

Immungenetische Untersuchungen zur Assoziation des
Promotor-Polymorphismus des Interleukin-6-Gens in
Position -174 G/C bei Patienten mit systemischer
Sklerodermie

Vanessa Rembold

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. T. Ruzicka

Thema der Dissertation

Immungenetische Untersuchungen zur Assoziation des Promotor-
Polymorphismus des Interleukin-6-Gens in Position -174 G/C bei Patienten
mit systemischer Sklerodermie

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Vanessa Rembold
aus München

2015

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	Priv.- Doz. Dr. med. Gerald Messer
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Otrut Steinlein
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	11.06.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	3
1. Einleitung	5
1.1. Sklerodermie.....	5
1.1.1. Systemische Sklerodermie.....	5
1.1.1.1. Klassifikation.....	6
1.1.1.2. klinische Manifestationen.....	7
1.1.1.3. Diagnostische und klinische Relevanz spezifischer Autoantikörper.....	11
1.1.1.4. Ätiopathogenese	13
1.1.2. Zirkumskripte Sklerodermie.....	17
1.2. Interleukin-6	18
1.2.1. Expression	18
1.2.2. Funktion.....	20
1.2.3. Promotor-Polymorphismus des Interleukin-6-Gens in Position -174 G/C.....	22
2. Zielsetzung dieser Arbeit.....	24
3. Material und Methoden	25
3.1. Patientenkollektiv	25
3.1.1. Erfassung der Patientenvariablen	25
3.1.2. Das Patientenkollektiv	25
3.2. Material.....	28
3.2.1. Reagenzien.....	28
3.2.2. Pufferlösungen.....	28
3.2.3. ssOligonukleotide	29
3.2.4. Enzyme	29
3.2.5. Photomaterial.....	29
3.2.6. Technische Geräte	29
3.3. Methoden	30
3.3.1. Isolierung genomischer DNA aus Vollblut	30
3.3.2. Gelelektrophorese von Doppelstrang-DNA	30
3.3.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	30
3.3.4. Polymerasekettenreaktion genomischer DNA.....	31
3.3.4.1. Polymerasekettenreaktion der Interleukin-6-Promotorregion	32
3.3.5. Spezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	33
3.3.5.1. Restriktionslängen-Polymorphismus der Interleukin-6-	33
3.4. Statistische Auswertung	35
4. Ergebnisse.....	35
4.1. Charakterisierung des Patientenkollektives.....	35
4.1.1. Organbeteiligung	35
4.1.2. Assoziation zur Ausbildung verschiedener Autoantikörper	38
4.2. Untersuchung des Promotor-Polymorphismus des IL-6-Gens in Position -174 G/C.....	40
4.2.1. Assoziation des Promotor-Polymorphismus des IL-6-Gens in Position	41
-174 G/C mit systemischer Sklerodermie im gesamten Patientenkollektiv	41
4.2.2. Assoziation des Promotor-Polymorphismus des <i>IL-6</i> -Gens in Position	43
-174 G/C mit den Organmanifestationen	43
- 174 G/C mit spezifischen Autoantikörpern.....	44
4.2.4. Assoziation des Promotor-Polymorphismus des IL-6-Gens in Position	45
-174 G/C mit zirkumskripter Sklerodermie	45

5. Diskussion	47
5.1. Bedeutung des Interleukin-6 für die Ätiopathogenese der systemischen Sklerodermie .	47
5.3. Promotor-Polymorphismus des IL-6-Gens in Position -174 G/C bei Patienten mit zirkumskripter Sklerodermie und systemischer Sklerodermie, Overlap-Syndrom und Sharp-Syndrom.....	50
5.5. Zusammenspiel weiterer Polymorphismen	54
6. Zusammenfassung	56
7. Literaturverzeichnis	59
8. Anhang	66
9. Danksagung	69

Abkürzungen

ANA	Antinukleäre Antikörper
ACTH	Adreno-Corticotropes-Hormon
AK	Antikörper
Anti-U1-RNP	Antikörper gegen Ribonukleoprotein U1
Anti-Th-RNP	Antikörper gegen Ribonukleoprotein Th
bFGF	basic fibroblast growth factor
bp	Basenpaare
C°	Grad Celsius
CEN	Anti-Zentromer-Antikörper
cm	Zentimeter
CREST	Calcinosis cutis, Raynaud-Syndrom, ösophageale Dysfunktion, Sklerodaktylie, Teleangiektasie
CRP	C-reaktives Protein
CT	Cardiotropin
dATP	diAdenosintriphosphat
dCTP	diCytidintriphosphat
dGTP	diGuanintriphosphat
dTTP	diThymidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EIA	Enzymimmunoassay
ENA	Extrahierbare nukleäre Antikörper
g	Gravitationskonstante
GVHD	Graft versus Host Disease
gp	Glykoprotein
HeLa	Henrietta Lacks Zellen
HE	human epithelial cell line
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
LPS	Lipopolysaccharid

MCTD	mixed connective tissue disease
min	Minute
ml	Milliliter
nm	Nanometer
OSM	Oncostatin
PAH	Pulmonalarterielle Hypertonie
PBMC	peripheral blood mononucleated cells
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
PM-Scl	Polymyositis-Sklerodermie-Überlappungssyndrom
RNS	Ribonukleinsäure
Scl-70	Autoantikörper gegen Topoisomerase I
sec	Sekunden
sSc	Systemische Sklerodermie
TGF- β	transforming growth factor- β
TNF	Tumornekrosefaktor
UV	Ultraviolett
V	Volt
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

1. Einleitung

1.1. Sklerodermie

Sklerodermie ist eine chronische entzündliche Erkrankung des kollagenen Bindegewebes mit dem klinischen Merkmal der Bindegewebsvermehrung, die schlussendlich in eine Hautsklerose und mannigfaltige entzündliche Veränderungen mündet. Diese Sklerose (Skleros, griechisch der Stein) führte zur Namensgebung. Man unterscheidet zwischen der zirkumskripten Sklerodermie mit einem benignen, zum Teil selbstlimitierenden Verlauf und der systemischen Sklerodermie mit systemischer entzündlicher Beteiligung innerer Organe und einer Vaskulitis. Weiterhin lassen sich die sogenannten Pseudosklerodermien abgrenzen. Pseudosklerodermien sind Erkrankungen, die dem klinischen Erscheinungsbild der Sklerodermie sehr ähnlich sind, jedoch eine andere Ätiologie, meist durch Begleiterkrankungen oder exogene Faktoren aufweisen.

1.1.1. Systemische Sklerodermie

Die systemische Sklerodermie ist eine Systemerkrankung aus dem Formenkreis der Autoimmunerkrankungen. Klinisch beginnt sie in fast allen Fällen mit einem Raynaud-Syndrom, übergehend in eine obliterierende Angiopathie mit Intimafibrose. Es kommt zu einer Entzündungsreaktion, die neben der Haut auch innere Organe, insbesondere die Lunge und den oberen Gastrointestinaltrakt, betreffen kann. Des Weiteren kommt es zur Sklerose des Bindegewebes der Haut mit typischer Entzündung und Verhärtung und der Vaskulitis und Sklerose innerer Organe, bedingt durch Überproduktion von Kollagenfasern[42].

Die systemische Sklerodermie ist eine seltene Erkrankung, die Inzidenz beträgt 1/100.000 Einwohner pro Jahr. Die Erkrankung ist in der dunkelhäutigen Bevölkerung häufiger.

Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 40 und 50 Jahren. Wobei Frauen früher erkranken als Männer, hier wird die Erkrankung meist zwischen dem dreißigsten und neununddreißigsten Lebensjahr manifest und kann durch eine Schwangerschaft getriggert werden. Zudem sind Frauen häufiger betroffen als Männer, das Verhältnis liegt bei 3-6:1 weiblich: männlich [33].

1.1.1.1. Klassifikation

Die am häufigsten verwendete Einteilung der systemischen Sklerodermie stammt aus der Angelsächsischen Betrachtung und Literatur und differenziert die limitierte Form von der diffusen Form [48]. Diese unterscheiden sich in der Ausdehnung der veränderten Hautareale, im Krankheitsverlauf, sowie in der Häufigkeit der entsprechenden Organmanifestationen (siehe Tabelle 1).

	Limitierte Form	Diffuse Form
Sklerodermie forme Hautveränderungen	Nur im Bereich von Händen, Füßen, Gesicht und Unterarmen	Auch im Bereich des Stammes und der proximalen Extremitäten
Raynaud-Phänomen	Kann Hautveränderungen um Jahre vorausgehen	Weitere Manifestationen innerhalb eines Jahres oder bei Auftreten des Raynaud-Phänomens
Organbeteiligung	Häufig Ösophagus-motilitätsstörungen, nach Jahren pulmonal-arterieller Hypertonus möglich	Früh signifikante Organbeteiligung von Lunge, Gastro-intestinaltrakt, Herz und Nieren
Nagelbettkapillaren	Dilatation ohne signifikante Minderperfusion	Dilatation und Destruktion
Verkalkungen	Häufig Verkalkungen der Kutis (CREST Syndrom)	Keine Verkalkungen
antinukleäre Antikörper	Anti-Zentromer (CENP) (70-80%)	Anti-Topoisomerase I/ Scl-70 (30%)

Tabelle 1: Klassifikation der systemischen Sklerodermie nach LeRoy 1988 [48]

Als Unterform der limitierten systemischen Sklerose ist das CREST-Syndrom zu nennen, mit dem Symptomkomplex: Calcinosis cutis, Raynaud-Syndrom, ösophageale Motilitätsstörung, Sklerodaktylie und Teleangiektasien.

Außer diesen beiden Formen der systemischen Sklerodermie lässt sich auch noch die systemische Sklerose im Rahmen von Overlap-Syndromen und die seltene Form der systemischen Sklerose sine (ohne) Scleroderma, aber mit typischen Organbeteiligungen differenzieren. Bei Overlap-Syndromen findet sich neben dem klinischen Bild einer

systemischen Sklerose eine Polymyositis, bei dieser Patientengruppe sind häufig PM-Scl-Antikörper nachweisbar [17]. Im Weiteren kann es auch bei „mixed connective tissue disease“ (MCTD), auch Sharp-Syndrom genannt, zusammen mit Merkmalen des systemischen Lupus erythematodes, der Polymyositis und der rheumatoiden Arthritis zu dem klinischen Erscheinungsbild einer systemischen Sklerodermie kommen. Das Sharp-Syndrom hat dennoch häufig eine günstigere Prognose als die systemische Sklerodermie. Ein positiver Nachweis von U1-RNP-Antikörpern liefert den deutlichsten Hinweis auf diese Unterform.

1.1.1.2. klinische Manifestationen

Hautveränderungen

Die systemische Sklerodermie lässt sich meist klinisch anhand der typischen Hautveränderungen diagnostizieren. Gemäß den Kriterien des American College of Rheumatology von 1980 müssen mindestens das Hauptkriterium oder mindestens zwei der Nebenkriterien (siehe Tabelle 2) erfüllt sein.

Hauptkriterium Sklerodermie proximal der Fingergrundgelenke
Nebenkriterien Sklerodaktylie, grubchenförmige Narben oder Substanzverlust der distalen Fingerweichteile, bilaterale basale Lungenfibrose

Tabelle 2: Diagnosekriterien der systemischen Sklerodermie des American College of Rheumatology [55].

Bei nahezu allen Patienten mit systemischer Sklerodermie finden sich die charakteristischen akral betonten Hautveränderungen. Die meist betroffenen Hautareale sind die Hände und das Gesicht. Zu Beginn der Erkrankung haben diese häufig ödematösen Charakter (ödematöses Stadium), während in einem späteren Stadium das Gewebe meist fester und härter imponiert. Es kommt zur sogenannten Sklerodaktylie, die mit einer Bewegungseinschränkung einhergehen kann. Die Fingerendglieder werden durch die Sklerose schmal und spitz mit dem Erscheinungsbild der „Madonnenfinger“. Im späteren Verlauf kann es zu Wachstumsstörungen mit Verkürzung oder auch zur trockenen Gangrän kommen. Im Bereich des Mundes kommt es zur radiären Fältelung und Verengung der Mundöffnung mit Mikrostomie. Nicht selten finden sich Probleme beim Lidschluss sowie eine reduzierte Mimik. Die Sklerosierung kann sich auch auf den gesamten Körper ausbreiten, es handelt sich dann meist um eine diffuse systemische

Sklerodermie [42]. Obwohl sich bei den Patienten mit sehr schweren Hautveränderungen auch eine sehr hohe Mortalität fand, gibt es keinen absoluten Zusammenhang zwischen der Ausprägung der Hautmanifestation und der Beteiligung innerer Organe [76].

Bei Patienten mit der limitierten Form kann es häufiger zu Kalzifizierungen im intra- und subkutanen Fettgewebe kommen. Hier ist die Haut oft brüchig, mit der Folge der Ausbildung von Rhagaden sowie Verletzungen mit Wundheilungsstörungen.

Die Teleangiektasien finden sich meist periungual, können aber auch im Gesicht oder am ganzen Körper auftreten und zusammen mit Hyper- und Depigmentierungen ein bedeutsames kosmetisches Problem darstellen [79].

Raynaud-Syndrom und vaskuläre Veränderungen

Der Krankheitsbeginn der systemischen Sklerodermie ist häufig eher schleichend. Bevor es zu Hautveränderungen kommt, findet man bei über 80% der Patienten am Beginn der Erkrankung das Raynaud-Syndrom. Der meist kälteinduzierte Vasospasmus führt zur typischen Trikolore mit Zyanose und Blässe gefolgt von hyperperfusionsbedingter Rötung. Betroffen sind die Arteriolen der Finger, aber auch der Zehen und zum Teil der Nasenspitze.

Die Veränderung der Gefäßwand führt zuerst zur Ausbildung von dilatierten Riesenkapillaren und einer Rarefizierung der Kapillaren, darstellbar in der Nagelfalzmikroskopie [52]. Mit der Magnetresonanztomographie, als nicht invasives Verfahren, lassen sich sowohl die kleinen Gefäße, als auch die Veränderungen der Mikrozirkulation gut beurteilen [8]. Zudem lässt sich mit diesem diagnostischen Verfahren die Ausprägung der Entzündungsreaktion mit entsprechender Ödembildung dokumentieren.

Im Verlauf der Erkrankung finden sich strukturelle Gefäßveränderungen mit Ausbildung von sehr schmerzhaften Ulzerationen und akralen Nekrosen an den Fingerspitzen. Es kann ebenfalls durch die Minderperfusion zu Akroosteolysen mit Verkürzung der Fingerendglieder kommen.

Gastrointestinale Beteiligung

Bei der Mehrheit der Patienten manifestiert sich die Erkrankung auch am Gastrointestinaltrakt. Durch gastroösophageale Hypomobilität und Insuffizienz des ösophagealen Sphinkters kommt es zur Refluxsymptomatik. Daraus resultieren eine chronische Refluxösophagitis, bis hin zur Ausbildung von Vernarbungen und Einengungen des Lumen.

Die Patienten klagen auch über Völlegefühl oder Dysphagie, insbesondere bei festen Speisen.

Eher selten sind Bauchkrämpfe, bedingt durch Hypomobilität des Dünndarms. Prinzipiell kann jeder Bereich des Gastrointestinaltraktes bis hin zum Rektum betroffen sein. Man geht von einer Atrophie und Fibrose der glatten Muskulatur als Ursache der Dysfunktion aus. Im Frühstadium könnten eine neuronale Dysfunktion und mikrovaskuläre Veränderungen eine Rolle spielen [53].

Pulmonale Beteiligung

Circa 50% der Patienten mit systemischer Sklerodermie entwickeln im Laufe ihrer Erkrankung eine pulmonale Beteiligung. Sie stellt die häufigste Todesursache der systemischen Sklerodermie dar.

Insbesondere bei Patienten mit diffuser systemischer Sklerodermie kommt es früh zur Ausbildung einer interstitiellen Lungenfibrose mit linearen Verschattungen in der Röntgen-Thorax-Aufnahme. In der Lungenfunktionsprüfung zeigen sich eine Verminderung der Compliance und eine reduzierte Vitalkapazität. Klinisch findet sich eine Belastungsdyspnoe begleitet von unproduktivem Husten.

Bei etwa 10-15% der Patienten kann es im fortgeschrittenen Krankheitsstadium durch Gefäßveränderungen, auch ohne Zeichen einer interstitiellen Lungenfibrose, zur pulmonalen Hypertonie kommen. Histologisch findet man eine Intimaverdickung der Lungenarterien und Arteriolen. Die Patienten berichten zunächst über Belastungsdyspnoe, im weiteren Verlauf kommt es zu den klinischen Zeichen einer Rechtsherzbelastung. Die pulmonale Hypertonie ist eine der häufigsten Todesursachen bei Patienten mit systemischer Sklerodermie [46, 29].

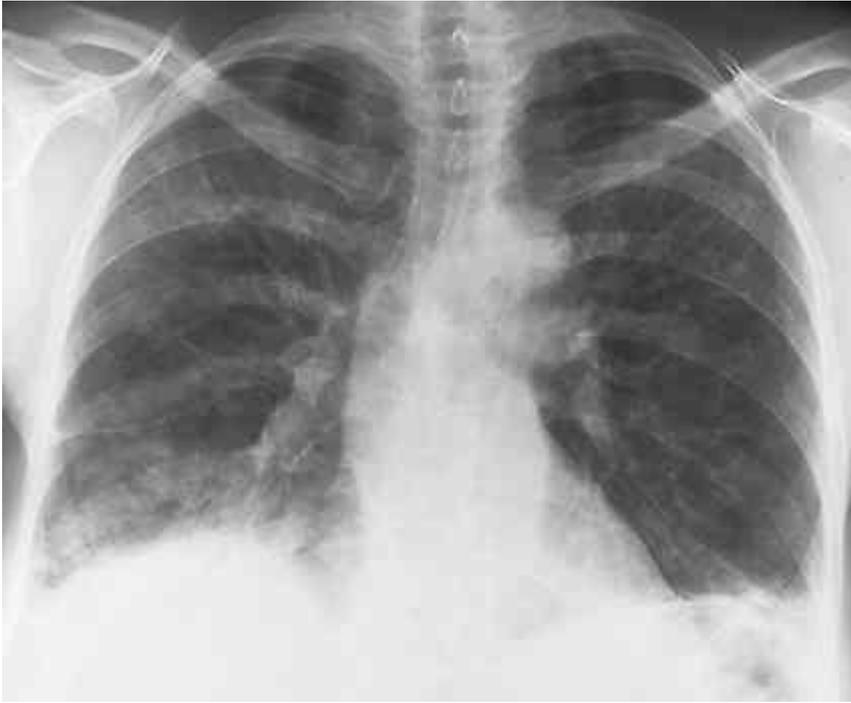


Abbildung 1: Klinikum Harlaching München Radiologie. Röntgen p.a. Aufnahme des Thorax bei einem Patient mit schwerer Lungenfibrose im Rahmen einer systemischen Sklerodermie

Kardiale Beteiligung

Patienten mit klinisch symptomatischer kardialer Beteiligung haben eine schlechte Prognose mit einer Fünf-Jahres-Sterblichkeit von 60% [36]. Häufigste Manifestation stellt die Perikarditis dar. Diese findet sich nach Autopsie bei 80% der Patienten. Asymptomatische Verläufe sind häufig. Ein hämodynamisch wirksamer Perikarderguss ist oft assoziiert mit einer raschen Verschlechterung der Nierenfunktion [10].

Darüber hinaus kann histologisch eine unregelmäßige Myokardfibrose, verursacht durch rezidivierende Vasospasmen der kleinen Arterien, nachgewiesen werden. Die Folgen sind Angina-pectoris-Symptomatik bei unauffälligem Koronarstatus, Kardiomyopathie und Herzrhythmusstörungen. Der plötzliche Herztod ist eine häufige Todesursache bei Patienten mit systemischer Sklerodermie[81].

Muskel- und Skelettbeteiligung

Über die Hälfte der Erkrankten leiden an Muskel- oder Gelenkbeschwerden. Myositiden, diese meist nur lokalisiert auftreten, gehen meist ohne Erhöhung der Kreatinkinase im Serum einher. Bei proximal betonter Myositis mit Muskelenzymerrhöhung ist an ein Overlap-Syndrom zu denken. Durch ausgeprägten Hautbefall kann es zu einer Muskelschwäche im Sinne einer Immobilitätsatrophie kommen.

Arthralgien im Bereich der Finger und Kniegelenke sind häufig, eine hochentzündliche Arthritis jedoch selten. Durch Fibrosierung der Sehnenscheiden, insbesondere im Bereich der Finger und Handgelenke kann es zu schmerzhaften Bewegungseinschränkungen kommen [82].

Renale Beteiligung

Vor dem Einsatz wirksamer Antihypertensiva, insbesondere der ACE-Hemmer, war das Nierenversagen die häufigste Todesursache bei Patienten mit systemischer Sklerodermie.

Durch Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems kommt es zur malignen Hypertonie, der sogenannten „renalen Krise“. Diese kann zur rasch progredienter Niereninsuffizienz, Linksherzversagen und hypertensiver Enzephalopathie führen [85].

Es findet sich allerdings auch eine langsam fortschreitende Niereninsuffizienz mit milder Hypertonie und Proteinurie ohne aktives Urinsediment. Ein großer Perikarderguss prädisponiert zum akuten Nierenversagen. Auch bei Patienten mit rasch progressiver Ausbreitung der Hautfibrosierung im frühen Krankheitsstadium kommt es häufig zur renalen Beteiligung.

1.1.1.3. Diagnostische und klinische Relevanz spezifischer Autoantikörper

Der Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA) spielt in der Diagnostik der systemischen Sklerodermie eine entscheidende Rolle. Bei über 90% der Patienten mit systemischer Sklerodermie sind ANA nachweisbar, wobei die Antikörpertiter der Sklerodermie spezifischen Autoantikörper keine direkte Assoziation mit der Krankheitsaktivität aufweisen. Der Nachweis erfolgt durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie, bei der HEp-2-Zellen (Human-Epitheliom Zellen) mit Patientenserum in unterschiedlicher Verdünnung überschichtet werden. Bei der systemischen Sklerodermie findet man meist ein nukleäres, gesprenkeltes oder zentromeres Fluoreszenzmuster. Die weitere Differenzierung der Antikörperspezifität erfolgt über Immundiffusion/Gegenstromelektrophorese und Immunoblot sowie heute meist per Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Die spezifischen Antikörper haben nicht nur diagnostischen Wert, sondern spielen, aufgrund der bedeutenden prognostischen Aussagekraft, auch eine entscheidende Rolle bei der Klassifikation der Sklerodermie [59, 60].

Anti-Zentromer-Antikörper (CENP) wurden erstmals 1980 bei Patienten mit systemischer Sklerodermie nachgewiesen [62]. Der Nachweis spricht eher für eine limitierte Form der Erkrankung und hat die höchste Assoziation mit dem CREST-Syndrom. CENP lassen sich bei 20-40% der Patienten mit systemischer Sklerodermie nachweisen und sind wie die Scl-70-Antikörper hoch spezifisch [25].

Scl-70-Antikörper (Anti-Topoisomerase I) werden nicht bei Patienten mit anderen Bindegewebserkrankungen wie der Polymyositis und dem Lupus erythematodes gefunden und sind somit hochspezifisch für die Diagnose systemische Sklerodermie [17]. Sie sprechen sehr oft für das Vorliegen einer diffusen Verlaufsform mit früher Lungenbeteiligung in Form einer interstitiellen Lungenfibrose. Aufgrund der anfangs niedrigen Sensitivität schließt ein negativer Befund eine systemische Sklerodermie jedoch nicht aus.

Der gegen präribosomale Proteine gerichtete PM-Scl-Antikörper gibt Hinweis auf ein Overlap-Syndrom. Er ist bei 5-10% der Patienten mit systemischer Sklerodermie nachweisbar und je nach Literaturangaben bei 20-75% bei Polymyositis-Sklerodermie-Syndrom, welches klinische Merkmale der Polymyositis und Dermatomyositis und der Sklerodermie aufweist [44].

Erhöhte Titer der U1-RNP-Antikörper finden sich insbesondere bei Patienten mit „mixed connective tissue disease“ (MCTD), dem Sharp-Syndrom, mit klinischen Merkmalen der systemischen Sklerodermie, der Polymyositis, des Systemischen Lupus erythematodes sowie der rheumatoiden Arthritis. Bei 95-100% der Patienten mit MCTD lassen sich hochtitrig Anti-U1-RNP nachweisen.

Der Nachweis von Th-RNP-Antikörpern ist insbesondere bei der limitierten systemischen Sklerodermie zu finden [59].

Ein antinukleäres Fluoreszenzmuster ist relativ spezifisch für die systemische Sklerodermie und bei 20-30% der Patienten zu diagnostizieren [7].

Anti-RNS-Polymerase-Antikörper und anti-Fibrillarin-Antikörper sind sehr selten nachweisbar und spezifisch für die diffuse systemische Sklerodermie mit Organbeteiligung [17].

In Tabelle 3 sind Häufigkeiten der bei systemischer Sklerose relevanten Antikörper sowie ihre klinische Bedeutung zusammengefasst.

Antikörper	Häufigkeit in % bei Patienten mit systemischer Sklerodermie	Subtyp der systemischen Sklerodermie	Typische klinische Assoziation
CENP (Anti-Zentromer)	30-40	Limitiert	CREST Syndrom hier bis zu 90%, Ösophagusbeteiligung, PAH im späten Krankheitsstadium
Anti-Scl-70 (Anti-Topoisomerase I)	20-40	Diffus	Schwerer Verlauf, Lungenfibrose
Anti-PM-Scl	5-10	Overlap-Syndrom	Myositis
Anti-RNS-Polymerase	20	Diffus	Schwere Hautbeteiligung, renale Krise
Anti-Fibrillarin (U3 sn RNP)	<5	Diffus und limitiert	Muskelbeteiligung, pulmonal-arterielle Hypertonie
Anti-U1-RNP	5-15	Limitiert und MCTD	Muskelbeteiligung
Anti-Th-RNP	14	Limitiert	Dünndarmbeteiligung, PAH

Tabelle 3: Autoantikörperdiagnostik [17, 25, 59, 60]

1.1.1.4. Ätiopathogenese

Die Pathogenese der systemischen Sklerodermie ist komplex und noch nicht endgültig geklärt. Ein aktiviertes Immunsystem, Veränderungen des Gefäßsystems, insbesondere der Kapillaren und des Endothels und ein gestörter Bindegewebsstoffwechsel sind die grundlegenden Pathomechanismen. Eine genetische Prädisposition scheint dabei eine entscheidende Rolle zu spielen.

Bedeutung des Immunsystems

Die systemische Sklerodermie gehört zu den Autoimmunerkrankungen, so sind bei über 90% der Erkrankten ANA nachweisbar und die spezifische humorale Immunantwort, nach Verlust der Auto-Toleranz, kausal beteiligt. Die spezifischen Autoantikörper zeigen dabei zum Teil eine hohe Assoziation zu klinischen Merkmalen und sind wie beispielsweise der

Anti-Zentromer-Antikörper nahezu ausschließlich bei Patienten mit systemischer Sklerodermie nachweisbar.

Es gibt darüber hinaus auch mehrere Hinweise, dass zellvermittelte Immunreaktionen von zentraler Bedeutung für die Entzündungsreaktion mit Entwicklung einer Fibrose sind. Das Ziel der humoralen Immunreaktion stellen vermutlich Endothelzellen dar, wobei es durch Interaktion der Endothelzellen und der extrazellulären Matrix mit T-Lymphozyten und Makrophagen zur Freisetzung von Zytokinen und Wachstumshormonen kommt. Diese stimulieren Fibroblasten und führen zur pathologischen Bindegewebsvermehrung. Im Folgenden sind entsprechende Zytokine aufgeführt.

Zytokine mit Einfluss auf Kollagensynthese [78, 13]:

EGF	epidermal growth factor
PDGF	plated derived growth factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
TGF- β	transforming growth factor- β
IL-1,4,6,13	Interleukin -1,4,6,13
TNF	Tumornekrosefaktor
IFN- γ	Interferon- γ

Die histologisch nachweisbaren perivaskulären und interstitiellen zellulären Infiltrate bestehen hauptsächlich aus CD4-positiven, Interleukin-2 empfindlichen T-Helferzellen [39], das Verhältnis von CD4-positiven zu CD8-positiven Lymphozyten ist bei systemischer Sklerodermie somit zugunsten der CD4-T-Helferzellen verschoben.

Die Aktivierung der T-Zellen erfolgt dabei zum einen über Antigen-präsentierende Zellen (APZ, Makrophagen), welche das Antigen über den T-Zellrezeptor und kompatible HLA-Klasse-II-Moleküle präsentieren. Dieser Vorgang bewirkt weitere Teilungs- und Differenzierungsprozesse, bis hin zur Entwicklung einer spezifischen humoralen Immunantwort. Zum anderen führt eine Interaktion von Epitopen der Endothelzellen und der extrazellulären Matrix über Oberflächenmoleküle der T-Zellen, sogenannten Very-late-antigen-Integrinen, zur primären Immunantwort [80]. Beschrieben wurde diese Interaktion mit den Matrixproteinen Fibronectin, Laminin, Kollagen Typ I und Tenascin.

Sklerodermie-ähnliche klinische Veränderungen zeigen sich auch bei Patienten mit Graft-versus-host-Erkrankung (GVHD) nach Knochenmarktransplantation, was wiederum die Bedeutung der zellvermittelten Immunität in der Pathogenese der systemischen Sklerodermie unterstreicht. Bei beiden Erkrankungen finden sich Verhärtungen der Haut

mit gastrointestinaler und pulmonaler Beteiligung, sowie ANA. Auch bei der GVHD spielen aktivierte T-Lymphozyten eine zentrale Rolle in der Krankheitsentstehung [77].

Veränderungen im Blutgefäßsystem

Bereits im frühen Krankheitsstadium kommt es zur Veränderung kleiner Arteriolen und Kapillaren. Histologisch findet sich eine Schädigung der Endothelzellen und der Basallamina, gefolgt von Intimaverdickung und Gefäßobliteration. Es wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, die für die Veränderungen am Endothel ursächlich sein können. So konnte im Serum von einigen Sklerodermie-Patienten das für Endothelzellen zytotoxische Typ IV Kollagenase Granzyme 1 nachgewiesen werden. Dieses wird aus aktivierten T-Zellen freigesetzt und führt zur Fragmentation von Laminin und Kollagen IV und zur Ausbildung einer Entzündungsreaktion [39].

Des Weiteren wurden zirkulierende Anti-Endothel-Zell-Antikörper bei 21-85% der Patienten mit systemischer Sklerodermie nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass Anti-Endothel-Zell-Antikörper antikörpervermittelte Zytotoxizität bei Sklerodermie-Patienten initiieren, die wiederum zur Apoptose von Endothelzellen führt. Diese Autoantikörper sind allerdings nicht Sklerodermie-spezifisch und finden sich auch bei anderen Kollagenosen [9].

Durch die Endothelzellschädigung kommt es unter anderem durch verminderte Prostacyclin-Spiegel und einer erhöhten Produktion von Endothelin-1 zur Aktivierung von Thrombozyten, welche an das geschädigte Endothel binden und wiederum Fibroblasten-stimulierende und vasokonstriktorische Zytokine freisetzen können. Es kommt in Folge zu Gefäßverschlüssen und zur Bindegewebsfibrose.

Bindegewebsstoffwechsel

Das Wachstum von Fibroblasten, die Synthese-Rate von Kollagen, Fibronectin und der Glykosaminoglykane sind bei systemischer Sklerodermie erhöht. Histologisch findet sich insbesondere perivaskulär eine vermehrte Kollagensynthese.

Aus der überschießenden Entzündungsreaktion resultiert eine Gefäßschädigung, insbesondere im Kapillarstromgebiet der Haut und eine Bindegewebsfibrose der Haut und innerer Organe mit entsprechenden Funktionsdefiziten.

In vitro wurde gezeigt, dass Fibroblasten aus einem erkrankten Hautareal eines Sklerodermie-Patienten das zwei- bis Dreifache an Kollagen synthetisieren können, im Vergleich zu normalen Fibroblasten von gesunden Individuen. Diese vermehrte Aktivität

der Fibroblasten ist vermutlich zytokinvermittelt. Insbesondere transforming growth factor- β , plated derived growth factor, IL-1 und IL-6 spielen hier eine zentrale Rolle. So findet sich bei Fibroblasten von Patienten mit systemischer Sklerodermie der plated derived growth factor (PDGF)-Rezeptor im Gegensatz zu Fibroblasten bei gesunden Probanden ständig exprimiert [35].

Diese Störung kann nicht nur an einer vermehrten Bindegewebssynthese liegen, sondern auch mit einem verminderten Abbau vergesellschaftet sein. Es wurde eine verminderte Aktivität von Kollagenasen, die zu den Matrix-Metalloproteinasen zählen, bei systemischer Sklerodermie beobachtet [28].

Genetische Prädisposition

Es ist heute gesichert, dass eine genetische Prädisposition eine entscheidende Rolle bei der Genese der systemischen Sklerodermie spielt. So zeigte eine große amerikanische Studie an 703 Familien, dass eine positive Familienanamnese den größten Risikofaktor für eine systemische Sklerodermie darstellt. Hier ist liegt das Risiko bei 1,6% im Gegensatz zu 0,026% in Familien bei denen es bisher nicht zum Auftreten einer systemischen Sklerodermie gekommen war [21]. Auch die unterschiedliche Prävalenz in verschiedenen ethnischen Gruppen unterstreicht diese Annahme. So zeigt der Choctaw Stamm in Oklahoma eine zweifach erhöhte Prävalenz mit einem einheitlichen klinischen und immunologischen Erscheinungstyp [20]. Auch die Assoziation von bestimmten HLA-Allelen zu klinischen Merkmalen der Sklerodermie und den spezifischen Antikörpern lässt auf die genetische Prädisposition schließen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass HLA-B8 mit einem akuten hoch entzündlichen Verlauf der systemische Sklerodermie assoziierte ist, wohingegen HLA-B7/DR2 häufig bei Patienten mit einer mild verlaufenden zirkumskripten Sklerodermie zu finden ist [30]. Das HLA-DRB5*01:05 Allel findet sich besonders bei Patienten mit pulmonaler Beteiligung [64]. Die prognostische Aussage Kraft der HLA Assoziation wird durch die genannten Beispiele deutlich.

In den letzten Jahren wurden Genpolymorphismen für unterschiedlichste DNA-Regionen analysiert, welche Proteine kodieren, die in der Immunregulation, dem Bindegewebstoffwechsel oder der Funktion des Gefäßsystems eine Rolle spielen.

Hier konnten, wie in der Übersichtsarbeit von Granel et al. 2009 dargestellt, zahlreiche Assoziationen zu Genpolymorphismen von Zytokingenen und der systemischen Sklerodermie nachgewiesen werden [21]. Diese sind TNF- α und β , IL-1- α und β , IL-2, L-10 und IL- 13.

1.1.2. Zirkumskripte Sklerodermie

Die zirkumskripte Sklerodermie ist eine seltene Erkrankung, die meist Frauen im jüngeren Lebensalter betrifft. Nach einem entzündlichen Stadium kommt es zur herdförmigen Sklerose der Haut mit Überproduktion von Kollagenfasern und Schrumpfung des Bindegewebes. Diese Veränderungen lassen sich histologisch primär in der Dermis nachweisen, tiefe Sehnenscheiden und Faszien können allerdings in den sklerotischen Umbau mit einbezogen sein.

Klinisch zeigt sich initial das entzündliche Geschehen in Form einer sich ausbreitenden Rötung, die sich von zentral in einen gelblich-weißen Skleroseherd umwandelt. Dieser Plaque ist gegenüber dem subkutanen Bindegewebe schlecht verschieblich und meist von einem blauvioletten, sogenannten "lilac ring" umgeben [74].

Je nach Form und Ausbreitung der Skleroseherde und Auftreten in den unterschiedlichen Bindegewebsschichten lassen sich verschiedene klinische Erscheinungsbilder der zirkumskripten Sklerodermie unterscheiden (siehe Tabelle 4).

Zirkumskripte Morphea	Einzelne oder wenige runde oder ovale Herde oft am Rumpf, meist nur die Epidermis betreffend, sehr selten mit Blasenbildung durch Obstruktion der Lymphgefäße (bullöse Morphea)
Generalisierte Morphea	Mehr als vier Plaques oder größer als drei 3cm; zum Teil konfluierend
Lineare Sklerose	Lineare Ausbreitung der Sklerose oft mit deutlicher kosmetischer und funktioneller Auswirkung, häufigste Form bei Kindern
Pansklerosierende Morphea	Sehr seltene schwere Form, die gesamte Hautdicke betreffend, am gesamten Körper auftretend
Mischtyp	Mehrere Unterformen gleichzeitig

Tabelle 4: Klassifikation der zirkumskripten Sklerodermie/Morphea nach Laxer und Zulian 2006 [47]

Ätiologisch scheint eine genetische Disposition von Bedeutung zu sein. Traumata der Haut, chronische Belastungen, Insektenstiche oder Impfungen können eine Sklerosierung auslösen. Die Ähnlichkeit der histologischen Veränderungen der betroffenen Haut mit denen einer Graft-versus-Host-Reaktion gaben Grund zu der Annahme, dass Chimärismus,

zum Beispiel im Rahmen einer Schwangerschaft eine pathogenetische Rolle spielt [89]. Auch toxische Substanzen oder Röntgenstrahlen können als „trigger“ fungieren [54]. Die zirkumskripte Sklerodermie hat eine günstige Prognose. Häufig kommt es zu einem spontanen Stillstand, eine Rückbildung der Sklerose ist möglich. Bei 20% der Patienten mit Morphea kommt es zur extrakutanen Manifestation. Am häufigsten sind hier die Gelenke betroffen, auch Veränderungen an Augen oder dem oberen Gastrointestinaltrakt wurden beschrieben. Diese Organmanifestationen sind wesentlich milder als bei der systemischen Sklerodermie, weisen keine systemische Vaskulitis auf und sind per se nicht lebensbedrohlich [89].

1.2. Interleukin-6

Interleukin-6 ist ein Interleukin, welches an der Regulation von Entzündungsprozessen im ganzen Körper teilnimmt. Es gehört zu einer Zytokingruppe hämatopoetischer Zytokine, die sich die Signaltransduktion über die Rezeptoruntereinheit Glykoprotein gp 130 teilen [27]. Es wird durch verschiedenste Zelltypen exprimiert. So kann es neben Monozyten, Granulozyten und B-Lymphozyten auch von verschiedenen mesenchymalen Zellen wie Synoviozyten und Chondrozyten synthetisiert werden.

Ebenso vielfältig ist der Weg der Induktion. Hier spielen Zytokine (IL-1, TNF), Produkte inflammatorischer Vorgänge (Bradykinin, CRP), aber auch infektiöse Antigene von Viren oder Bakterien eine Rolle [22, 23, 37].

In seiner Funktion hat Interleukin-6 autokrine, parakrine und endokrine Effekte. Es spielt eine entscheidende Rolle bei dem Übergang von Mechanismen der angeborenen Immunität zur erworbenen Immunität.

1.2.1. Expression

Die Halbwertszeit des aktiven IL-6 liegt bei wenigen Minuten. Die Ausscheidung erfolgt über Leber und Niere.

IL-6 kann zum einen von zahlreichen Zelltypen exprimiert werden, aber auch die Induktion der IL-6-Sekretion ist durch verschiedenste Substanzen möglich. Dies führt in vivo dazu, dass verschiedene Induktionswege parallel laufen und z.B. eine pharmakologische Blockade der Stimulation durch LPS wegen der gleichzeitigen Wirkung der Stimulation durch IL-1 und TNF keine Minderung der IL-6-Wirkung zur Folge hat.

In Tabelle 5 sind die Substanzen aufgeführt, welche die *IL-6*-Expression beeinflussen.

Stimulation der <i>IL-6</i> -Expression	Inhibition der <i>IL-6</i> -Expression
TNF- α	Glukokortikoide
IL-1	Östrogenen
LIF (Leukämie inhibierender Faktor)	Tumor-Suppressorgen p53
PDGF	
Interferon- β	
Infektiöse Antigene Viren und Bakterien	
LPS (Lipopolysaccharid)	
Bradykinin	
Komplementfaktoren	
CRP	
Prostaglandin-E2	
Urat- und Kalziumphosphatkristalle	

Tabelle 5: Substanzen mit Auswirkung auf die *IL-6*-Expression [23, 65].

Das Zytokin *IL-6* wird auf dem Chromosomenabschnitt 7p21-p14 kodiert.

Die Promotorregion des *IL-6*-Gens (*IL-6*) enthält mehrere transskriptionell regulatorische Elemente. Durch 5'End-Deletionsmutationen konnten die regulatorischen Funktionen dieser verschiedenen Bindungssequenzen nachgewiesen werden. So befindet sich zwischen Position -173 bis -151 Basenpaar (bp) das sogenannte "multiple response element". Hier binden nukleäre Proteine, welche Signale von *IL-1*, *TNF* sowie der Proteinkinase C und A übertragen[66].

Daneben findet sich eine weitere Bindungsstelle, die *NF- κ B* Region, für second messenger des *IL-1*, *TNF- α* und *LIF*. Hieraus ergeben sich z.T. synergistische Effekte bei der Initiierung der Transkription von *IL-6* [57].

Auch wurde die *GRE*-Region identifiziert, welche Signale der hemmenden Glukokortikoidwirkung vermittelt.

Das Transkriptionsprodukt ist ein aus 212 Aminosäuren bestehendes Propeptid, hiervon wird das 184 Aminosäuren lange aktive *IL-6* abgespalten.

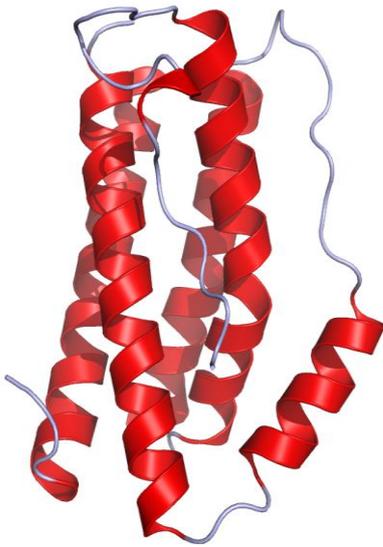


Abbildung 2: Struktur des Zytokins IL-6 [Somers, W., Stahl, M., Seehra, J.S. 1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. EMBO J. v16 pp.989-997, 1997]

1.2.2. Funktion

Regulation von Entzündungsreaktionen und Differenzierung von B-Lymphozyten

IL-6 spielt bei der Regulation von Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle. Es induziert die terminale Differenzierung von B-Lymphozyten in antikörperproduzierende Plasmazellen. Dieser Effekt wurde zunächst *in vitro* und dann *in vivo* an IL-6-transgenen Mäusen nachgewiesen. Hier kommt es zur deutlichen Plasmozytose und einer polyklonalen Gammopathie, meist mit Immunglobulin G mit Ausbildung von Autoantikörpern [83]. Zudem wird bei den transgenen Mäusen eine mesangioproliferative Glomerulonephritis beobachtet, wie man sie auch beim systemischen Lupus erythematoses findet [88].

Ein Beispiel für die Bedeutung des IL-6 bei der Entstehung von Autoantikörpern zeigte sich bei Patienten mit kardialem Myxödem. Diese Patienten boten häufig Autoimmunphänomene, bei gleichzeitig erhöhten IL-6-Serumspiegeln. Nach chirurgischer Entfernung der Tumore kam es zum Sistieren der Autoimmunität und einer Normalisierung der IL-6-Serumspiegel. In der histologischen Untersuchung der Myxödemtumoren waren reichlich IL-6-exprimierende Zellen zu finden[87].

Induktion der Akutphase-Antwort

IL-6 spielt eine zentrale Rolle in der Akutphase-Antwort. So ist IL-6, anders als bisher angenommen, in der Lage allein zahlreiche hepatische Akutphaseproteine zu induzieren, dazu gehören u.a. CRP und Fibroblastin. IL-1 und TNF spielen hier eine eher untergeordnete Rolle, sie können allerdings über Stimulation der IL-6-Expression in hepatischen Kupferzellen, indirekt die Synthese der Akutphase-Proteine beeinflussen [19]. Die Bedeutung des IL-6 bei Infektionen zeigt sich an Knockout-Mäusen des IL-6-Gens. Sie weisen umgekehrt zu der oben angeführten IL-6-Wirkung eine deutliche Abwehrschwäche und Reduktion der Akutphase-Antwort auf [43].

Fibroblastenstimulation

IL-6 gehört neben PDGF, TGF- β und IL-1 β zu den Fibroblasten-stimulierenden Zytokinen. Duncan et al. untersuchten, ob die Fibroblasten stimulierende Effekt des IL-1 β durch IL-6 vermittelt ist [12]. IL-1 β bewirkt eine vermehrte *IL-6*

-Expression in Fibroblasten. Rekombinantes humanes IL-6 führt bei kultivierten Fibroblasten *in vitro* zur konzentrationsabhängigen Stimulation der Kollagen, Glykosaminoglykan-, Hyaluronsäure- und Chondroitin-4/6-Sulfat-Synthese.

Eine Blockierung der IL-6-Wirkung durch Antikörper gegen rekombinantes humanes IL-6 führte allerdings nur partiell zur Reduktion der Bindegewebssynthese in Fibroblasten nach Stimulation mit IL-1- β . Im Gegensatz dazu haben Antikörper gegen IL-1- β keinen Einfluss auf die Fibroblastenfunktion nach Stimulation durch IL-6. IL-6 führt somit direkt zur vermehrten Bindegewebssynthese durch Stimulation der Fibroblasten [12].

Auch Kawaguchi et al. konnten zeigen, dass die Blockierung der IL-6-Wirkung durch IL-6-Antikörper in Fibroblastenkulturen von Patienten mit systemischer Sklerodermie zur einer signifikant verminderten Synthese von Prokollagen Typ I führt [40].

Darüber hinaus lieferten mehrere Arbeiten entscheidende Hinweise, dass IL-6 bei Patienten mit systemischer Sklerodermie eine entscheidende Rolle bei der Fibroblasten-Aktivierung und -Stimulation spielt [38, 69, 90].

Endokrinologische Wirkung

IL-6 beeinflusst zudem über z.T. stimulierende aber auch hemmende Effekte endokrinologische Vorgänge. Für die systemische Sklerodermie scheint unter Anbetracht der Wirksamkeit einer Steroidtherapie der Zusammenhang mit dem Kortisolstoffwechsel

von Bedeutung. So stimuliert IL-6 über ACTH die körpereigenen Kortisolproduktion, welches wiederum hemmend auf die IL-6-Expression wirkt [68, 56].

Die Gabe von IL-6 führt zu erhöhter Körpertemperatur, Gewichtsverlust, Abgeschlagenheit und Gliederschmerzen. Bei Patienten mit akutem Hypokortisolismus finden sich umgekehrt ähnliche Symptome, bei gleichzeitig stark erhöhten IL-6 Serumwerten [86].

1.2.3. Promotor-Polymorphismus des Interleukin-6-Gens in Position -174 G/C

Im Bereich der 5'-Region des Promotors des humanen *IL-6* wurde 1998 von Fishman et al. ein Guanin/Cytosin-Einzelnukleotid-Polymorphismus in der Position -174 bp beschrieben. Die Gruppe der -174 Cytosin-Variante zeigte in HeLa-Zellen eine niedrigere IL-6-Expression, verglichen mit der -174 Guanin-Variante. Nach Stimulation der HeLa Zellen durch LPS oder IL-1 stieg die Expression des *IL-6* in der -174 Guanin-Variante nach 24 Stunden deutlich an, in der -174 Cytosin-Variante blieb die Expression hingegen gleich. [16]. Auch die IL-6-Serumkonzentrationen waren bei Gesunden mit dem C-Allel signifikant niedriger [16]. Im Vergleich zur Kontrollgruppe fanden sich bei Patienten mit juveniler chronischer Arthritis, insbesondere bei frühem Krankheitsbeginn, weniger Patienten mit dem als protektiv postulierten CC-Genotyp.

Im Folgenden wurde der funktionelle Promotor-Polymorphismus des *IL-6* als Kandidatengen angesehen und in zahlreichen genetischen Studien untersucht.

Lu KC et al. fanden, dass der Genotyp -174 GG des Promotor-Polymorphismus des *IL-6* mit einem deutlich erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Bronchiolitis obliterans nach Lungentransplantation einher geht [51].

In den letzten Jahren ergaben sich immer mehr Hinweise, dass in der Genese der koronaren Herzkrankheit inflammatorische Effekte eine Rolle spielen. Es konnte in einer Langzeitstudie, über einen Zeitraum von ca. 5 Jahren gezeigt werden, dass unter Statinbehandlung Patienten mit dem CC-Genotyp ein signifikant niedrigeres Risiko für koronare Herzkrankheit aufwiesen, als Patienten des GC- oder GG-Genotyp [3].

Ferrari et al. konnten 2003 eine Assoziation von erhöhten CRP-Werten im Serum und Osteokalzin, einem Marker für Knochenresorption, mit dem -174 G-Allel bei Frauen in der Postmenopause feststellen. Sowohl eine Erhöhung der CRP-Werte, als auch die Knochenresorption kann von IL-6 verursacht werden [15].

Schotte et al. konnten keinen signifikanten Unterschied in der Allelhäufigkeit des Promotor-Polymorphismus des *IL-6* bei Patienten mit systemischen Lupus erythematoses,

im Vergleich zu Gesunden, feststellen. Es bestand aber eine Assoziation mit dem -174 G-Allel und diskoiden Hautveränderungen, sowie Auftreten von Anti-Histon-Antikörpern [73].

Auch Hulkkonen et al. fanden keine Unterschiede in der Allelverteilung des -174 G/C-IL-6-Promotor-Polymorphismus bei Patienten mit Sjögrens's Syndrom im Vergleich zu gesunden Personen. Es waren allerdings bei Patienten mit dem Genotyp -174 GG und auch bei den gesunden Individuen mit diesem Allel, wie von Fishmann bereits beschrieben, erhöhte IL-6-Serumspiegel nachweisbar [32].

2. Zielsetzung dieser Arbeit

Die systemische Sklerodermie ist eine Autoimmunerkrankung mit entzündlichen Veränderungen an Gefäßen, der Haut und inneren Organen, sowie Produktion von Autoantikörpern und Fibrosierung des Bindegewebes, durch gesteigerte Fibroblastenaktivität.

In zahlreichen Untersuchungen wurde gezeigt, dass IL-6 in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen von Bedeutung sein kann und zudem bei der Stimulation von Fibroblasten eine entscheidende Rolle spielt.

Ein biallelischer IL-6-Genpolymorphismus (-174 G/C) in der Promotorregion von *IL-6* ist durch vermehrte Expression von *IL-6* in vitro und in vivo von funktioneller Bedeutung. Die homozygote Variante GG des IL-6-Gens wies signifikant erhöhte IL-6-Serumspiegel bei Gesunden und Patienten mit juveniler rheumatoider Arthritis.

In den Jahren 1991-2001 konnte ein Patientenkollektiv von 93 Patienten mit Subformen der Erkrankung systemische Sklerodermie klinisch charakterisiert und Proben zur DNA-Analyse extrahiert werden.

Es soll nun in dieser Arbeit die Hypothese untersucht werden, ob eine Assoziation der Guanin-Variante des *IL-6* -174 G/C Promotor-Polymorphismus (high response allele) mit dem Auftreten von systemischer Sklerodermie, einer klinischen Unterform, oder bestimmten klinischen Manifestationen, oder dem Muster der spezifischen Autoantikörper-Synthese assoziiert ist.

3. Material und Methoden

3.1. Patientenkollektiv

3.1.1. Erfassung der Patientenvariablen

Untersucht wurden insgesamt 112 Patienten mit systemischer Sklerodermie. Die Erfassung des Patientenkollektives und die Entnahme der Blutproben erfolgten zwischen 1991 und 2001, im Rahmen der Sklerodermie-Sprechstunde der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Es wurde den Kriterien der Vereinbarung von Helsinki entsprochen.

In die Studie aufgenommen wurden Patienten mit systemischer Sklerodermie, welche die Diagnosekriterien des American College of Rheumatology erfüllten, sowie eine kleinere Anzahl an Patienten mit MCTD und Overlap-Syndromen, sowie Patienten mit zirkumskripter Sklerodermie als Kontrollgruppe.

Die Patienten wurden vor der Blutentnahme zur Bestimmung des Promotor-Polymorphismus des IL-6-Gens aufgeklärt, dass die genetischen Grundlagen und die Pathophysiologie der Sklerodermie untersucht werden, gemäß der Deklaration von Helsinki nach der Novelle von 1989 zu ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen. Die Auswertung des Versuchsergebnisses wurde anonymisiert vorgenommen.

Die klinischen Daten bezüglich der Organmanifestation und der immunserologischen Parameter wurden anhand eines standardisierten Fragebogens erfasst und dokumentiert (siehe Anhang Seite 66-68).

3.1.2. Das Patientenkollektiv

Von den 112 eingeschlossenen Patienten waren 96 weiblichen und 16 männlichen Geschlechts.

Es erfolgte eine Aufteilung des Kollektivs in Patienten mit Systemerkrankung, diese wurden wiederum in 4 Untergruppen unterteilt (siehe Tabelle 6). So waren 93 der 112 erfassten Patienten an einer systemischen Sklerodermie, einem MCTD oder einem Overlap-Syndrom erkrankt. Unter den Patienten mit einer Systemerkrankung waren 79 weiblich und 14 männlich, das Verhältnis in dem vorliegenden Kollektiv betrug 5,6:1

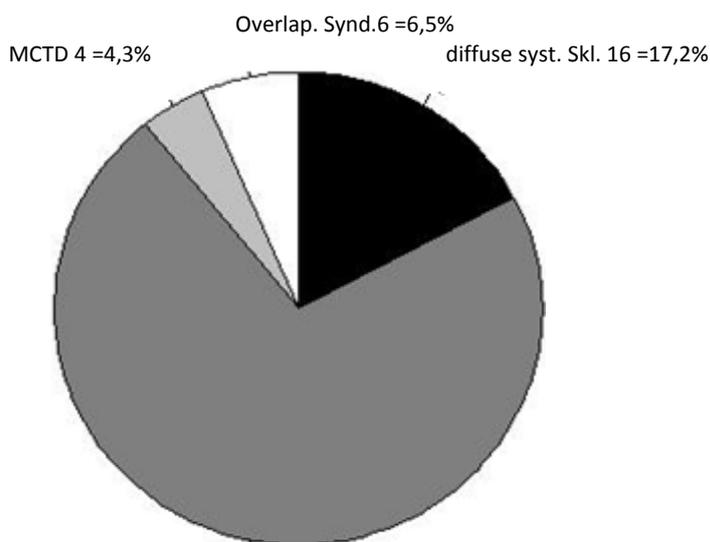
weiblich: männlich. 19 Patienten litten an einer zirkumskripten Sklerodermie. Das Verhältnis weiblich: männlich hier 8,5:1.

Tabelle 6 zeigte die Unterteilungen in die klinische Subgruppen, die absoluten Zahlen (N) und den prozentualen Anteil am Kollektiv der Patienten mit Systemerkrankung.

Klinische Subgruppe	Absolute Zahl (N)	Prozentualer Anteil(%)
Limitierte systemische Sklerodermie	67	72
Diffuse systemische Sklerodermie	16	17,2
Overlap-Syndrom/PM-Scl-AK positiv	6	6,5
MCTD	4	4,3

Tabelle 6: Unterteilung der 93 Patienten mit systemischer Erkrankung in klinische Subgruppen mit Angaben der absoluten Zahlen N und der prozentualen Anteile (%).

Die Abbildung 3 stellt die Verteilung in Form eines Kreisdiagramms dar.



limitierte systemische Sklerodermie 67=72%

Abbildung 3: Kreisdiagramm der prozentualen Anteile der klinischen Subgruppen am Kollektiv der Patienten mit Systemerkrankung. Die absoluten Zahlen (N) sind angeführt, die prozentualen Anteile befinden sich dahinter in Klammern.

Der größte Anteil der 93 erfassten Patienten mit Systemerkrankung litt an einer limitierten systemischen Sklerodermie 67 (72%). Bei 16 Patienten (17,2%) konnte eine diffuse Sklerodermie und bei 4 Patienten (4,3%) ein Sharp-Syndrom diagnostiziert werden. Bei 6 Patienten (6,5%) waren PM-Scl-Antikörper nachweisbar und es bestand das klinische Bild eines Overlap-Syndroms.

Wie bereits in der Zielsetzung formuliert, befasst sich die Untersuchung primär mit der Gruppe der Systemerkrankungen, die 19 Patienten der klinischen Kontrollgruppe mit zirkumskripter Sklerodermie wurde deshalb nicht weiter in klinische Subgruppen differenziert.

Die gesunde Kontrollgruppe bestand aus 79 freiwilligen kaukasischen Individuen, deren Anamnese keinen Anhalt für eine Erkrankung aus dem Formenkreis chronisch entzündlicher Erkrankungen bot.

3.2. Material

3.2.1. Reagenzien

Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
BSA	New England BioLabs
Borsäure	Merck, Darmstadt
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Pharmacia Freiburg
Ethanol	
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ficoll	Sigma, Deisenhofen
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
kb-Leiter	New England BioLabs
bp-Leiter	New England BioLabs
Tris	Merck, Darmstadt
Orange G	Sigma, Deisenhofen

3.2.2. Pufferlösungen

Erythrozytenlysepuffer:	155 mM NH_4Cl 10 mM KHCO_3 1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$
NEBuffer 4 pH 7,9	New England BioLabs 50 mM Ka-Acetat 20 mM Tris-Acetat 10 mM Mg-Acetat 1 mM DTT
Orange G Auftragspuffer	25% Ficoll 0,25% Orange G

PCR (10er-Pufferansatz)	Amerham, Pharmacia, Freiburg
	16 mM (NH ₄) ₂ SO ₂
	20 mM Tris-HCL (pH 8,55)
	1 mM MgCl ₂

TBE-Puffer pH 8,0 (10×)	890 mM Tris
	890 mM Borsäure
	20 mM Na ₂ -EDTA

TE-Puffer pH 7,5-8,0	10 mM Tris
	2 mM Na ₂ -EDTA

3.2.3. ssOligonukleotide

Primer forward: 5´-TTG`TCA AGA CAT GCC AGG TGC T-3 MWG-Biotech-AG

Primer reverse: 3´-GCC TCA GAG ACA TCT CCA GTC C-3` MWG-Biotech-AG

3.2.4. Enzyme

NlaIII	New England BioLabs
Taq-DNA-Polymerase	Amersham Pharmacia, Freiburg
Quiagen Protease	Quiagen, Hilden

3.2.5. Photomaterial

Sorotfilm Typ 667, Fa.Xxq. Polaroid

3.2.6. Technische Geräte

Thermocycler Gene Amp 9700	Perkin Elmer, Heidelberg
Photoinstrument GelDoc 2000	BioRAD

3.3. Methoden

3.3.1. Isolierung genomischer DNA aus Vollblut

Zur Gewinnung der zellulären Bestandteile werden zunächst, je nach Alter der Blutprobe, 3-30 ml EDTA oder Heparin-Blut bei 2000 g für circa 5 min zentrifugiert und der Plasmaüberstand verworfen. Das Sediment wird in 1 Vol Erythrozytenlysepuffer auf einem Labormischrad für 30 min bei Raumtemperatur gelöst, wobei es zur Erythrozytenlyse kommt. Danach wird das Leukozytensediment durch erneute Zentrifugation bei 2000 g für 20 min abgesetzt und das Erythrozytenlysat verworfen. Bei unvollständiger Erythrozytenlyse kann eine Wiederholung des vorherigen Arbeitsvorgangs notwendig sein. Nun wird das Leukozytensediment mit PBS gewaschen und mit 100%igem Ethanol gefällt. Die präzipitierte DNA wird zur Salzreduktion in 70%igem Ethanol gewaschen und in TE-Puffer oder autoklaviertem H₂O resuspendiert.

3.3.2. Gelelektrophorese von Doppelstrang-DNA

Die Auftrennung der Doppelstrang-DNA erfolgt mittels horizontaler Gelelektrophorese, wobei entsprechend der gewünschten relativen Größenauftrennung für PCR-DNA 1,5%iges Agarosegel und für mit Restriktionsendonukleasen gespaltene DNA 3,0%iges Agarosegel verwendet wird. Die Agarose wird in einem Mikrowellenofen mit dem entsprechenden Laufpuffer z.B. TBE-Puffer für PCR-DNA aufgeköcht und nach Zugabe von 0,1 µg/ml Ethidiumbromid in eine Horizontalgelkammer gegossen. Nach Polymerisierung des Gels kann die DNA aufgetragen werden. Zur Erleichterung des Einpipitierens wird die DNA-Lösung mit durch Orange G angefärbten Auftragspuffer vermischt. Die Elektrophorese erfolgt bei einer elektrischen Spannung von 2-8 V/cm. Durch zur Fluoreszenz angeregtes interkaliertes Ethidiumbromid werden die DNA-Banden bei UV-Licht von 260 nm Wellenlänge sichtbar gemacht und photographisch dargestellt (Gel Doc 2000, BioRAD). Zum Vergleich wird als Größenstandard eine 1-kb-Leiter aufgetragen.

3.3.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure erfolgt mit Hilfe des Spektralphotometers. Zur Messung wird die DNA-Suspension in eine Quarzküvette

(bessere Durchlässigkeit im UV-Lichtbereich) gefüllt und die Absorption bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von DNA bestimmt. Der optischen Dichte von 1 entsprechen 50 µg/ml dsDNA. Zur Reinheitsbestimmung wird die Absorption bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen gemessen, und der Quotient aus optischer Dichte bei 260 nm und optischer Dichte bei 280 nm berechnet. Für reine DNA ergibt sich ein Wert von 1,8. Bei Verunreinigung durch Proteine werden entsprechend niedrigere Werte ermittelt.

3.3.4. Polymerasekettenreaktion genomischer DNA

Die PCR (Polymerase chain reaction) ist eine 1988 von Saiki et al. eingeführte Methode, mit der sequenzspezifische DNA-Stücke begrenzter Länge, in nacheinander ab folgenden Zyklen, exponentiell amplifiziert werden können.

Dabei wird zunächst der DNA-Doppelstrang bei 94 °C denaturiert und in Einzelstränge aufgetrennt. Darauf hybridisieren kurze spezifische Oligonukleotide, sogenannte Primer, die den entsprechenden DNA-Abschnitt von beiden Seiten her begrenzen, mit den jeweils komplementären Basensträngen. Der Forward-Primer wird vom 5'-Ende Richtung 3'-Ende abgeleitet und der Reverse-Primer vom 3'-Ende in Richtung 5'-Ende. Bei der Auswahl der Primer ist darauf zu achten, dass diese eine ähnliche Schmelztemperatur aufweisen, die sich wie folgt berechnet:

$[m(A/T) \times 2 \text{ °C} + n(G/C) \times 4 \text{ °C}] - 5 \text{ °C}$; wobei m=Anzahl der dATP und der dTTP im Primer und n=Anzahl der dCTP und der dGTP im Primer darstellen. Darüber hinaus sollte die Anfangs- und Endsequenz der Primer nicht komplementär zueinander sein, um eine Zirkularisierung der Primer oder eine Di- oder Konkatamerbildung zu vermeiden.

An den durch die Primer markierten dsDNA-Anteilen beginnt mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase die Synthese des jeweiligen Gegenstrangs unter Verwendung der freien dNTPs. Die Taq-DNA-Polymerase ist ein thermostabiles Enzym das aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert werden konnte. Die optimale Reaktionstemperatur liegt bei 72 °C. Durch die Hitzestabilität nimmt das Enzym aber auch bei der Denaturierung der DNA bei 94 °C keinen Schaden. Die verschiedenen Zyklen werden in einem programmierbaren Thermoprozessor durchlaufen.

3.3.4.1. Polymerasekettenreaktion der Interleukin-6-Promotorregion

Die PCR des *IL-6*-Promotor-Abschnitts (303 bp) wird mit Hilfe eines automatischen Thermoprozessors durchgeführt. Die Konzentration der verwendeten DNA muss zuvor bestimmt (siehe Abschnitt 3.3.3.) und auf eine Konzentration von 50 ng/μl verdünnt werden. Für die verwendeten Primer kann eine Annealingtemperatur von 62 °C berechnet werden (siehe 3.3.4).

Primer forward: 5'-TTG`TCA AGA CAT GCC AGG TGC T-3

Primer reverse: 3'-GCC TCA GAG ACA TCT CCA GTC C-3`

Die Amplifikation erfolgt in einem 20 μl Ansatz aus 2 μl DNA-Lösung (50 ng/μl), 2 μl 10xPCR Puffer, 2 μl dNTPs , 1 μl je ssOligonukleotid Primer, 0,1 μl Taq-DNA-Polymerase (0,03U/μl) und 11,9 μl Aqua dest.

PCR-Bedingungen:

Anfangsdenaturierung:	5 min	95 °C
30 Zyklen Denaturierung	60 sec	94 °C
Annealing	30 sec	62 °C
Extension	50 sec	72 °C
letzter Zyklus, Extension	10 min	72 °C

Die amplifizierte DNA kann nach Abschluss der 30 Zyklen auf einem Agarosegel (Kapitel 3.2.2.) dargestellt und analysiert werden (Abbildung 4).

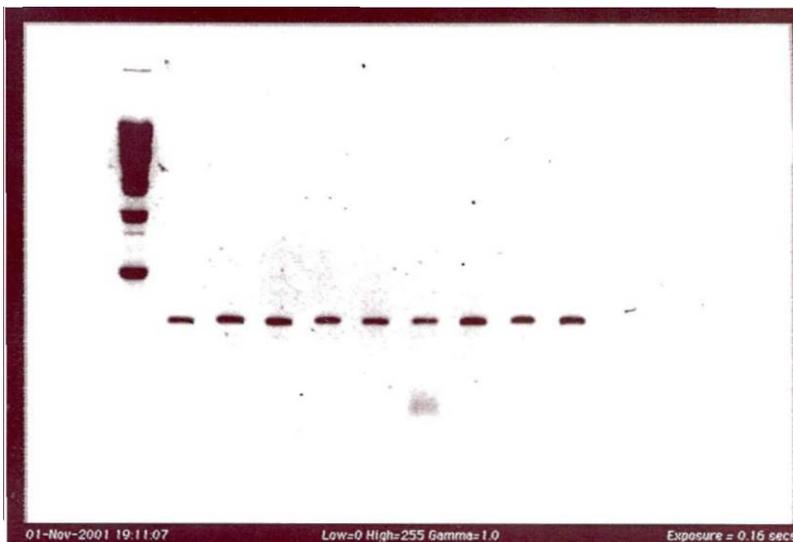


Abbildung 4: Darstellung des PCR Produkts in einem 1,5%igem Agarosegel. Der Promotorabschnitt des Interleukin-6-Gens (Amplifikat) hat eine Länge von 303 bp. Dieses kommt entsprechend seiner geringeren Größe unterhalb der 1 kb-Leiter zur Darstellung. Durch zur Fluoreszenz angeregtes interkaliertes Ethidiumbromid werden die DNA-Banden bei UV-Licht von 260 nm Wellenlänge sichtbar und in der GelDoc Kammer photographisch dargestellt und fixiert.

3.3.5. Spezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die spezifische Spaltung von DNA erfolgt mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen. Hierbei handelt es sich um bakterielle Enzyme die dsDNA an einer spezifischen Sequenz durch Hydrolysierung der Phosphodiesterasebindung spalten können. Es entstehen dadurch glatte Enden oder Einzelstränge mit 3'- oder 5'- Überhängen. Die optimalen Reaktionsbedingungen sind von den jeweiligen Bakterienspezies abhängig. Die Reaktion benötigt Magnesium als Kofaktor und kann deshalb durch Chelatbildner, wie Na-EDTA gehemmt werden.

3.3.5.1. Restriktionslängen-Polymorphismus der Interleukin-6-Promotorregion

Zum Nachweis des Promotor-Polymorphismus des *IL-6*-Gens in Position -174G/C kommt das Enzym NlaIII zum Einsatz. Das Enzym kann aus *E. coli*-Stämmen gewonnen werden, die das nachgebildete Gen von *Neisseria lactamica* tragen. Die Restriktionsendonuklease hat eine Reaktionstemperatur von 37 °C und muss bei -70 °C gelagert werden. Die Erkennungsregion der NlaIII lautet



Das, die -174 bp- Region des Interleukin-6-Promotors enthaltende PCR-Produkt (siehe 3.3.4.1) aus 303 bp wird durch die NlaIII folgendermaßen gespalten.

Das G-Allel des -174G/C Polymorphismus enthält die Erkennungsregion nicht und wird deshalb in nur 2 Fragmente aus 246 bp und 57 bp getrennt. Das C-Allel enthält die Region und kann so in 3 Sequenzen aus 135 bp, 111 bp und 57 bp gespalten werden. Der Verdau erfolgt in einem 20 µl Ansatz aus 15 µl NlaIII Reaktionspuffer, bestehend aus 3,0 µl NEBuffer, 0,3 µl BSA, 0,3µl NlaIII, und 5µl amplifizierter DNA. Der Verdau wird bei 37 °C für 2 Stunden inkubiert und mittels einem 2% Agarosegel analysiert (siehe 3.2.2) (Abbildung 5).

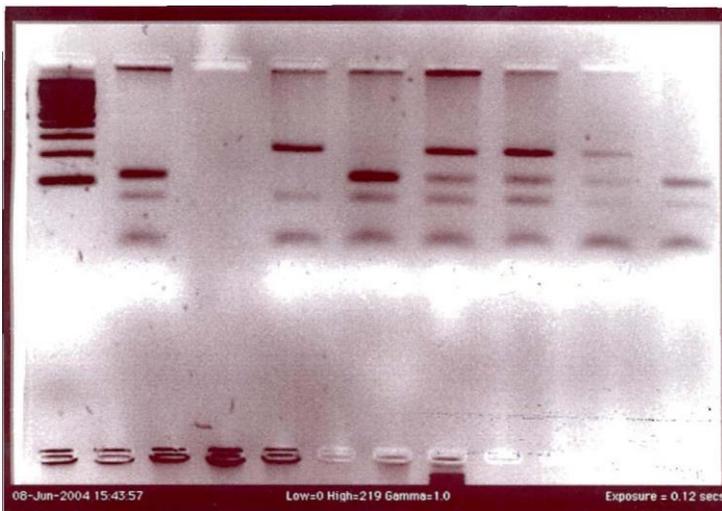


Abbildung 5: Darstellung des Restriktionslängen-Polymorphismus der *IL-6*-Promotorregion auf 2%igem Agarosegel. Das G-Allel wird in 2 Fragmente getrennt zu jeweils 246 bp und 57 bp. Das C-Allel wird in die 3 Fragmente von 135 bp und 111bp und 55 bp gespalten. Die Fragmente von 135 bp und 111 bp erscheinen auf Grund ihres geringen Größenunterschiedes als eine Bande. Die bp-Leiter wird als Größenvergleich aufgetragen. Die photographische Darstellung erfolgt durch fluoreszierendes Ethidiumbromid in der GelDoc Kammer.

3.4. Statistische Auswertung

Die interessierenden Variablen in dem vorliegenden Datensatz sind kategoriale Variablen mit wenigen Ausprägungen. Er erfolgte zur Prüfung eines Zusammenhangs dieser Variablen die Analyse einer Kontingenztafel unter Anwendung des χ^2 -Unabhängigkeitstests. Dieser Test fordert mindestens fünf Beobachtungen in jeder Zelle der Kontingenztafel. Als Alternative wurde deshalb bei geringeren Fallzahlen der exakte Fisher-Test angewandt.

Beide Tests liefern den p-Wert, der erkennen lässt, ob der Zusammenhang der Variablen signifikant ist. Bereits vor der Analyse wurde anhand der Stichprobengröße ein Signifikanzniveau von 0,05 gewählt.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung des Patientenkollektives

4.1.1. Organbeteiligung

Die Organbeteiligung der 93 Patienten mit systemischer Erkrankung wurde anhand eines standardisierten Fragebogens die derzeitige klinische Situation nach Anamnese und internistischen und radiologischen Konsilen erfasst (siehe Anhang Seite 68-70).

An Hautmanifestationen wurden Raynaud-Syndrom, Sicca-Syndrom, Teleangiektasien, Sklerodaktylie und Fingerulzerationen dokumentiert.

Zur Identifizierung einer Ösophagusbeteiligung wurden nach Entleerungsstörungen oder Refluxerkrankung und deren Nachweis gefragt. Zur Beurteilung einer Lungenbeteiligung wurden die Ergebnisse der Bildgebung und der Lungenfunktion mit Frage nach Ventilationsstörung oder Diffusionsstörung herangezogen. Hinweise auf eine kardiale Beteiligung lieferten das EKG und die Herzechokardiographie. Eine renale Organmanifestation wurde anhand der Proteinurie, einer Nierenfunktionseinschränkung oder einer ausgeprägten Hypertonie erfasst.

Ob eine Gelenkbeteiligung, Myositis oder Calcinosis vorlag, richtete sich nach der klinischen Beurteilung.

Die Abbildung 6 bildet die Häufigkeiten der Organmanifestationen der Patienten mit systemischer Sklerodermie ab.

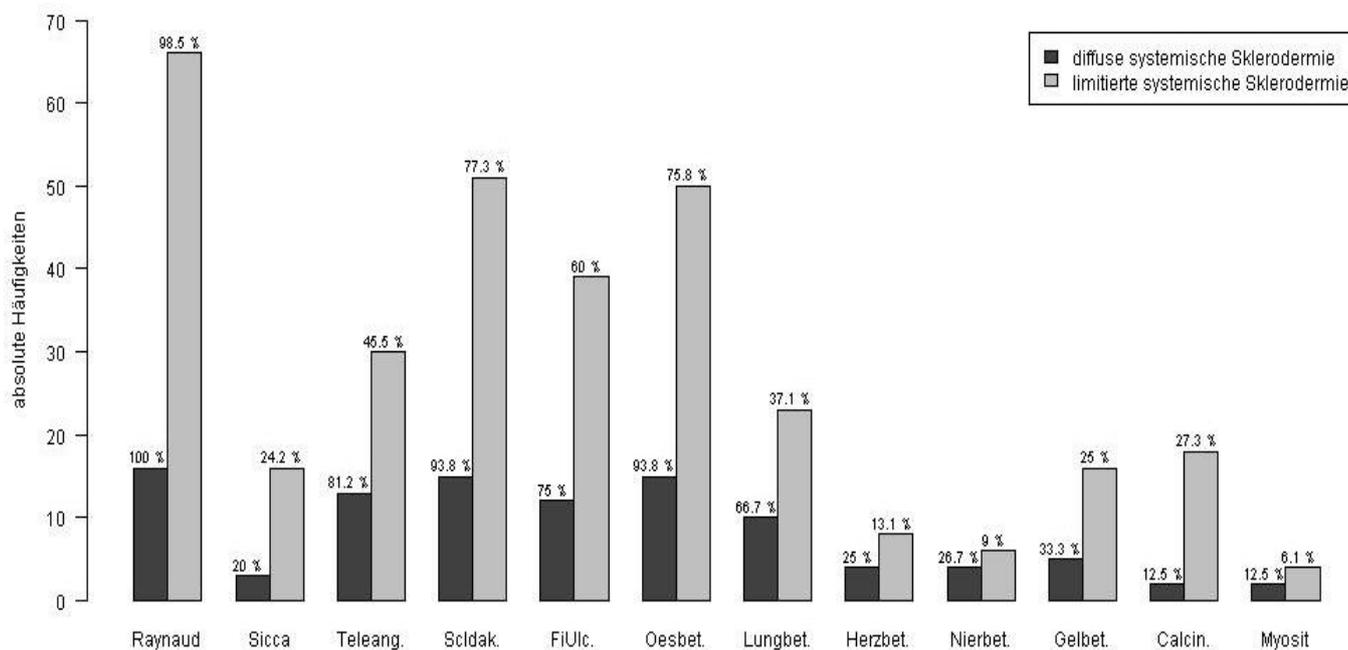


Abbildung 6: Darstellung der klinischen Merkmale bei den Patienten mit systemischer Sklerodermie, unterteilt in diffuse systemische Sklerodermie und limitierte systemische Sklerodermie, anhand eines Balkendiagramms. Auf der vertikalen Achse sind die absoluten Häufigkeiten (N) angegeben, die relativen Häufigkeiten sind in Prozent über den Balken aufgetragen. Die Ösophagus-Beteiligung findet sich zum Beispiel bei 93,8% (N=15) der Patientengruppe mit diffuser systemischer Sklerodermie und bei 75,8% (N=50) der Patienten mit limitierter systemischer Sklerodermie. Aus der unterschiedlichen Größe der betrachteten Kollektive (16 Patienten mit diffuser systemischer Sklerodermie und 67 Patienten mit limitierter systemischer Sklerodermie) ergibt sich die geringere Balkenhöhe trotz prozentual größerem Anteil.

Die häufigste Manifestation der Haut stellt das Raynaud-Syndrom dar. Es lag bei 100% der Patienten mit diffuser systemischer Sklerodermie vor und bei 98,5% der Patienten mit limitierter systemischer Sklerodermie, insgesamt wiesen 82 Patienten ein Raynaud-Syndrom auf.

An Organmanifestationen findet sich primär eine Beteiligung des Ösophagus bei insgesamt 65 Patienten, dabei bei 15 der Patienten mit diffuser systemischer Sklerodermie (93,8%) und 50 der Patienten mit limitierter systemischer Sklerodermie (75,8%). Die Beteiligung der inneren Organe ist in der Gruppe der Patienten mit diffuser systemischer Sklerodermie, wie zu erwarten, deutlich häufiger. So zeigt sich eine Lungenbeteiligung bei 66,7% (N=10) der Patienten mit diffuser systemischer Sklerodermie versus 37,1% (N=23) bei Patienten

mit limitierter systemischer Sklerodermie, eine kardiale Beteiligung bei 25% (N=4) versus 13,1% (N=8) und eine Nierenbeteiligung bei 26,7% (N=4) versus 9% (N=6). Eine entzündliche Gelenkerkrankung boten 33,3 % (N=5) Patienten in der Gruppe der diffusen systemischen Sklerodermie und 25% (N=16) der Gruppe der limitierten systemischen Sklerodermie. Eine Calcinosis z.B. im Rahmen eines CREST-Syndroms fand sich häufiger bei Patienten mit limitierter systemischer Sklerodermie mit 27,3% (N=18) im Vergleich zu 12,5% (N=2) bei Patienten mit diffuser systemischer Sklerodermie. Eine Myositis war in beiden Gruppen wenig häufig.

Die Organbeteiligungen beim Overlap-Syndrom und MCTD wurden extra betrachtet und in der Abbildung 7 dargestellt. Es ist hier zu beachten, dass in beiden Untergruppen nur eine sehr geringe Fallzahl vorlag.

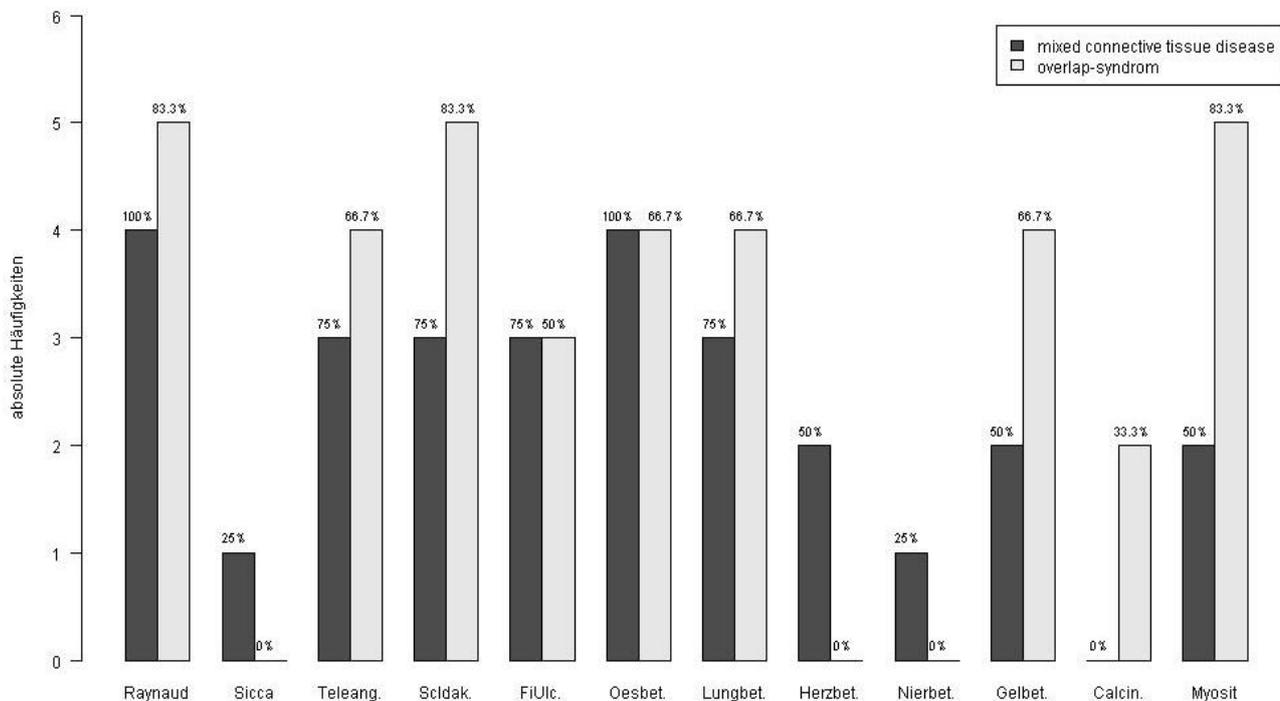


Abbildung 7: Darstellung der Organmanifestationen bei den Patienten mit MCTD und Overlap-Syndrom anhand eines Balkendiagramms. Auf der vertikalen Achse sind die absoluten Häufigkeiten (N) angegeben, die relativen Häufigkeiten sind in Prozent über den Balken aufgetragen. Das Raynaud-Syndrom findet sich zum Beispiel bei 100% (N=4) der Patientengruppe mit MCTD-Syndrom und bei 83,3% (N=5) der Patienten mit Overlap-Syndrom. Aus der unterschiedlichen Größe der betrachteten Kollektive (4 Patienten mit MCTD-Syndrom und 6 Patienten mit Overlap-Syndrom) ergibt sich die geringere Balkenhöhe trotz prozentual größerem Anteil.

Es zeigt sich in dem Patientenkollektiv bei der MCTD eine häufigere Beteiligung innerer Organe als bei dem Overlap-Syndrom. Auch hier ist der obere Gastrointestinaltrakt mit 100% (N=4) der Patienten mit MCTD und 66,7% (N=4) der Patienten mit Overlap-Syndrom das am häufigsten betroffene Organsystem. Gefolgt von der Lungenbeteiligung mit 75% (N=3) bei den Patienten mit MCTD und 66,7% (N=4) der Patienten mit Overlap-Syndrom. Ein Raynaud-Syndrom trat bei allen erfassten Patienten (N=4) mit MCTD auf und bei den meisten Patienten (83,3%) (N=5) der Patienten mit Overlap-Syndrom. Im Vergleich zu der Patientengruppe der systemischen Sklerodermie ist deutlich häufiger eine Gelenkbeteiligung und Myositis zu finden. Beim Overlap-Syndrom liegt der Anteil der Patienten mit Myositis bei 83% (N=5).

4.1.2. Assoziation zur Ausbildung verschiedener Autoantikörper

Es erfolgte bei allen Patienten mit Systemerkrankung die Bestimmung der ANA mit entsprechender ENA-Differenzierung.

Die Häufigkeit der Fluoreszenzmuster der ANA ist in Form eines Kreisdiagramms dargestellt.

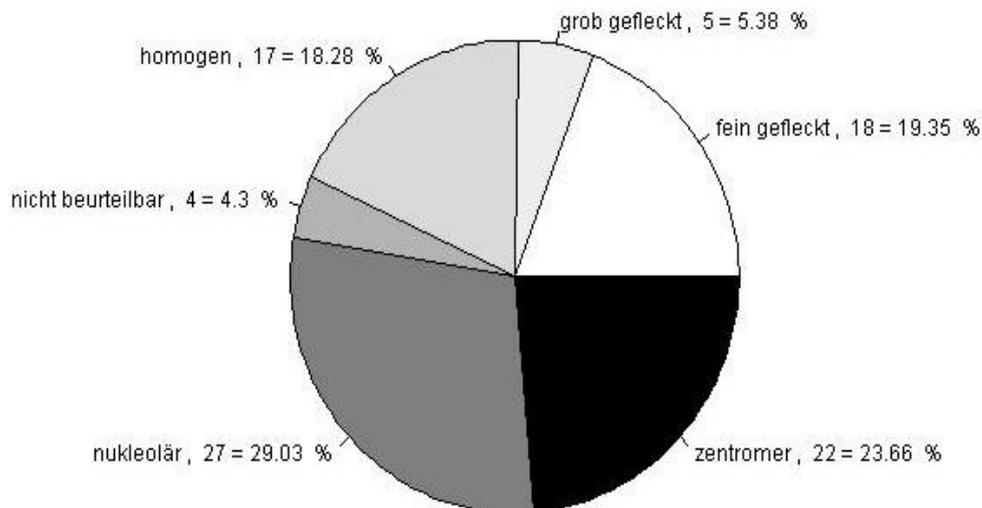


Abbildung 8: Kreisdiagramm der prozentualen Anteile der 6 unterschiedlichen ANA-Muster (homogen, grob gefleckt, fein gefleckt, nukleolär, zentromer) bei den 93 Patienten mit systemischer Sklerodermie. Die absoluten Zahlen (N) sind angeführt, die prozentualen Anteile finden sich dahinter (%).

Neben einem nukleolären Fluoreszenzmuster mit 29% ist fast ebenso häufig ein zentromeres Muster mit 23,6% zu finden.

Darüber hinaus sind neben dem zentromeren ANA-Muster (CENP), wegen der diagnostischen und prognostischen Aussagekraft insbesondere Scl-70-AK, PM-Scl-AK und U1-RNP-AK von Bedeutung. So ist CENP zumeist bei Patienten mit limitierter systemischer Sklerodermie nachweisbar. Das Auftreten von Scl-70-AK ist spezifisch für eine diffuse systemische Sklerodermie mit schwerer Organbeteiligung. PM-Scl-AK ist wichtig für die Diagnosestellung eines Overlap-Syndroms und Anti-U1-RNP-AK insbesondere bei Patienten mit MCTD zu finden.

Die Abbildung 9 zeigt die Antikörperverteilung bei den 4 klinischen Untergruppen.

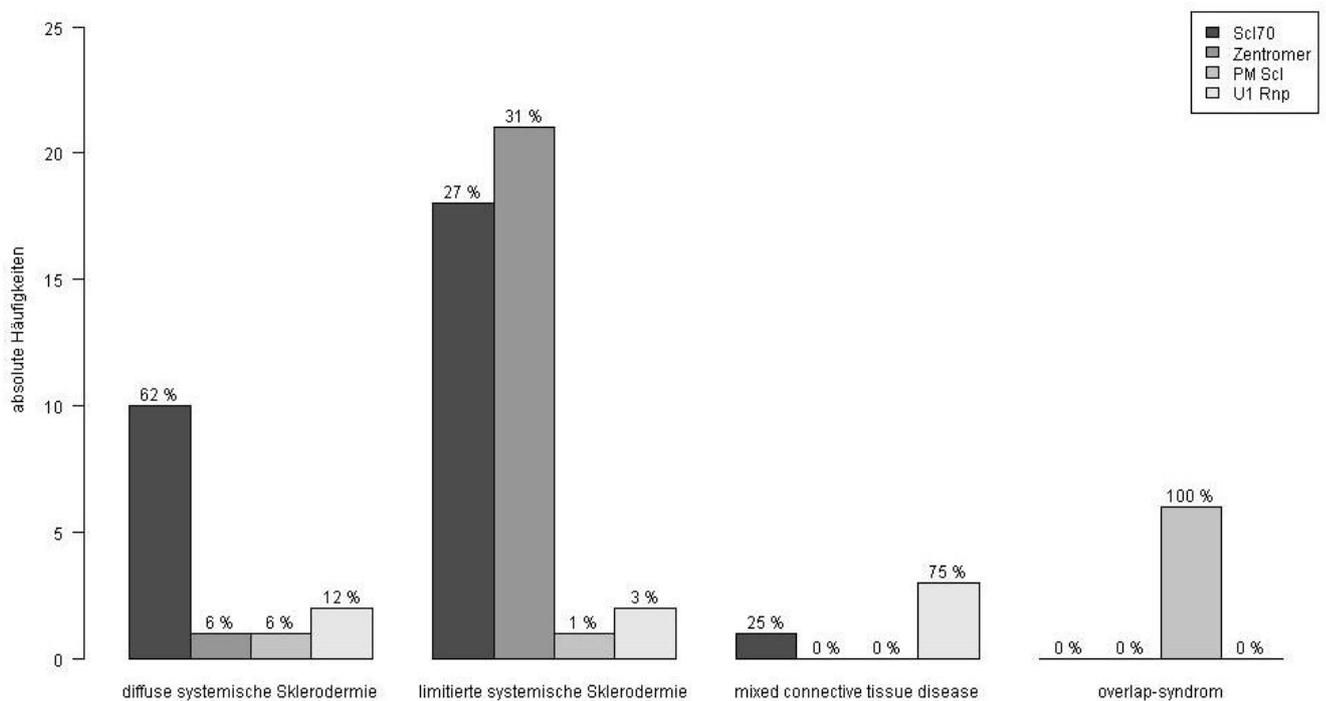


Abbildung 9: Darstellung der Autoantikörperverteilung nach 4 klinischen Untergruppen der systemischen Sklerodermie in Form eines Balkendiagramms. Auf der vertikalen Achse sind die absoluten Häufigkeiten (N) angegeben, die relativen Häufigkeiten sind in Prozent über den Balken aufgetragen (%). Die Erkrankungen sind unterhalb der x-Achse benannt. Beispielsweise boten 62% (N=10) der Patienten von insgesamt 16 Patienten mit diffuser systemischer Sklerodermie den positiven Nachweis von Scl-70-AK. Aus der unterschiedlichen Größe der betrachteten Kollektive (4 Patienten mit MCTD-Syndrom und 6 Patienten mit Overlap-Syndrom) ergibt sich die geringere Balkenhöhe trotz prozentual größerem Anteil.

Von den Patienten mit limitierter Systemerkrankung waren 31% CENP positiv, wobei nur 6% der Patienten mit diffuser systemischer Sklerodermie einen positiven CENP Nachweis zeigten.

Umgekehrt waren auch bei 18 Patienten (27%) mit dem klinischen Bild einer limitierten systemischen Sklerodermie Scl-70-AK positiv.

Wie zu erwarten war, zeigte sich bei insgesamt 7 Patienten mit positivem Nachweis von U1-RNP-AK dieser AK insbesondere bei Patienten mit MCTD assoziiert (75%).

Der PM-Scl-AK ist hoch spezifisch für das klinische Bild eines Overlap-Syndroms aus Polymyositis und systemischer Sklerodermie und bei 100% der hier erfassten Patienten mit Overlap-Syndrom nachweisbar. Bei einem der Patienten ist sowohl der PM-Scl-AK nachweisbar, als auch Anti-Scl-70, er bietet aber das klinische Bild einer limitierten systemischen Sklerodermie ohne Nachweis einer Polymyositis oder einer ausgeprägten Organbeteiligung. Sicherlich ist zu diskutieren, ob dieser Patient im weiteren Erkrankungsverlauf erst entsprechende klinische Ausprägungen zeigen wird und keine limitierte systemische Sklerodermie sondern eine Overlap-Syndrom oder ob sich im weiteren Krankheitsverlauf Merkmale einer diffusen systemischen Sklerodermie manifestieren.

4.2. Untersuchung des Promotor-Polymorphismus des IL-6-Gens in Position -174 G/C

Es werden im Folgenden die Ergebnisse der Phänotyp- und Allelverteilung des Promotor-Polymorphismus des *IL-6*-Gens in Position -174 G/C bei Patienten mit zirkumskripter Sklerodermie, systemischer Sklerodermie, MCTD und Overlap-Syndrom aufgeführt und verglichen. Ob eine signifikante Abweichung der Genotyp- oder Allelfrequenz zur Kontrollgruppe aus 79 gesunden Kaukasiern besteht, wurde überprüft.

Zudem wurde untersucht, ob sich eine Assoziation der Allelausprägung mit den entsprechenden Organmanifestationen oder den verschiedenen spezifischen Autoantikörpern besteht.

Die Kontrollgruppe aus 79 gesunden Kaukasiern wurde nach Phänotyp- und Allelverteilung überprüft. Hiervon trugen 16 (20%) den CC-Genotyp, 42 (53%) waren heterozygot und 21 (27%) waren homozygot für das G-Allel. Die Kontrollgruppe wird in der tabellarischen Darstellung der Ergebnisse jeweils in der ersten Zeile dargestellt (siehe zum Beispiel Tabelle 7).

4.2.1. Assoziation des Promotor-Polymorphismus des IL-6-Gens in Position -174 G/C mit systemischer Sklerodermie im gesamten Patientenkollektiv

Von den 93 Patienten mit systemischer Sklerodermie, darunter die Patienten mit limitierter und diffuser systemischer Sklerodermie, MCTD und Overlap-Syndrom zusammengefasst, trugen 24 (25%) das CC-Allel, 34 (37%) waren für GC heterozygot und 35 (38%) waren für GG homozygot.

Es wurde nun mit dem X²-Test überprüft ob sich ein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung zwischen den Patienten in der Kontrollgruppe und den 93 Patienten aufzeigen lässt. Dabei erfolgte wiederum ein Vergleich der Genotyp-, als auch der Allelfrequenzen. Bei X²=4,835 und einem p-Wert von 0,09 lässt sich bei dem zuvor festgelegten Signifikanzniveau von 0,05 kein eindeutiger Zusammenhang der polymorphen Genotypen des IL-6-Gens feststellen. Im Vergleich der Allelfrequenz mit X²=0,04 und einem p-Wert von 0,84 ist ebenfalls keine Tendenz zur Assoziation des G-Allels erkennbar.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 aufgeführt.

	CC	CG	GG	Σ	X ²	p	G-Frequenz	X ²	p
Kontrollgruppe	16 20%	42 53%	21 27%	79			42 53%		
Patienten mit Systemerkrankung	24 25%	34 37%	35 38%	93	4,84	0,09	52 56%	0,04	0,84

Tabelle 7: Darstellung der Ergebnisse der Analyse des IL-6 -174 G/C Promotor-Polymorphismus im Kollektiv der Patienten mit systemischer Sklerodermie, bestehend aus Patienten mit systemischer Sklerodermie, MCTD und Overlap-Syndrom, im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Es sind jeweils die absoluten und darunter die prozentualen Anteile angegeben. Der X²-Wert und der p-Wert beziehen sich jeweils auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe gesunder Individuen.

Zudem wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den klinischen Unterformen limitierte systemischer Sklerodermie, diffuse systemische Sklerodermie, MCTD oder Overlap-Syndrom und der Allelverteilung vorliegt. Wegen der kleinen Fallzahlen wurde der exakte Fisher`s-Test verwendet.

Für die limitierte systemische Sklerodermie mit 67 Patienten zeigt sich hier ein signifikanter Unterschied der Genotypenverteilung zugunsten des GG-Genotyps im Vergleich zur Kontrolle. Es waren in dieser Gruppe 18 (27%) Träger des CC-Genotyps, 22 (33%) waren homozygot und 27 (40%) Träger des GG-Genotyps. Die Anwendung des X²-

Tests ergab eine $X^2=6,173$ und einen p-Wert von 0,045, welches knapp unter dem gewählten Signifikanzniveau von 0,05 liegt. Im Vergleich der Allelfrequenzen des G-Allels ist mit einem $X^2=0,07$ und einem p-Wert von 0,79 kein signifikanter Zusammenhang zu errechnen.

In der Gruppe der diffusen systemischen Sklerodermie mit 16 Patienten zeigten 3 (19%) das CC-Allel, 8 (50%) das GC-Allel und 5 (31%) das GG-Allel, die Anwendung des exakten Fisher`s-Tests ergab keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

Ebenso in der Untergruppe der Patienten mit MCTD, hier waren von den 4 Patienten 2 (50%) heterozygot und 2 (50%) Träger des GG-Allels. Somit würde sich hier eine Tendenz zum vermehrten Vorkommen des GG-Genotyps zeigen. Wegen der sehr niedrigen Fallzahl von 4 ist allerdings keine statistische Berechnung des Signifikanzniveaus möglich.

In der kleinen Untergruppe der Patienten mit Overlap-Syndrom trugen 3 Patienten (50%) den CC-Genotyp, 2 (33%) waren heterozygot und 1 Patient den GG-Genotyp. Unter isolierter Betrachtung der prozentualen Verteilung der Allele im Vergleich zur Kontrollgruppe lässt sich eine Tendenz mit höherer Frequenz des CC-Allels vermuten. Auch hier lässt sich jedoch bedingt durch die geringe Fallzahl kein Signifikanzniveau ermitteln. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 aufgeführt.

	CC	GC	GG	Σ	X^2	p	G-Frequenz	X^2	p
Kontrollgruppe	16 20%	42 53%	21 27%	79			42 53%		
limitierte systemische Sklerodermie	18 27%	22 33%	27 40%	67	6,17	0,045	38 57%	0,07	0,79
diffuse systemische Sklerodermie	3 19%	8 50%	5 31%	16	0,15	0,93F	9 56%	0,09	0,96
MCTD	0 0%	2 50%	2 50%	4	0,47	0,65F	3 75%	0,12	0,62F
Overlap-Syndrom	3 50%	2 33%	1 17%	6	0,24	0,20F	2 33,3%	0,26	0,42F

Tabelle 8: Ergebnisse der Abhängigkeitsanalyse der Allelverteilung des *IL-6* -174 G/C Promotor-Polymorphismus in Bezug auf die klinischen Unterformen der systemischer Sklerodermie. Es sind jeweils die absoluten und darunter die prozentualen Anteile angegeben. Der X^2 -Wert und der p-Wert beziehen sich jeweils auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe. Bei Berechnung durch den exakten Fisher`s-Test ist der p-Wert mit F markiert, die Berechnung der übrigen p-Werte erfolgte durch den X^2 -Unabhängigkeitstest.

Die Genotypen Verteilung der klinischen Untergruppen ist in der folgenden Abbildung 10 in Form eines Balkendiagramms dargestellt.

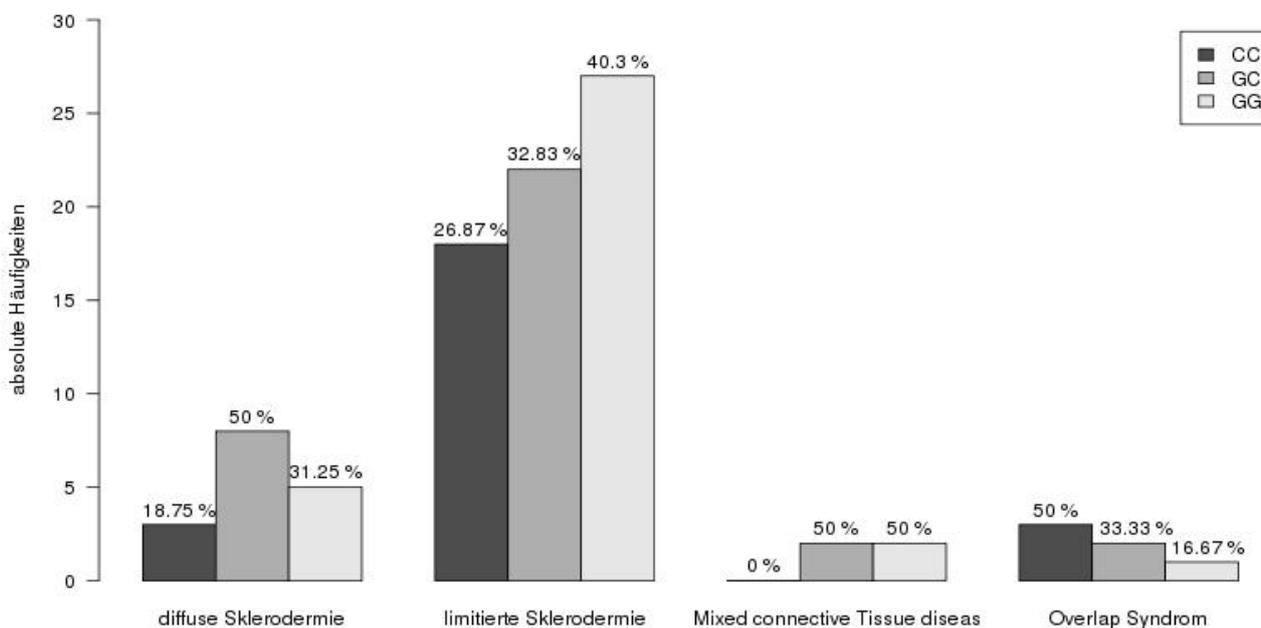


Abbildung 10: Darstellung der Genotypenverteilung des *IL-6* -174 G/C Promotor-Polymorphismus und der klinischen Untergruppen der systemischen Sklerodermie in Form eines Balkendiagramms. Auf der vertikalen Achse sind die absoluten Häufigkeiten angegeben, die prozentualen Anteile sind über den jeweiligen Balken aufgetragen. Die Erkrankungen sind unterhalb der x-Achse benannt. Beispielsweise waren 40% (N=27) der 67 Patienten homozygote Träger des G-Allels.

4.2.2. Assoziation des Promotor-Polymorphismus des *IL-6*-Gens in Position -174 G/C mit den Organmanifestationen

Einleitend kann gesagt werden, dass sich bei der Analyse der Allelverteilung im Hinblick auf die häufigsten Organbeteiligungen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen ließen. Lediglich bei den 11 Patienten mit Nierenbeteiligung waren 6 Patienten (55%) homozygot für GG, und nur 1 Patient (9%) homozygot für CC. Es besteht somit hier eine Tendenz zur Häufung des GG-Allels. Auf Grund der geringen Fallzahlen errechnete sich anhand des exakten Fisher`s-Tests jedoch kein signifikanter p-Wert ($p=0,203$). Auch der Vergleich der Allelfrequenzen erbrachte keine Signifikanz, hier errechnet sich ein p-Wert von 0,33.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 aufgeführt.

	CC	CG	GG	Σ	X ²	p	G-Frequenz	X ²	p
Kontrollgruppen	16 20%	42 53%	21 27%	79			42 53%		
Lungenbeteiligung	10 25%	18 45%	12 30%	40	0,74	0,70	21 52%	0,02	0,90
Ösophagusbeteiligung	19 26%	27 37%	27 37%	73	2,12	0,35	40,5 55%	4,04	0,130
Herzbeteiligung	3 22%	9 64%	2 14%	14	1,00	0,68F	6,5 46%	0,03	0,86
Nierenbeteiligung	1 9%	4 36%	6 55%	11	3,69	0,20F	8 73%	0,81	0,33F
Gelenkbeteiligung	7 26%	10 37%	10 37%	27	2,12	0,35F	15 56%	0,00	1,0
Calcinosis cutis	3 14%	9 41%	10 45%	22	2,29	0,25F	14,5 66%	0,68	0,41

Tabelle 9: Abbildung der Ergebnisse der Allelverteilung des *IL-6* -174 G/C Promotor-Polymorphismus im Hinblick auf die Organbeteiligung. In der ersten Zeile ist die Kontrollgruppe aufgeführt. Bei Berechnung durch den exakten Fisher`s-Test ist der p-Wert mit F markiert, die Berechnung der übrigen p-Werte erfolgte durch den X²-Unabhängigkeitstest.

4.2.3. Assoziation des Promotor-Polymorphismus des *IL-6*-Gens in Position - 174 G/C mit spezifischen Autoantikörpern

Es wurde die Allel-Verteilung in Bezug auf die spezifischen Autoantikörper bei systemischer Sklerodermie untersucht. Interessant erscheint hier die Allelverteilung in der Patientengruppe mit Nachweis von U1-RNP-AK. Von 7 Patienten war kein Patient homozygot für das CC-Allel, 3 (43%) waren heterozygot und 4 (57%) homozygot für das G-Allel. Die Anwendung des exakten Fisher`s-Tests im Vergleich der Genotypen ergab ein X²=3,614 und einen p-Wert von 0,21. Im Vergleich der G-Allelfrequenz mit hier 5,5 Patienten (79%) errechnete sich ein X²= 0,80 und ein p-Wert von 0,29. Auch hier wäre eine Untersuchung an einer größeren Fallzahl sehr wünschenswert.

Es liess sich keine signifikante Assoziation zwischen der Ausprägung des Allels des *IL-6* - 174 G/C Promotor-Polymorphismus und der Bildung der spezifischen Autoantikörper feststellen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt.

	CC	GC	GG	Σ	X ²	p	G-Frequenz	X ²	p
Kontrollgruppe	16 20%	42 53%	21 27%	79			42 53%		
ANA Muster zentromer	5 23%	10 45%	7 32%	22	0,42	0,81	12 55%	0,02	0,90
Sc1-70	7 24%	14 48%	8 28%	29	0,26	0,88	15 52%	0,00	0,93
U1-RNP	0 0%	3 43%	4 57%	7	3,61	0,21 F	5,5 79%	0,80	0,29F
PM-Scl	3 38%	3 38%	2 24%	8	1,34	0,49 F	3,5 47%	0,02	1,0F

Tabelle 10: Abbildung der Ergebnisse der Allelverteilung des *IL-6* -174 G/C Promotor-Polymorphismus in Bezug auf die spezifischen Autoantikörper bei systemischer Sklerodermie. In der ersten Zeile ist die Kontrollgruppe aufgeführt. Bei Berechnung durch den exakten Fisher's-Test ist der p-Wert mit F markiert, die Berechnung der übrigen p-Werte erfolgte durch den X²-Unabhängigkeitstest.

4.2.4. Assoziation des Promotor-Polymorphismus des *IL-6*-Gens in Position -174 G/C mit zirkumskripter Sklerodermie

Als externe Krankheitskontrolle wurden in dieser Studien 19 Patienten mit zirkumskripter Sklerodermie erfasst, davon waren 3 (16%) homozygot für CC, 12 (63%) heterozygot und 4 (21%) homozygote Träger des GG-Genotyps. Die Prozentuale Verteilung der Allele war ähnlich der Kontrollgruppe. Es zeigte sich sowohl im Vergleich der Genotypen als auch im Vergleich der Allelfrequenzen mit der Kontrollgruppe keine Assoziation des G-Allels mit einer zirkumskripten Sklerodermie.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt.

	CC	CG	GG	Σ	X^2	p	G-Frequenz	X^2	p
Kontrollgruppe	16 20%	24 53%	21 27%	79			42 53%		
Morphea (zirkumskripte Sklerodermie)	3 16%	12 63%	4 21%	19	0,62	0,83F	10 33,3%	0,05	0,83

Tabelle 11: Darstellung der Ergebnisse der Analyse des *IL-6* -174 G/C- Promotor-Polymorphismus bei Patienten mit zirkumskripter Sklerodermie im Vergleich mit der Kontrollgruppe gesunder Individuen. Es sind jeweils die absoluten und darunter die prozentualen Werte angegeben. Der X^2 -Wert und der p-Wert beziehen sich jeweils auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe. Auf Grund der geringen Fallzahl wurde zur Berechnung der exakte Test nach Fisher angewandt. Dies ist mit F hinter dem p-Wert gekennzeichnet.

5. Diskussion

1998 fanden Fishman et al. einen Einzelnukleotidpolymorphismus in der Promotorregion des Interleukin-6-Gens mit funktioneller Relevanz. Der Austausch Guanin gegen Cytosin in der -174 bp flankierenden Region des *IL-6*-Promotors führte zur verminderten IL-6-Sekretion in vivo und in vitro [16].

In der hier vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine Assoziation des G-Allels mit dem Krankheitsbild einer zirkumskripten Sklerodermie, einer systemischen Sklerodermie, einem Overlap-Syndrom oder einem Sharp-Syndrom besteht, oder ob die Guanin-Variante zu bestimmten Organmanifestationen dieser Systemerkrankungen, oder der Ausbildung von spezifischen Autoantikörpern prädisponiert.

5.1. Bedeutung des Interleukin-6 für die Ätiopathogenese der systemischen Sklerodermie

Die systemische Sklerodermie ist eine Autoimmunerkrankung mit Bildung von Autoantikörpern, einer vermehrten Fibroblastenaktivität und inflammatorischen Reaktionen im Gefäßsystem.

IL-6 spielt zum einen eine wichtige Rolle in der Differenzierung der B-Lymphozyten zur reifen Plasmazelle. Es konnte bei IL-6 transgenen Mäusen sogar ein vermehrtes Auftreten von Autoantikörpern beobachtet werden [83]. Die vermehrte Aktivität von B-Lymphozyten bei Patienten mit systemischer Sklerodermie mit Hypergammaglobulinämie und Autoantikörperbildung ist wiederum als ein Charakteristikum nachgewiesen [70]. Diese gesteigerte Aktivität führt wiederum zur Aktivierung von T-Lymphozyten, vermehrter Zytokinproduktion und erhöhter IL-6-Serumspiegel.

Alecu et al. beschrieben eine Assoziation von erhöhten IL-6-Serumspiegeln und der Krankheitsaktivität bei Patienten mit systemischer Sklerodermie [1]; ähnliche Ergebnisse wurden in der Arbeitsgruppe um Lis et al. beschrieben [50].

Mehrere Studien haben gezeigt, dass Interleukine eine zentrale Rolle bei der pathologisch gesteigerten Fibroblastenaktivität bei Patienten mit systemischer Sklerodermie spielen. IL-6 ist ein wichtiger Stimulator der Kollagensynthese und Fibroblastenaktivierung. In Fibroblasten von Patienten mit systemischer Sklerodermie besteht eine bis zu 30-fach gesteigerte IL-6-Synthese [14]. Kodono et al. demonstrierten dies durch in vitro-Versuchen an kultivierten Fibroblasten von Patienten mit systemischer Sklerodermie. Diese zeigten im Vergleich zu Fibroblasten von gesunden Probanden eine deutlich

gesteigerte IL-6- und IL-8-Produktion. Der Anstieg der Interleukinproduktion nach entsprechender Stimulation durch IL-1 β war jedoch in beiden Zellreihen gleich [38].

Darüber hinaus zeigten Fibroblasten von Patienten mit systemischer Sklerodermie eine dauerhafte Expression des IL-6-Gens, im Vergleich zu normalen Fibroblasten ($p=0,04$). Es wurde eine positive Korrelation zwischen der Kollagensynthese und der IL-6-Expression nachgewiesen [90]. Eine Hemmung des IL-6 in Fibroblastenkulturen von Erkrankten führte wiederum zu einer geringeren Konzentration an Prokollagen Typ I.

Sato et al. stellten 2001 eine positive Assoziation der IL-6 Serumspiegel zum Schweregrad der Hautsklerosierung, gemessen an der Hautdicke, fest. Zudem zeigten Patienten mit diffuser Sklerodermie höhere IL-6-Werte als Patienten mit der limitierten Form der Erkrankung [69]. Auf Grund seiner multiplen immunstimulatorischen Funktionen spielt IL-6 eine sehr wichtige Rolle in der Pathogenese der systemischen Sklerodermie.

5.2. Patientenkollektiv, Kontrollgruppe und Methodik

Betrachtet man das Patientenkollektiv mit insgesamt 112 Patienten davon 93 Patienten mit systemischer Sklerodermie, so liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 44,8 Jahren. Das Verhältnis weiblich:männlich in der Gruppe beträgt 6,5:1 und entspricht etwa dem in der Literatur angegebenen Verhältnis von 5:1 [44].

Auch die prozentualen Anteile der Haut und Organmanifestationen liegen für die Patienten mit systemischer Sklerodermie in dem Bereich der Literaturangaben. Hier ist nur eine Abweichung bei der Hautmanifestation von Teleangiektasien auffällig. Diese Erscheinung wurde bei überdurchschnittlich vielen Patienten ($N=13$; 81%) mit diffuser systemischer Sklerodermie beobachtet und bei einem geringeren Prozentsatz an Patienten ($N=39$, 45%) mit limitierter systemischer Sklerodermie. Die verhältnismäßig geringere Gelenk- und Muskelbeteiligung bei Patienten mit systemischer Sklerodermie von etwa 28% liegt vermutlich an der separaten Betrachtung der an einem Overlap-Syndrom oder einer MCTD Erkrankten in dieser Arbeit.

In der Gruppe der Patienten mit MCTD zeigt sich eine abweichend hohe Beteiligung innerer Organe, diese Beobachtung dürfte auf die geringe Fallzahl zurück zu führen sein, welche keine repräsentativen prozentualen Angaben möglich macht.

Die geringe Fallzahl in den klinischen Untergruppen mit 6 Patienten mit Overlap-Syndrom und nur 4 Patienten mit Sharp-Syndrom macht eine statistische Aussage unmöglich.

Die Kontrollgruppe bestand aus 79 gesunden kaukasischen Individuen ohne anamnestische oder klinische Hinweise auf einen chronisch-entzündlichen Krankheitsprozess. Vergleicht man die prozentualen Verteilungen der Allele mit Kontrollgruppen der gleichen ethnischen Zugehörigkeit aus anderen Studien, zeigt sich kaum eine Abweichung der Allelverteilung von 46% für das C-Allel und 53% für das G-Allel. So fanden Fishman et al. bei 383 Individuen aus Großbritannien eine Allelverteilung vom C-Allel mit 40,3% und vom G-Allel mit 59,7% [16]. Die zweite in Deutschland durchgeführte Studie von Schlüter et al. wies eine Allelverteilung bei 207 Kaukasern von 57% für das G-Allel und von 43% für das C-Allel auf [72]. Die hier zum Vergleich herangezogenen Kontrollgruppen, scheinen somit eine ähnliche Tendenz zum G-Allel der gesunden Bevölkerung in Mitteleuropa aufzuweisen, wie die in dieser Arbeit verwendete Kontrollgruppe. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.

	CC	GC	GG	G-Frequenz	Σ
Kontrollgruppe	16 20%	42 53%	21 27%	42 53%	79
Schlüter et al. 2002	42 20,3%	94 45,4%	71 34,3%	118 57%	207
Fishmann et al. 1998	70 18%	169 44%	144 38%	228,5 59,7%	383

Tabelle 12: Abbildung der Allelverteilung des *IL-6* -174 G/C Promotor-Polymorphismus bei den Kontrollgruppen aus 3 verschiedenen Studien. Es sind jeweils die absoluten und darunter die prozentualen (%) Werte angegeben.

In mehreren Untersuchungen wurde gezeigt, dass der Polymorphismus die *IL-6*-Transkription und somit die *IL-6*-Serumspiegel beeinflusst [16, 32].

Auf Grund der multiplen Einflussfaktoren und der Abhängigkeit der zum Zeitpunkt der Abnahme bestehenden Krankheitsaktivität und Therapie wurde in dieser Studie von der Bestimmung der systemischen *IL-6*-Spiegel bei unseren Patienten abgesehen.

Allerdings hatten Scala et al. untersucht, ob Zytokinkonzentrationen bei Patienten mit systemischer Sklerodermie mit Haut oder Organmanifestationen assoziiert sind und fanden bei allen Patienten mit systemischer Sklerodermie erhöhte *IL-6*-Konzentrationen im Serum. Es konnte hier des Weiteren eine Assoziation der *IL-6*-Spiegel mit dem Auftreten einer Lungenfibrose und dem Subtyp einer diffusen systemischen Sklerodermie gefunden werden [71]. Ähnliche Ergebnisse fanden Hasegawa et al. 1998, auch hier wiesen

insbesondere Patienten mit diffuser systemischer Sklerodermie mit frühem Beginn und Lungenfibrose erhöhte IL-6-Plasmaspiegel auf [26]. In der vorliegenden Arbeit zeigten die Patienten mit Lungenbeteiligung keine von der Normalverteilung abweichende Allelverteilung (siehe Tabelle 9). Der *IL-6*-174 G/C Promotor-Polymorphismus wurde in der Arbeit von Hasegawa et al. ebenfalls mit der Methode des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) bestimmt, unter Einsatz des Enzyms NlaIII.

5.3. Promotor-Polymorphismus des *IL-6*-Gens in Position -174 G/C bei Patienten mit zirkumskripten Sklerodermie und systemischer Sklerodermie, Overlap-Syndrom und Sharp-Syndrom

In dieser Studie wurde bei insgesamt 112 Patienten die Allelausprägung des *IL-6* -174 G/C Promotor-Polymorphismus untersucht. Bei den 19 Patienten mit zirkumskripten Sklerodermie ließ sich kein Unterschied der Allelverteilung im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen.

In dem Gesamtkollektiv der 93 Patienten mit systemischer Sklerodermie, bestehend aus Patienten mit diffuser systemischer Sklerodermie, limitierter systemischer Sklerodermie, Overlap-Syndrom und MCTD fand sich folgende Verteilung der Genotypen; 24 (25%) trugen den CC-Genotyp, 34 (37%) waren heterozygot und 35 (38%) waren Träger des GG-Genotyps. Im Vergleich mit der Genotypenverteilung der Kontrollgruppe erhielt man unter Anwendung des Unabhängigkeitstests ein $X^2=4,84$ und ein p-Wert von 0,089. Bei dem vorher festgelegten Signifikanzniveau von $<0,05$ besteht somit keine signifikante Assoziation des *IL-6* -174 G/C Promotor-Polymorphismus mit dem Auftreten der systemischen Sklerodermie. Eine Tendenz zur positiven Assoziation der Erkrankung zum Phänotyp des CC-Allels muss hier allerdings diskutiert werden. Betrachtet man jedoch die Allelfrequenz findet sich das G-Allel bei 52 Patienten (56%), welches wieder in etwa der angegebenen Normalverteilung entspricht.

Ein p-Wert knapp unterhalb des Signifikanzniveaus von 0,05 findet sich bei der Untersuchung der Patienten mit limitierter systemischer Sklerodermie. Hier waren 18 (27%) homozygot für CC, 22 (33%) heterozygot und 27 (40%) homozygot für GG, es errechnete sich ein p-Wert von 0,045. Somit ließe sich hier erstmals eine sehr schwache Assoziation der Genotypenverteilung des *IL-6* -174-G/C Promotor-Polymorphismus mit der limitierten systemischer Sklerodermie besprechen.

Im Vergleich der Allelfrequenz mit einer Häufigkeit des G-Allels von 38 (57%) lässt sich allerdings keine signifikante Assoziation darstellen.

Dieses Ergebnis ist zumindest teilweise übereinstimmend mit publizierten Daten aus anderen Sklerodermie-Kollektiven. Hasegawa et al. und Scala et al. wiesen erhöhte IL-6 Serumspiegel auf, allerdings insbesondere bei Patienten mit diffuser systemischer Sklerodermie [26, 71]. Auf Grund der nur sehr geringen Signifikanz unter Betrachtung der Genotypenverteilung und dem fehlenden Nachweis einer Assoziation mit der G-Allelfrequenz, ist es deutlich, dass hier die Aussage getroffen werden kann, dass der *IL-6* -174 G/C Promotor-Polymorphismus in der Pathogenese der limitierten systemischen Sklerodermie eine pathophysiologische Rolle spielen kann. Es werden derzeit große Anstrengungen unternommen, mittels Gene-array-Analysen, weitere Kandidaten-Gene der Pathogenese der systemischen Sklerodermie zu dechiffrieren [2, 31, 45, 49]. Somit kann der *IL-6*-174 G/C Promotor-Polymorphismus im Rahmen einer multifaktoriellen genetischen Pathogenese für beide Formen, limitierte und diffuse systemische Sklerodermie, als Ko-Faktor diskutiert werden.

Interessant sind die Ergebnisse der klinischen Untergruppe der Patienten mit Sharp-Syndrom. Von den 4 in dieser Studie erfassten Patienten trugen 2 (50%) den GG-Genotyp und 2 (50%) waren heterozygot. Auf Grund der geringen Fallzahl lässt sich keine statistische Aussage treffen, weitere Patienten müssten hierzu untersucht werden. In Korrelation dazu findet sich ebenso eine deutliche Tendenz zugunsten des G-Allels bei den 7 Patienten mit Nachweis von U1-RNP-AK, welche mit dem Auftreten der MCTD assoziiert sind. Hiervon trugen 5,5 (79%) das G-Allel.

Auf Grund der Seltenheit des Krankheitsbildes finden sich nur wenige Untersuchungen, jedoch fanden Stuart et al. bereits 1996 eine Assoziation von erhöhten IL-6-Serumspiegeln mit der Krankheitsaktivität von Patienten mit MCTD [82]. Des Weiteren zeigte Fujita et al. 2008 bei 2 Patienten mit aseptischer Meningitis im Rahmen einer MCTD erhöhte IL-6-Spiegel im Liquor und Nishimaki et al. konnten eine Assoziation von erhöhten IL-6-Spiegeln mit dem Auftreten einer pulmonal arteriellen Hypertonie bei Patienten mit Sharp-Syndrom aufzeigen [18,63]. Beide Studien liefern Hinweise auf die Bedeutung des IL-6 bei der Pathogenese der MCTD und somit wären größere Fallzahlen wünschenswert, um die Bedeutung des *IL-6* -174 G/C Promotor-Polymorphismus in der Pathogenese des Sharp-Syndroms weiter zu evaluieren.

Es fand sich in dieser Studie keine signifikante Assoziation des Einzelnukleotidpolymorphismus mit einem vermehrten Auftreten einer Organmanifestation.

Auch hier muss auf die zum Teil sehr geringen Fallzahlen der einzelnen Organmanifestationen hingewiesen werden, die derzeit keine aussagekräftigen Ergebnisse erlauben. Auch hier wäre ein größeres Patientenkollektiv wünschenswert. Betrachtet man die prozentualen Verteilungen, so fällt bei den 11 Patienten mit Nierenbeteiligung eine erhöhte Frequenz des G-Allels auf (N= 8; 73%). Eine Nierenschädigung bei Patienten mit systemischer Sklerodermie ist primär durch eine arterielle Hypertonie, sowie die Gefäßobliteration bedingt. Vorangegangenen Studien haben gezeigt, dass hohe IL-6-Spiegel mit einem erhöhten Blutdruck assoziiert sein können und einen unabhängigen Risikofaktor darstellen [11.67]. Auch hier wären weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen bei dieser Gruppe an Patienten mit systemischer Sklerodermie interessant.

Dieser Einzelnukleotidpolymorphismus der Promotorregion des IL-6-Gens wurde bereits 2006 durch Sfrent-Cornateanu et al. bei 20 Patienten mit systemischer Sklerodermie untersucht. Es war hier eine deutliche Assoziation der Krankheitsaktivität mit dem G-Allel ermittelt worden [75]. Das Ergebnis dieser Studie wurde allerdings durch eine Arbeit von Beretta et al. 2007 in Frage gestellt, in welcher diese Assoziation bei 196 Patienten nicht bestätigt werden konnte [6]. Beide Gruppen überprüften klinische Parameter, welche die Krankheitsaktivität widerspiegeln, wie den ESSSG (European Scleroderma Study Group activity score), den HAQ-DI (Health Assessment Questionnaire Disability Index) und Ergebnisse der Lungenfunktionsprüfung. Sicher sind diese Parameter sehr Abhängig von der aktuellen Therapie der Patienten und dem Krankheitsstadium der teils über Jahrzehnte verlaufenden chronischen Erkrankung. Des Weiteren wurde in der Arbeit von Sfrent-Cornateanu et al. nur ein sehr kleines Patientenkollektiv untersucht. Beide Aspekte könnten ausschlaggebend für die unterschiedlich ausfallenden Ergebnisse sein.

In dieser und auch vorangegangenen Studien konnte somit derzeit kein eindeutiges Ergebnis zu den klinischen Verlaufsformen erhoben werden, welches eindeutige Hinweise für die Bedeutung des *IL-6* -174 G/C Promotor-Polymorphismus in der Pathogenese der systemischen Sklerodermie bietet.

Dennoch ist eine gesteigerte IL-6-Aktivität bei systemischer Sklerodermie mehrfach belegt. Darüber hinaus sollten mögliche immunologische Ursachen hierfür diskutiert werden.

5.4. Abhängigkeit der gesteigerte Interleukin-6-Aktivität von anderen Interleukinen

Die Bedeutung des IL-6 in der Pathogenese ist der systemischen Sklerodermie ist, wie bereits dargelegt, unumstritten. Die nachgewiesene vermehrte Aktivität könnte jedoch auch durch, die IL-6-Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-1 oder IL-11 bedingt sein.

1999 fanden Kawaguchi et al., dass IL-1- α auf Fibroblasten von Patienten mit systemischer Sklerodermie persistierend exprimiert wird, dies ist bei Fibroblasten von Gesunden nicht der Fall. Durch ein Antioligonukleotid wurde hier in einer Kultur von erkrankten Fibroblasten die endogenen IL-1- α -Wirkung gehemmt, welches zu einem Abfall der IL-6- und PDGF-Konzentration führte. Umgekehrt wurde dem Medium ein Anti-IL-6-Antikörper zugefügt, der wiederum eine verminderte Produktion von Prokollagen Typ I bewirkte. In dieser Ex vivo-Studie wurde postuliert, dass die gesteigerte IL-6-vermittelte Fibroblastenstimulation bei Patienten mit systemischer Sklerodermie auch durch IL-1- α induziert sein kann [40].

Lindahl et al. untersuchten die Genexpression von pulmonalen Fibroblasten bei Patienten mit Sklerodermie und Lungenfibrose. Diese besonders aktiven Fibroblasten zeigten eine deutliche Supprimierung der Gene, welche durch Interferon stimuliert werden [49]. Diese Arbeit verdeutlicht, neben der Schlüsselrolle des TGF- β Wegs, die Komplexität der Regulation der Fibroblastenstimulation bei systemischer Sklerodermie.

Takemura et al. beobachteten, dass PDGF bei Fibroblasten von Patienten mit systemischer Sklerodermie, im Gegensatz zu Fibroblastenkulturen von Gesunden, zu einer deutlich gesteigerten IL-6-Konzentration führt. Es fand sich auf den Fibroblasten jedoch keine erhöhte Expression des PDGF-Rezeptors. Auch in dieser weiteren Ex vivo-Studie konnte die Abhängigkeit von IL-1 bestätigt werden. Nach Zufügen eines IL-1-Rezeptorantagonisten in das Medium kam es zu einem signifikanten Abfall der PDGF induzierten IL-6-Produktion [84]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Monozyten aus dem peripheren Blut von Patienten mit systemischer Sklerodermie nach Stimulation durch Kollagen Typ I vermehrt IL-6 produzieren. Bei gesunden Patienten führte diese Stimulation der Monozyten mit Kollagen nicht zur vermehrten IL-6-Sekretion [24]. Somit ist zur Klärung des pathophysiologischen Zusammenhangs vorzuschlagen die Donoren allel spezifisch auszuwählen und die Ex vivo-Stimulationsversuche mit genetisch typisierten homozygoten Patienten mit systemischer Sklerodermie zukünftig durchzuführen.

5.5. Zusammenspiel weiterer Polymorphismen

Es sollte zudem erwähnt werden, dass 2000 von Terry et al. noch weitere funktionelle Polymorphismen in der Promotorregion von *IL-6* entdeckt wurden. Diese Polymorphismen agieren nicht unabhängig, sondern bilden unterschiedliche Haplotypen, zusammen mit dem *IL-6* -174 G/C Promotor-Polymorphismus. Die vermehrte Expression des *IL-6* ist somit gegebenenfalls nicht nur von dem Einzelnukleotidaustausch an der Promotor-Position – 174 G/C, sondern vielmehr von weiteren Mutationen auf dem *IL-6*-Haplotypen zu dem er gehört, abhängig. Die Charakterisierung der DNA aus dieser Studie könnte somit zukünftig zur Klärung der Frage beitragen.

Darüber hinaus ist zu diskutieren, ob in der Pathogenese der systemischen Sklerodermie nicht auch weitere Polymorphismen oder Mutationen eine Rolle spielen und die vermehrte *IL-6*-Expression durch ein multifaktorielles Zusammenspiel bedingt ist. So beschrieben Beretta et al. mehrere Einzelnukleotidpolymorphismen im *IL-1*-Gen mit positiver Assoziation zur schweren restriktiven Lungenerkrankung bei Patienten mit systemischer Sklerodermie [4]. Wie bereits angeführt, ist *IL-1* ein entscheidender Stimulator der *IL-6*-Expression.

Auch andere Arbeitsgruppen untersuchten das *IL-1*-Gen. Kawaguchi et al. fanden eine Assoziation des alles Haplotyps C in Position -889 bp , T in Position +4729 bp und G in Position +4845 bp des *IL-1*-kodierenden DNA-Abschnittes mit der systemischen Sklerodermie [41]. Für das C-Allel in Position –889 bp konnte jedoch diese Assoziation in einer Analyse von Matuzzi et al. aus Italien [58] und Hutyrova et al. aus der Slowakei [34] nicht bestätigt werden. Es wird deutlich, dass insbesondere bei der Analyse nur eines Einzelnukleotidpolymorphismus in unterschiedlichen ethnischen Gruppen, unterschiedlich starke Assoziationen in der Phänotyp- und Genotyp-Verteilung auftreten können.

Weiterhin sind auch für die Analyse des *IL*-Genorts die relativ kleinen Fallzahlen zwischen 70 und 46 Patienten ein Faktor, der eine sichere statistische Aussage nicht möglich macht.

Unter Anbetracht der Ergebnisse insgesamt ist es eher wahrscheinlich, dass sich eine genetische Prädisposition für die systemische Sklerodermie aus mehreren Polymorphismen an immunologisch relevanten Genorten zusammensetzt. Im Sinne einer multifaktoriellen Vererbung könnten somit verschiedene proinflammatorisch wirkende Genpolymorphismen wie der *IL-6* und *IL-1* kostimulierend auf die immunregulatorischen Zusammenhänge wirken und die Ausprägung der auch anderweitig vordeterminierten Autoimmunerkrankung verstärken oder auslösen können.

Erst kürzlich veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Beretta et al. eine Studie, in der bei 242 Patienten mit systemischer Sklerodermie 13 Zytokine auf Einzelnukleotidpolymorphismen genotypisiert worden waren [5]. Unter Anderem wurden die kodierenden Gene von IL-11, IL-2, IL-6 und IL-10 untersucht. Allerdings fanden die Autoren für keinen der insgesamt 22 Einzelnukleotidpolymorphismen alleine eine Assoziation mit der systemischen Sklerodermie oder einer klinischen Untergruppe des Kollektivs.

Es wurde eine statistische Rechenmethode entwickelt, die ``multifactor Dimensionality Reduction method`` (MDR-Methode), mit welcher anhand einer speziellen Berechnung Gen-Gen-Interaktionen unabhängig voneinander untersucht werden können.

Durch diese Methode konnten Hinweise auf Interaktionen zwischen IL-2, IL-6 und IFN- γ , sowie zwischen dem IL-1-Rezeptor, IL-6 und IL-10 ermittelt werden. Im Vergleich mit einer Kontrollgruppe konnte gezeigt werden, dass diese Interaktionen der Einzelnukleotidpolymorphismus von Zytokin-Genen mit profibrotischer Wirkung zur Ausprägung klinischer Erscheinungen der systemischen Sklerodermie prädispositionieren [5].

Obwohl durch die Vielzahl der zum Teil sehr widersprüchlichen Ergebnisse zu den klinischen Subformen der systemischen Sklerodermie bisher keine sicher prädispositionierende genetische Konstellation gefunden werden konnte, haben die Untersuchungen zu einem breiteren Verständnis über die immunregulatorischen Faktoren in der Pathogenese der systemischen Sklerodermie geführt.

Mittels der Methode des DNA-Micorarrays, auch DNA-Chip-Technologie genannt, können heute rasch ganze Gengruppen analysiert werden. Es konnten so, nicht nur neue Kandidaten-Gene, sondern auch ganze Gen-Gruppen, sowie Regulationsmechanismen und Veränderungen der Gen-Expression im Zusammenhang beschrieben werden, die für die Pathogenese der Sklerodermie entscheidend sind [45]. Fang et al. zeigten, dass der Transkriptionsfaktor Egr-2 eine entscheidende Rolle bei der durch TGF- β induzierten Fibroblastenstimulation spielt und die Expression des Egr2 Gens in erkranktem Gewebe von Sklerodermie Patienten deutlich gesteigert ist [13, 61]. Lindahl et al. fanden in Fibroblasten von Sklerodermie Patienten eine Downregulation der durch Interferon stimulierten Gene [49]. Es ist zu hoffen, dass sich durch diese Ergebnisse neue therapeutische Ansatzpunkte, zum Beispiel für die individuelle Biologica-basierte Therapie der Zukunft bieten werden.

6. Zusammenfassung

Die systemische Sklerodermie ist eine Autoimmunerkrankung deren Pathogenese noch nicht vollständig verstanden ist. Man findet eine Aktivierung des Immunsystems mit vermehrter T-Zellaktivität und Bildung von Autoantikörpern durch reife Plasmazellen, sowie eine deutlich gesteigerte Fibroblastenaktivität mit vermehrter Kollagensynthese mit Fibrosierung der Haut und innerer Organe sowie Veränderungen im Gefäßsystem mit Obliteration der kleinen Gefäße.

IL-6 spielt zum einen durch Differenzierung der B-Lymphozyten zur reifen Plasmazelle mit resultierender Autoantikörperbildung aber insbesondere als entscheidender Stimulator der Kollagensynthese und Fibroblastenaktivierung eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der systemischen Sklerodermie. Es konnte eine gesteigerte IL-6-Synthese in Fibroblasten von Sklerodermie Patienten nachgewiesen werden. Darüber hinaus fand sich das *IL-6*-Gen bei Patienten mit systemischer Sklerodermie dauerhaft exprimiert.

1998 entdeckten Fishmann et al. einen Einzelnukleotidpolymorphismus in der upstream-flankierenden Region des Interleukin-6-Promotors. Die -174 Guanin-Variante führt - nachgewiesen und in mehreren Studien - zur vermehrten IL-6 Synthese.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Assoziation zwischen dem Auftreten der -174 Guanin Variante des *IL-6*-Promotor-Polymorphismus mit der systemischen Sklerodermie, oder einer der klinischen Unterformen, unterteilt in limitierte systemische Sklerodermie, diffuse systemische Sklerodermie, MCTD und Overlap-Syndrom besteht. Des Weiteren wurde geprüft, ob sich eine Assoziation mit einer Organmanifestation beziehungsweise einem spezifischen Autoantikörper nachweisen lässt. Darüber hinaus wurde die Häufigkeit des Polymorphismus bei Patienten mit zirkumskripter Sklerodermie analysiert.

Auf die Bestimmung der IL-6-Serumspiegel wurde verzichtet, da diese von der aktuellen Krankheitsaktivität abhängig sind. In voran gegangenen Studien waren erhöhte IL-6-Serumspiegel bei Patienten mit systemischer Sklerodermie gefunden worden, insbesondere bei Patienten mit diffuser Sklerodermie ließen sich erhöhte IL-6-Spiegel nachweisen.

Es wurden insgesamt 112 Patienten untersucht. Die Erfassung des Erkrankungsbildes und die Abnahme der Blutproben erfolgten im Rahmen der Sklerodermiesprechstunde der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität.

Von den 112 Patienten litten 67 an einer limitierten und 16 an einer diffusen Sklerodermie. 6 Patienten boten das Bild eines Overlap-Syndroms und 4 Patienten erfüllten die Kriterien

einer MCTD. Das Verhältnis weiblich: männlich betrug 5,6:1. Es wurden 19 Patienten mit zirkumskripter Sklerodermie eingeschlossen.

In allen klinischen Untergruppen der 93 Patienten mit Systemerkrankung fand sich das Raynaud-Syndrom bei 91 Patienten (97%) als häufigste Manifestation der Haut. Die Beteiligung des oberen Gastrointestinaltraktes bei 73 Patienten (78,5%) stellte die häufigste Organmanifestation dar. Die Patienten mit diffuser systemischer Sklerodermie wiesen die höchste Beteiligung innerer Organe auf.

Bezüglich der Autoantikörperverteilung fand sich, wie erwartet, der Scl-70-Antikörper primär bei Patienten mit diffuser systemischer Sklerodermie (62%), CNP-Antikörper hingegen bei der limitierten systemischen Sklerodermie (31%). Als sehr spezifischer Antikörper war Anti-PM-Scl bei 100% der Patienten mit Polymyositis Scleroderma-Overlap-Syndrom nachweisbar und U1-RNP bei 75% der Patienten mit MCTD.

Die Kontrollgruppe bestand aus 79 kaukasischen Individuen. Die Allelverteilung des IL-6-G/C- Promotor-Polymorphismus war vergleichbar mit den Kontrollgruppen aus anderen Studien des mitteleuropäischen Raumes.

Von den 93 Patienten mit Systemerkrankung bestehend aus Patienten mit diffuser und limitierter systemischer Sklerodermie, MCTD und Overlap-Syndrom ließ sich bei einem p-Wert von 0,089 bei einem festgelegten Signifikanzniveau von $< 0,05$, im Vergleich mit der Kontrollgruppe, keine Assoziation mit dem G-Allel nachweisen. Die Genotypenverteilung der 19 Patienten mit zirkumskripter Sklerodermie entsprach etwa der der Kontrollgruppe.

Bei der Untergruppe der Patienten mit limitierter systemischer Sklerodermie errechnete sich für die Genotypenverteilung ein p-Wert von 0,045. Hier waren 27 (20%) homozygot für GG und 22 (33%) heterozygot. Hier lässt sich eine Assoziation zu dem Highresponder-Allel, der Guanin-Variante erkennen. Diese statistische Signifikanz bestätigte sich nicht, wenn man die Allelfrequenz betrachtet.

In der Untersuchung der Patienten mit Overlap-Syndrom und MCTD lässt sich auf Grund der geringen Fallzahlen keine signifikante Aussage treffen. In beiden Gruppen ist allerdings eine Tendenz zugunsten des G-Allels auffällig. Vorangegangene Untersuchungen liefern Hinweise, dass auch hier IL-6 eine pathogenetische Bedeutung hat. Die geringe Prävalenz der klinischen Erscheinungsbilder machen aussagekräftige Studien mit adäquater Fallzahl kaum möglich.

Bezüglich der Organmanifestationen findet sich bei den 11 Patienten mit Nierenbeteiligung eine erhöhte Frequenz des G-Allels (73%). Die ist insbesondere vor dem Aspekt interessant, dass der renale Schaden bei Sklerodermie Patienten primär Hypertonie bedingt

ist und erhöhte IL-6-Spiegel mit erhöhtem Blutdruck korrelieren. Auch hier wären Untersuchungen an Kollektiven mit größeren Fallzahlen interessant zu untersuchen. Zusammenfassend ist zu sagen, dass von dieser, wie auch den vorangegangenen publizierten Studien bei Patienten mit systemischer Sklerodermie, derzeit keine eindeutige Aussage über die pathogenetische Bedeutung des Promotor-Polymorphismus des *IL-6*-Gens in Position -174 G/C bei Patienten getroffen werden kann. Die Bedeutung weiterer Zytokine wie IL-1 α , oder das Zusammenspiel anderer genetischer Polymorphismen könnte, anhand multivarianter Analysen, verdeutlicht werden. Es obliegt zukünftigen Arbeiten an größeren Kollektiven, die an der Grenze zum Signifikanzniveau gefundenen Assoziationen des G-Allels mit limitierter systemischer Sklerodermie, Nierenbeteiligung, und auch zum Sharp-Syndrom, zu untersuchen.

7. Literaturverzeichnis

1. Alecu M, Geleriu L, Coman G, Galatescu L. The interleukin-1, interleukin-2, interleukin-6 and tumour necrosis factor alpha serological levels in localised and systemic sclerosis. *Rom J Intern Med* 1998;36:251-9
2. Avouac J, Cagnard N, Distler JH. Insights into the pathogenesis of systemic sclerosis based on the gene expression profile of progenitor-derived endothelial cells. *Arthritis Rheum* 2011;63:3552-62
3. Basso F, Lowe GD, Rumley A, McMahon AD, Humphries SE. Interleukin-6-174 G>C Polymorphism and risk of coronary heart disease in west of scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:599-604
4. Beretta L, Bertolli F, Cappiello F, Barili M, Masciocchi M, Toussoun K, Caronni M, Scorza R. Interleukin-1 gene complex polymorphisms in systemic sclerosis patients with severe restrictive lung physiology. *Hum Immunol* 2007;68:603-9
5. Beretta L, Cappiello F, Moore JH, Barili M, Green CS, Scorza R. Ability of epistatic interactions of cytokine single-nucleotide polymorphisms to predict susceptibility to disease subsets in systemic sclerosis patients. 2008;15;59:974-83
6. Beretta L, Santaniello A, Cappiello F, Barili M, Scorza R. No evidence for role of the proximal IL-6 G/C-174 single nucleotide polymorphism in Italian patients with systemic sclerosis. *J Cell Mol.* 2007;896-9
7. Bernstein RM, Steigerwand JC, Tam EM. Association of antinuclear and antinucleolar antibodies in progressive systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1982;48:43-51
8. Bonèl H, Messer G, MRI of fingers in systemic scleroderma. Initial results with contrast-enhanced studies using a dedicated MRI system. *Radiologe.* 1997;37:794-801
9. Bordon A. The binding of some human antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 1998;101:2029-35
10. Byers RJ, Marshall DA, Freemont AJ. Pericardial involvement in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1997;56:393-4
11. Chae CU, Lee RT, Rifai N, and Ridker PM. Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension* 2001;38:399-403
12. Duncan MR, Berman B. Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6. *J. Invest Dermatol* 1991;97:686-692
13. Fang F, Ooka K. The early growth response gene *Egr2* is a novel transcriptional target of transforming growth factor- β is up-regulated in systemic sclerosis and mediates profibrotic response. *Am J Pathol.* 2011;178:2077-90

14. Feghali CA, Bost KL, Boulware DW, Levy LS. Mechanisms of pathogenesis in scleroderma. I. Overproduction of interleukin 6 by fibroblasts cultured from affected skin sites of patients with scleroderma. *J Rheumatol* 1992;19:1207-11
15. Ferrari SL, Ahn-Luong L, Garnero P, Humphries S E, Greenspan SL. Two promoter polymorphisms regulating interleukin-6 gene expression are associated with circulating levels of C-reactive protein and markers of bone resorption in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.*2003;88:255-9
16. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The Effect of Novel Polymorphisms in the Interleukin-6 (IL-6) Gene on IL-6 Transcription and Plasma IL-6 Levels, and an Association with Systemic-Onset Juvenile Chronic Arthritis. *J Clin Invest* 1998;1369-1376
17. Fritzler MJ. Autoantibodies in scleroderma. *J Dermatol* 1993;20:257-68
18. Fujita Y, Fujii T, Nakashima R, Tanokara M, Minori T. Aseptic meningitis in mixed connective tissue disease: cytokine and anti-U1RNP antibodies in cerebrospinal fluids from two different cases. *Mod Rheumatol* 2008;18;184-8
19. Gabay C, Silacci P, Genin B, Mentha G, Le Coultre C, Guerne PA. Soluble interleukin-6 receptor strongly increases the production of acute-phase protein by hepatoma cells but exerts minimal changes on human primary hepatocytes. *Eur J Immunol* 1995;25:2378-83
20. Granel B, Chevillard C, Dessein A. Genetic factors predisposing to fibrosis in systemic sclerosis. *Rev Med Intern* 2005;26:294-303
21. Granel B, Bernard F, Chevillard CH. Genetic susceptibility to systemic sclerosis; from clinical aspect to genetic factor analyses. *Eur J Internal Med* 2009; 20:242-52
22. Guerne PA, Carson DA, Lotz M. IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro. *J Immunol* 1990;144:499-505
23. Guerne PA, Trekeltaub R. Inflammatory microcrystals stimulate interleukin-6 production and secretion by human monocytes and synoviocytes. *Arthritis Rheum* 1989;32:1443-52
24. Gurram Pahwa S, Frieri M. Augmented interleukin-6 secretion in collagen-stimulated peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *Ann Allergy* 1994;73:493-6
25. Harrison ML, Rosen A. Autoimmunity in scleroderma: the origin, pathogenetic role, and clinical significance of autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:778-84
26. Hasegawa M, Sato S, Fujimoto M, Ihn H, Kikuchi K, Takehara K. Serum levels of interleukin 6 (IL-6), oncostatin M, soluble IL-6 receptor, and soluble gp130 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1998;25:308-13
27. Heinrich PC. Principles of interleukin (IL)-6-type signalling and its regulation. *Biochem J* 2003;374:1-20

28. Herouy Y, Vanscheidt W, Schopf E, Norgauer J. Gene and protein family of matrix metalloproteinases. Structure, function and expression in the skin. *Hautarzt* 1999;50:825-36
29. Highland KB, Garin MC, Brown KK. The spectrum of scleroderma lung disease. *Semin Respir Crit Care Med* 2007;28:418-29
30. Holzmann H, Sollberg S, Schütz K, Kühnl P. Sklerodermie und HLA-Antigene. *Hautarzt* 1989; 40:134-40
31. Hsu E, Shi H, Jordan RM. Lung tissue in patients with systemic sclerosis has gene expression patterns unique to pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension. *Arthritis Rheum* 2011;63:783-94
32. Hulkkonen J, Pertovaara M, Antonen J, Pasternack A, Hurme M. Elevated interleukin-6-plasma levels are regulated by the promotor region polymorphism of the IL-6 gene in primary Sjörgeń's Syndrome and correlate with the clinical manifestation of the disease. *Rheum* 2001;40:656-61
33. Hunzelmann N, Genth E, Krieg T. The registry of the German Network for Systemic Scleroderma: frequency of disease subsets and patterns of organ involvement. *Rheumatology (Oxford)*. 2008; 47: 1185–1192
34. Hutyrova B, Lukac J, Bosak V, Buc M, du Bois R, Petrek M. Interleukin-1 alpha single-nucleotid polymorphism associated with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2004;31:81-4
35. Ishikawa O, LeRoy EC. Mitogenic effects of transforming growth factor β 1 on human fibroblasts involves the induction of plated-derived growth factor alpha receptors. *J Z Cell Physiol* 1990;145:181-6
36. Janosik DL, Osborn TG, Moore TL. Heart disease in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 1989;19:1913602
37. Jones SA. C-reactive Protein : A Physiological Activator of Interleukin-6 Receptor Shedding, *J Exp Med* 1999;189:599-604
38. Kadono T, Kikuchi K, Ihn H, Takehara K, Tamaki K. Increased production of interleukin 6 and interleukin 8 in scleroderma fibroblasts. *J Rheumatol*. 1998; 25: 296-301
39. Kahaleh MB. Vascular disease in scleroderma. Endothelial-T lymphocyte-fibroblast interactions. *Rheum Dis Clin North Am* 1990;16:53-73
40. Kawaguchi Y, Hara M, Wright TM. Endogenous IL-1 α from systemic sclerosis fibroblasts induces IL-6 and PDGF-A. *J Clin Invest* 1999;103:1253-60
41. Kawaguchi Y, Hara M, Kamatani N, Wright TM. Identification of an IL-1-alpha gene segment that determines aberrant constitutive expression of interleukin-1 alpha in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2003;48:193-202

42. Kleinert S, Tony HP, Kneitz C. Systemische Sklerose. *Internist* 2006;47:1051-1062
43. Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 1994;368:339-42
44. Krieg Th, Braun-Falco O, Meurer M, Hein R, von Gizycki-Nienhaus B. Die systemische Sklerodermie. *Dt Ärztebl* 1992;89:201-06
45. Kunz M. DNA microarray technology in dermatology. *Semin Cutan Med Surg* 2008;27:16-24
46. Launay D, Mouthon L, Hachulla E, Pagnoux C, deGroot P, Remy-Jardin M, et al. Prevalence and characteristics of moderate to severe pulmonary hypertension in systemic sclerosis with and without interstitial lung disease. *J Rheumatol* 2007;34:1005-10
47. Laxer RM, Zulian F. Localized scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18:606-613
48. LeRoy E C, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger T A Jr, Rowell N, Wollheim F. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*.1988;15:202-5
49. Lindahl GE, Stock CJ, Shi-Wen X. Microarray profiling reveals suppressed interferon stimulated gene program in fibroblasts from scleroderma-associated interstitial lung disease. *Respir Res* 2013;14:80
50. Lis A, Brzezinska-Wcislo L. Interleukin-2 and interleukin-6 in serum as markers of disease progression in systemic sclerosis, *Pol Merkuriusz Lek*. 2001;11:206-9
51. Lu KC, Jaramillo A, Lecha R L, Schuessler RB, Aloush A, Trulock EP, Mendeloff, EN, Huddleston CB, Alexander Patterson G, Mohanakumar T. Interleukin-6 and interferon-gamma gene polymorphisms in the development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplantation*. 2002;74:1297-302
52. Maricq HR, LeRoy EC, D'angelo WE. Diagnostic potential of in vivo capillary microscopy in scleroderma and related disorders. *Arthritis Rheum* 1980;23:183-189
53. Marie I. Gastrointestinal involvement in systemic sclerosis. *Presse Med* 2006;35:1952-65
54. Marsch W Ch, Mayet A, Holzmann H. Disposition und Exposition bei Sklerodermie. *Akt Dermatol* 1994;20:251-6
55. Masi AT, Rodnan GP, Medsger T. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 1980;23:581-590
56. Mastorakos G, Chrousos GP, Weber JS. Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1690-4.

57. Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl. Acad Sci USA* 1993;90:10193-7
58. Mattuzzi S, Barbio S, Carletto A, Ravagnani V, Moore OS, Bambara LM, et al. Association in polymorphism in the IL-1-B and IL-2 genes with susceptibility and severity of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2007;34:997-1004
59. Messer G, Diagnostik bei Autoimmunerkrankungen, in Plewig G, Degitz K, AHeidelberg 2001;17;94-109
60. Mehra S, Walker J, Patterson K. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.*2013;12:340-54
61. Milano A, Pendergrass SA, Sargent JL. Molecular subsets in the gene expression signatures of scleroderma skin. *PLoS One* 2008;3:2696
62. Moroi J, Lawless C, Black C. Autoantibody to centromer (Kinetochore) in scleroderma sera. *Proc Natl Acad Sci USA*1980;77:1627-31
63. Nishimaki T, Aoutsuka S, Kondo H, Yamamoto K, Takasaki Y, Sumiya M, Yokohari R. Immunological analysis of pulmonary hypertension in connective tissue diseases. *J. Rheumatol* 1999;26:2357-62
64. Odani T, Yasuda S, Ota Y. Up-regulated expression of HLA-DRB5 transcripts and high frequency of the HLA-DRB5*01:05 allele in scleroderma patients with interstitial lung disease. *Rheumatology* 2012;51:1765-74
65. Ray A, Tatter SB, May LT, Sehgal PB. Activation of the human β 2-interferon/hepatocyte-stimulatin factor/interleukin 6 promoter by cytokines, viruses, and second messenger agonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:6701-5
66. Ray A, Sassone Corsi P, Sehgal PB. A multiple cytokine-and second messenger-responsive element in the enhancer of the human interleukin-6 gene: similarities with c-fos gene regulation. *Mol Cell Biol.*1989;9:5537-47
67. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, and Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000;101:1767-1772
68. Rock CS, Coyle SM, Keogh CV, Lazarus DD, Hawes AS, Leskiw M. Influence of hypercortisolemia on the acute-phase protein response to endotoxin in humans. *Surgery* 1992;112:467-74
69. Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci* 2001;27:140-6
70. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naïve B-cells and diminished by activated B-cells. *Arthritis Rheum* 2003;48:2605-14

71. Scala E, Pallotta S, Trezzolini A, Aberi D, Barbieri C, Sampogna F, De Pita O, Puddu P, Paganolli R, Russo G. Cytokine and chemokine levels in systemic sclerosis: relationship with cutaneous and internal organ involvement. *Clin Exp Immunol* 2004;138:540-6
72. Schlüter B, Raufhake C, Erren M, Schotte H, Kipp F, Rust S, Van Aken H, Assman G, Berends E. Effect of the interleukin-6-promotor polymorphism (-174 G/C) on the incidence and outcome of sepsis. *Crit Care Med* 2002;30:32-7
73. Schotte H, Schlüter B, Rust S, Assmann G, Domschke W, Gaubitz M. Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) in Caucasian German patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology-(Oxford)* 2001;40:393-400
74. Sehgal VN et al.. Localized scleroderma/morphea. *Int J Dermatol* 2002; 41:467-475
75. Sfrent-Cornateanu R, Mihai C, Balan S, Ionescu R, Moldoveanu E. The Il-6-Promotor polymorphism is associated with disease activity and disability in systemic sclerosis. *J Cell Mol Med* 2007;11:896-8
76. Shand L, Lunt M, Nihtyana S et al. Relationship between change in skin score and disease outcome in diffuse cutaneous systemic sclerosis: application of a latent linear trajectory mode. *Arthritis Rheum* 2007; 56:2422-31
77. Skert C et al.. Sclerodermatous chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: incidence, predictors and outcome. *Haematologica*. 2006;91:258-61
78. Sollberg S, Krieg T. Systemische Sklerodermie. *Hautarzt* 1995;46:587-601
79. Sontheimer RD, Kovalchick P. Cutaneous manifestation of rheumatic disease: lupus erythematosus, dermatomyositis, scleroderma. *Dermatol Nurs* 1998;10:81-95
80. Springer T A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425-34
81. Steen V. The heart in systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rep* 2004;6:137-40
82. Steen V, Medsger TA Jr. The palpable tendon friction rub. An important physical examination finding in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1997;40:1146-51
83. Suematsu S, Matsuda T, Aozasa K. IgG1 plasmocytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7547-51
84. Takemura H, Suzuki H, Fujisawa H, Yukara T, Akama T, Yamane K, Kashiwagi H. Enhanced interleukin 6 production by cultured fibroblasts by cultured from patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1998;25:1534-9
85. Traub YM, Shapiro AP, Rodnan GP. Hypertension and renal failure (scleroderma renal crisis) in progressive systemic sclerosis. Review of a 25-year experience with 68 cases. *Medicine (Baltimore)* 1983;62:335-352

86. Tsigos C, Papanicolaou DA, Defensor R, Mitsiadis CS, Kyrou I, Chrousos GP. Dose-effects of recombinant human interleukin-6 on pituitary hormone secretion and energy expenditure. *Neuroendocrinology* 1997;66:54-62
87. Wiedermann CJ, Reinisch N, Fischer Colbrie R, Vollmar AM, Herold M, Knapp E. Proinflammatory cytokines in cardiac myxomas. *J Intern Med* 1992;232:263-5
88. Woodroof C, Muller W, Ruther U. Long-term consequences of interleukin-6 overexpression in transgenic mice. *DNA Cell Biol* 1992;11:587-92
89. Zulian F. New developments in localized scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 2008;20:601-607
90. Zurita-Salinas CS, Richaud-Patin Y, Krotzsch-Gomez E, Llorente L, Alcocer-Varela J, Diaz-de-Leon L, Palacios-Boix A. Spontaneous cytokine gene expression by cultured skin fibroblasts of systemic sclerosis. Correlation with collagen synthesis. *Rev Invest Clin* 1998;50:97-104

8. Anhang

1. Kennnummer _____

2. Name _____

3. Vorname _____

4. Geburtsdatum _____

5. Scl.Typ 1 Akrosklerod. 2 diffuse Sklerod. 3 DM/PM 4 Mischformen (z.B. MCTD-Sharp) 5 PM-Scl pos.

6. Krankheitsbeginn _____

7. Raynaud 1 ja 2 nein 3 fragl.

8. Sicca-Syndrom 1 ja 2 nein 3 fragl.

9. Teleangiektasien 1 ja 2 nein 3 fragl.

10. Slerodaktylie 1 ja 2 nein 3 fragl.

11. Fingerulzerationen 1 ja 2 nein 3 fragl.

12. Oesophagusbeteiligung 1 ja 2 nein 3 fragl.

13. Entleerungsstörungen 1 ja 2 nein 3 fragl.

14. Reflux 1 ja 2 nein 3 fragl.

15. Lungenbeteiligung 1 ja 2 nein 3 fragl.

16. Lungenfibrose 1 ja 2 nein 3 fragl.

17. Diffusionsstörung 1 ja 2 nein 3 fragl.

18. Ventilationsstg. 1 ja 2 nein 3 fragl.

19. Herzbeteiligung 1 ja 2 nein 3 fragl.

20. Ekg pathologisch 1 ja 2 nein 3 fragl.

21. Echo pathologisch 1 ja 2 nein 3 fragl.
- 22. Nierenbeteiligung** 1 ja 2 nein 3 fragl.
23. Proteinurie 1 ja 2 nein 3 fragl.
24. Funktionsstörg. 1 ja 2 nein 3 fragl.
25. Hypertonie 1 ja 2 nein 3 fragl
- 26. Gelenkbeteiligung** 1 ja 2 nein 3 fragl
30. entzdl.Gelenkbeteiligung 1 ja 2 nein 3 fragl
31. Kalzinose 1 ja 2 nein 3 fragl
32. Myositis 1 ja 2 nein 3 fragl
- 33.Magenbtlg. 1 ja 2 nein 3 fragl
34. Geschlecht 1 männlich 2 weiblich
34. ANA-Titer _____
35. ANA-Muster 1 homogen
 2 membranös
 3 grob gefleckt
 4 fein gefleckt
 5.0. nucleol.
 5.1. nucl.-homogen
 5.2. nucl.-clumpy
 5.3. nucl.-speckled
 5.4. nucl.-dots
 7. Zentromer
 8. cytoplasmat.
 9. Spindel
 10. andere
36. Scl-70 AK 1 ja 2 nein
37. Ro-AK 1 ja 2 nein

38. La-Ak 1 ja 2 nein
39. U1-RNP AK 1 ja 2 nein
40. PM-Scl AK 1 ja 2 nein
41. ENA-Test (gemacht) 1 ja-negativ 2 nein
42. Rheumafaktor 1 positiv 2 negativ 3 schwach positiv
43. ds-DNS AK 1 ja 2 nein
44. Nukleolen 1 positiv 2 negativ
45. Chromosomen 1 positiv 2 negativ
46. Il-2 im Serum _____
47. s CD 14 _____
48. TNF b 1 1 2 2 3 1+2
49. DRA _____
50. Il-1 RA _____
51. TNF- α _____
52. Il-6 Poly _____

10. Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. Ruzicka, Direktor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, danke ich für die Möglichkeit meine Dissertation anfertigen zu dürfen.

Meinem Doktorvater Privatdozent Dr. med. Gerald Messer möchte ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung meiner Arbeit danken.

Mein bester Dank gilt Frau Dr. Karin Partscht für die Einarbeitung in die Methodik der Experimente und labortechnischen Verfahren.

Ebenso Danke ich dem gesamten Team des Labors für Immunregulation der Experimente.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Paul Schmidt für die kompetente Hilfestellung bei der statistischen Auswertung.

Bei Frau Heike Rabel bedanke ich mich für die Unterstützung bei Computerfragen.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich sehr für die motivierende Unterstützung.

Eidesstattliche Versicherung

Rembold Vanessa

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*Immungenetische Untersuchung zur Assoziation des Promotor-Polymorphismus
des Interleukin -6-Gens in Position -174 G/C bei Patienten mit systemischer
Sklerodermie*

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München,

Vanessa Rembold