2001): Association of fibrillin 1 single-nucleotide polymorphism haplotypes with systemic sclerosis in choctaw and japanese populations. *Arthritis Rheum*, **44** (4), 893-901. [6] Varga, J., und Abraham, D. (2007): Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest*, **117**, 557-567.
- [90] Tan, J.T., McLennan, S.V., Song, W.W., Lo, L.W., Bonner, J.G., Williams, P.F. und Twigg, S.M. (2008): Connective tissue growth factor inhibits adipocyte differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol*, **295** (3): 740-751.
- [91] Tsao, T.S., Tomas, E., Murrey, H.E., Hug, C., Lee, D.H., Ruderman, N.B., Heuser, J.E. und Lodish, H.F. (2003): Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *J. Biol. Chem.*, **278** (50), 50810-50817.
- [92] Valentini, G., D'Angelo, S., Della Rossa, A., Bencivelli, W. und Bombardieri, S. (2003): European Scleroderma Study Group to define disease activity criteria for systemic sclerosis. IV. Assessment of skin thickening by modified Rodnan skin score. *Ann Rheum Dis*, **62**, 904–905.
- [93] Varga, J. und Abraham, D. (2007): Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest*, 2007, **117** (3), 557-567.

- [94] Vasseur, F., Helbecque, N., Dina, C., Lobbens, S., Delannoy, V., Gaget, S., Boutin, P., Vaxillaire, M., Leprêtre, F., Dupont, S., Hara, K., Clément, K., Bihain, B., Kadowaki, T. und Froguel, P. (2002): Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet*, **11** (21), 2607-2614.
- [95] Waki, H., Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Uchida, S., Kita, S., Hara, K., Hada, Y., Vasseur, F., Froguel, P., Kimura, S., Nagai, R. und Kadowaki, T. (2003): Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes: Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem*, **278**, 40352–40363.
- [96] Wang, Y., Xu, L.Y., Lam, K.S., Lu, G., Cooper, G.J. und Xu, A. (2006): Proteomic characterization of human serum proteins associated with the fat-derived hormone adiponectin. *Proteomics*, **6**, 3862–3870.
- [97] Wanstrat, A. und Wakeland, E. (2001): The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat Immunol*, **2**, 802–809.
- [98] Winterbauer, R.H. (1964): Multiple teleangiectasia, Raynaud's phenomenon, sclerodactyly, and subcutaneous calcinosis: A syndrome mimicking hereditary hemorrhagic teleangiectasia. *Bull Johns Hopkins Hosp.*, **114**, 361-383.
- [99] Wipff, J., Dieudé, P., Avouac, J., Tiev, K., Hachulla, E., Granel, B., Diot, E., Sibilia, J., Mouthon, L., Kahan, A., Boileau, C. und Allanore, Y. (2009): Association of hypoxia-inducible factor 1A (HIF1A) gene polymorphisms with systemic sclerosis in a French European Caucasian population. *Scand J Rheumatol*, **38** (4), 291-294.



- [100] Yamamoto, Y., Hirose, H., Saito, I., Tomita, M., Taniyama, M., Matsubara, K., Okazaki, Y., Ishii, T., Nishikai, K. und Saruta, T. (2002): Correlation of the adipocyte derived protein adiponectin with insulin resistance index and serum high-density lipoprotein-cholesterol, independent of body mass index, in the Japanese population. *Clin Sci (Lond)*, **103**, 137–142.
- [101] Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, B.B. und Kadowaki, T. (2002): Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*, **8**, 288–295.
- [102] Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, N.H., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., Tobe, K., Koyasu, S., Taira, K., Kitamura, T., Shimizu, T., Nagai, R. und Kadowaki, T. (2003): Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*, **423**(6941), 762-769.
- [103] Yokota, T., Oritani, K., Takahashi, I., Ishikawa, J., Matsuyama, A., Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Tenner, A.J., Tomiyama, Y. und Matsuzawa, Y. (2000): Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood*, **96**, 1723–32.
- [104] Zandmann-Goddard, G., Tweezer-Zaks, N. und Shoenfeld, Y. (2005): New therapeutic strategies for systemic sclerosis - a critical analysis of the literature. *Clin Dev Immunol*, **12** (3), 165-173.

- [105] Zhou, X., Tan, F.K., Wang, N., Xiong, M., Maghidman, S., Reveille, J.D., Milewicz, D.M., Chakraborty, R. und Arnett, F.C. (2003): Genome-wide association study for regions of systemic sclerosis susceptibility in a Choctaw Indian population with high disease prevalence. *Arthritis Rheum*, **48**, 2585-2592.

## **8. Abkürzungen**

Ø	Durchschnittswert
%	Prozent
+	Plus / positiv
♂	Männer
♀	Frauen
7-TM-Rezeptor	7-Transmembrandomänen-Rezeptor
A	Adenin
A <sub>260</sub> , A <sub>280</sub>	Lichtabsorption bei Wellenlänge von 260 nm, 280nm
Abb	Abbildung
ACA	Anti-Centromer-Antikörper
ACDC	Adipocyte, C1Q and collagen domain-containing gene
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACR	American College of Rheumatology
ACRP30	Adipocyte complement-related protein of 30 kD
ADIPOQ	Adiponectin
AdipoR1/2	Adiponectin-Rezeptor 1 und 2
ADPN	Adiponectin
AMPK	AMP-aktivierte Kinase
ANA	Anti-nukleäre-Antikörper
Anti-Sc170	Auto-Antikörper gegen Topoisomerase 1

APM1	Adipose most abundant gene transcript 1
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
BANK1	B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1
bzw	Beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Temperatur in Grad Celsius
CA	Kalifornien
CDS	Codierende Sequenz
CI	Konfidenzintervall
CK	Creatin-Kinase
CMV	Zytomegalovirus
CREST	Form der Sklerodermie; Akronym aus Calcinosis cutis, Raynaud-Phänomen, Ösophagusmotilitätsstörung, Sklerodaktylie und Teleangiektasien
CTGF	Connective tissue growth factor
C <sub>T</sub> -Wert	Threshold Cycle; Schwellenwertzyklus
Cys	Cystein
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
db SNP	Database SNP; SNP in der HapMap-Datenbank
dcSSc	Diffus kutane Sklerodermie
dCTP	Desoxycytidintriphosphat

dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	Das heißt
dH <sub>2</sub> O	Steriles destilliertes Wasser
DLCO	Diffusionskapazität der Lunge für Kohlenmonoxid
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphate
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonucleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetracetat
EF	Ejektionsfraktion
EM	Expectation-maximization
FAM <sup>TM</sup>	6-Carboxyfluoreszein
FBN1	Fibrillin 1
G	Guanin (in DNA)
G	Glycin (in Proteinen)
g	Erdbeschleunigung 9,81 m/s <sup>2</sup>
g, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
GBP28	Gelatin-binding protein of 28 kD
Gly	Glycin
GVHD	Graft-versus-Host-Disease
HIF1A	Hypoxia inducible factor 1A

His	Histidin
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HMW	High molecular-weight
ID	Identification; Kennnummer
IL-10	Interleukin 10
IL-1-RA	Interleukin 1-Rezeptor-Antagonist
IL13RA2	Interleukin 13 receptor, alpha 2 precursor
IRF 5	Interferon regulatory factor 5
Kap	Kapitel
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
lcSSc	Limitiert kutane Sklerodermie
LD	Linkage disequilibrium
M	Mega
MCP1	Monocyte chemotactic protein 1
MGB	Minor groove binder
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
ml, $\mu$ l	Milliliter, Mikroliter
MMP1/3	Matrix metalloproteinase 1/3
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure

mRSS	Modifizierter Rodnan-skin-Score
MSC	Mesenchymale Stammzellen
n	Anzahl
NASH	Nicht-alkoholische Steatosis hepatis, Leberverfettung
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFQ	Nicht-fluoreszierender Quencher
nm	Nanometer
NTC	Non Template Control; Negativkontrolle
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OR	Odds Ratio, Chancenverhältnis
p38 MAPK	p38-mitogenaktivierte Protein-Kinase
PAH	Pulmonal arterielle Hypertonie
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor
PPAR $\alpha$ / $\gamma$	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\alpha$ / $\gamma$
PSS	Progressive Systemische Sklerose
PTPN 22	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22
RA	Rheumatoide Arthritis
RFU	Relative fluorescence units
RT-PCR	RealTime-Polymerase-Kettenreaktion
s, sec	Sekunde
Ser	Serin

SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SNP	Single nucleotide polymorphism; Einzel-Nucleotid-Polymorphismus
SPARC	Secreted protein, acidic and rich in cysteine
SS	Sjögren-Syndrom
SS	Disulfid
SSc	Systemische Sklerose, Sklerodermie
STAT4	Signal transducer and activator of transcription 4
T	Thymin
TBX21	T-box 21
TGF $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TOPOI	Topoisomerase 1
Tyr	Tyrosin
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
v.a.	Vor allem
VIC <sup>®</sup>	Keine Angaben von Applied Biosystems
z.B.	Zum Beispiel



## **9. Danksagung**

**„Keine Schuld ist dringender als die, Dank zu sagen.“**

*- Cicero -*

In diesem Sinne möchte ich mich zuerst herzlich bedanken bei meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Jörg Distler, für die Möglichkeit dieses Thema bearbeiten zu dürfen, für die Übernahme des Referates und nicht zuletzt für die stets fürsorgliche und freundschaftliche Betreuung in der Entstehungsphase der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Georg Schett, dem Leiter des Lehrstuhles der Medizinischen Klinik 3 - Rheumatologie/Immunologie, danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Dankeschön an die gesamte Arbeitsgruppe um meinen Doktorvater PD Dr. med. Jörg Distler, insbesondere an Clara Dees für die Einarbeitung und Hilfe bei kleinen und großen Problemen.

„Muito obrigado“ an Robin Funke, meinen Co-Doktoranden und Freund, für die heiteren gemeinsamen Stunden im Labor.

Besonderer Dank gebührt Frau Dr. Barbara Fürnrohr für die Hilfe bei der Durchführung der Genotypisierungen und ihr immer offenes Ohr für Fragen meinerseits.

Den Arbeitsgruppen um Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Martin Herrmann und Herrn Prof. Dr. med. Thomas Winkler gilt mein Dank bezüglich der Bereitstellung von DNA-Proben von SSc-Patienten und Kontrollpersonen für die Erlanger Kohorte.

Ein „merci beaucoup“ geht nach Paris an die Arbeitsgruppe des Service de Rhumatologie der Université Descartes um Prof. Dr. med. Yannick Allanore, die Material für die französische Kohorte zur Verfügung stellte.

Desweiteren möchte ich mich bedanken bei den Biologen im 3. Stock des NFZ für die Möglichkeit, die Genotypisierungen dieser Arbeit mit ihrer „Susi“ - der weltbesten PCR-Maschine - durchführen zu dürfen.

Meinen Basketball-Jungs und meinen Freunden danke ich für die Möglichkeit, in stressigen Phasen einfach mal mit ihnen abschalten zu können.

Zuletzt, aber zutiefst danke ich meiner Familie.

Meinen Eltern für mentale und pecuniäre Unterstützung während des Studiums.

Meinen Brüdern für ihre Unterstützung und auflockernden Worte zur rechten Zeit.

## **10. Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Konstantin Huhn

Geburtsdatum: 08.06.1985 in Augsburg

Konfession: römisch-katholisch

Eltern: Dr. med. Wolfgang Huhn, geb. 12.11.1950, Kinderarzt  
Gisela Huhn, geb. 07.04.1952, Buchhändlerin

Geschwister: Christoph Huhn, geb. 06.06.1981, Versicherungskaufmann  
Claudio Huhn, geb. 12.11.1989, Student

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig, keine Kinder

### **Bildungsweg**

04-05/2011 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote 2,0)

04/2005 – 05/2011 Studium der Humanmedizin an der  
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen/Nürnberg

03/2007 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote 2,0)

09/1995 – 07/2004 Werner-von-Siemens-Gymnasium Weißenburg  
Erwerb der allgemeinen Hochschulreife (Gesamtnote: 1,6)

09/1991 – 07/1995 Grundschule Treuchtlingen

**Wehrdienst**

07/2004 – 03/2005

Grundwehrdienst im 15.

Luftwaffenausbildungsregiment in Roth und in der

Flugabwehrraketengruppe 23 in Manching

**Dissertation**

Doktorvater:

Priv. Doz. Dr. med. J. Distler, Medizinische Klinik 3

Rheumatologie und Immunologie

Universitätsklinikum Erlangen

Thema:

Auswirkungen eines Einzel-Nukleotid-Polymorphismus

im Adiponectin-Gen auf Pathogenese und klinische

Manifestation der Systemischen Sklerose

**Praktisches Jahr**

10/2010 – 01/2011

Universitätsklinikum Erlangen

Medizinische Klinik 2, Kardiologie und Angiologie

Chefarzt: Prof. Dr. med. W. Daniel

06/2010 – 10/2010

Spital Zofingen, Chirurgische Klinik

Lehrkrankenhaus der Universität Basel, Schweiz

Chefarzt: Dr. med. J. Gurzeler

02/2010 – 06/2010

Universitätsklinikum Erlangen

Neurologische Klinik

Chefarzt: Prof. Dr. med. S. Schwab

Stand:

07/2011