

Aus der Abteilung Klinische Immunologie
der Medizinischen Hochschule Hannover

**Assoziation von MICB-Allelen mit dem
Systemischen Lupus Erythematodes**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
in der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von Mona Holdack-Janssen
aus Hannover

Hannover 2007

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover am 28.08.2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. Dieter Bitter-Suermann
Betreuer: PD Dr. med. Torsten Witte
Referent: Prof. `in Dr. med. Miriam Wittmann
Korreferent: PD Dr. med. Kirsten de Groot

Tag der mündlichen Prüfung: 28.08.2008

Promotionsausschussmitglieder:

Prof. Dr. Tobias Welte
Prof. Dr. Carlos Guzman
PD Dr. Frank Gossé

1. Inhaltsverzeichnis

1. INHALTSVERZEICHNIS	1
2. EINLEITUNG.....	2
2.1 SYSTEMISCHER LUPUS ERYTHEMATODES (SLE).....	2
2.1.1 Überblick.....	2
2.1.2 Epidemiologie	4
2.1.3 Pathogenese	4
2.1.4 Ätiologie.....	6
2.2 MIC-B	13
2.2.1 Überblick.....	13
2.2.2 HLA-Komplex.....	14
2.2.3 MIC-Gene in der HLA Klasse I Region.....	16
2.2.4 Funktion und klinische Relevanz von MICA und MICB.....	20
2.3 FRAGESTELLUNG	22
3. MATERIAL UND METHODEN	23
3.1 GERÄTE	23
3.2 SOFTWARE.....	23
3.3 ARBEITSMATERIAL.....	23
3.4 CHEMIKALIEN UND ENZYME	24
3.5 OLIGONUKLEOTIDE	25
3.6 PROBENGEWINNUNG	25
3.7 DNA-ISOLIERUNG	27
3.8 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	27
3.8.1 Prinzip.....	27
3.8.2 Durchführung.....	30
3.9 DNA-GELELEKTROPHORESE.....	31
3.9.1 Prinzip.....	31
3.9.2 Durchführung.....	31
3.10 STATISTISCHE ANALYSEN	32
4. ERGEBNISSE.....	33
4.1 MICB0103 UND SLE.....	35
4.2 MICB0104 UND SLE.....	38
4.4 MICB0105 UND SLE.....	41
4.3 HAPLOTYPENBESTIMMUNG	44
5. DISKUSSION	46
6. ZUSAMMENFASSUNG	54
7. SCHRIFTENVERZEICHNIS	56
7.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	56
7.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	58
7.3 TABELLENVERZEICHNIS	58
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	60
9. LEBENS LAUF.....	79
10. DANKSAGUNG	81
11. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	82

2. Einleitung

2.1 Systemischer Lupus Erythematoses (SLE)

2.1.1 Überblick

Der systemische Lupus erythematoses ist eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung und lässt sich den klassischen Kollagenosen zuordnen. Der SLE wird durch typische klinische Manifestationen und Auftreten von Antikörpern, die gegen ein oder mehrere Zellkernbestandteile gerichtet sind, bestimmt. Antinukleäre Antikörper (ANA) treten bei 99 % der Patienten auf, sind aber nicht direkt an der Krankheitsentstehung beteiligt. Zusätzlich bilden SLE-Patienten häufig weitere Antikörper gegen Zellmembranen oder Serumbestandteile [1].

Polyarthritiden und Erytheme sind, mit einer Prävalenz von 90% bei Patienten mit SLE, die am häufigsten auftretenden klinischen Manifestationen [2]. Erytheme finden sich bevorzugt als Schmetterlingserythem im Gesichtsbereich und als diskoides Erythem im Kopf-, Arm-, und Stammbereich. Die Arthritis betrifft meist die kleinen Gelenke. Einhergehend mit Angstzuständen, chronischer Müdigkeit, kognitiven Störungen und Depression gehören Arthritis und Erythem zu den Frühsymptomen des SLE [3]. Schwerwiegende Komplikationen, wie eine Glomerulonephritis, schwere neurologische Symptome, eine Entzündung des Herzens oder eine Lungenbeteiligung, treten meist erst im späteren Verlauf der Erkrankung auf [4]. Zur Klassifikation des SLE entwickelte das American College of Rheumatology (ACR) 1982 elf Kriterien. Danach gilt die Diagnose SLE als gesichert, sofern mindestens vier der elf Kriterien erfüllt sind (Tabelle 2.1) [5, 6].

Die Prognose des SLE hat sich in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert. Aufgrund effizienter Therapiemaßnahmen ist die 10-Jahres Überlebensrate von unter 50% auf mittlerweile 90- 96,6% gestiegen [7, 8]. So war die Mortalität von SLE-Patienten Ende der 1970er Jahre noch 10,1-mal so hoch wie in der Normalbevölkerung und ist inzwischen auf das 2,7- fache gesunken. Zu den häufigsten Todesursachen der SLE-Patienten zählen kardiovaskuläre Komplikationen (26,5-37%), aktiver SLE-Schub (26,5%) und Infektionskrankheiten (25-33%), wobei die Infektionen meist als Folge der immunsuppressiven Therapie auftreten [7, 9-11].

Tabelle 2.1: Klassifikationskriterien der SLE-Erkrankung des American College of Rheumatology von 1982, aktualisiert 1997 [5, 6]

Kriterium	Definition
1. Schmetterlingserythem	Flaches oder erhabenes Erythem beider Wangen, die Nasolabialfalten aussparend
2. Diskoides Erythem	Erythematöse erhabene Flecken mit keratotischer Schuppung und atrophischen Narben
3. Photosensibilität	Hautrötung infolge ungewöhnlicher Reaktionen auf Sonnenlicht (anamnestisch oder beobachtet)
4. Schleimhautulzerationen	Orale oder nasopharyngeale Ulzerationen, gewöhnlich schmerzlos (ärztlich beobachtet)
5. Arthritis	Nichterosive Arthritis von zwei oder mehr Gelenken, gekennzeichnet durch Schmerzen, Schwellung oder Erguss
6. Serositis	a) Pleuritis <i>oder</i> b) Perikarditis
7. Nierenerkrankung	a) Persistierende Proteinurie über 0,5g/d oder mehr als 3+falls nicht quantifiziert <i>oder</i> b) Zylindrurie (Erythrozyten, Hämoglobin)
8. Neurologische Befunde	a) Krampfanfälle - nicht medikamentös oder metabolisch bedingt <i>oder</i> b) Psychosen - nicht medikamentös oder metabolisch bedingt
9. Hämatologische Befunde	a) Hämolytische Anämie <i>oder</i> b) Leukozytopenie <4,000/ μ l <i>oder</i> c) Lymphozytopenie <1,500/ μ l <i>oder</i> d) Thrombozytopenie <100,000/ μ l

Tabelle 2.1(Forts.): Klassifikationskriterien der SLE-Erkrankung des American College of Rheumatology von 1982, aktualisiert 1997 [5, 6]

Kriterium	Definition
10. Immunologische Befunde	a) Anti-DNA: Anti-dsDNA-Antikörper oder b) Anti-Sm: Anti-Sm-Antikörper oder c) Anti-Phospholipid-Antikörper
11. Antinukleäre Antikörper	Erhöhter Titer nicht medikamentöser Genese

2.1.2 Epidemiologie

Die jährliche Inzidenz des SLE liegt bei 2,4 bis 4,6 [12-16], mit einer Prävalenz von 24,6 bis 27,7 pro 100.000 Einwohner [14, 15, 17]. Frauen sind mit einer Inzidenz von 5,4 bis 7,0 [13, 15] und einer Prävalenz von 45,9 bis 49,6 pro 100.000 Einwohner [14, 15] sechsmal häufiger betroffen als Männer [12]. Der Altersgipfel liegt durchschnittlich bei 40-64 Jahren, bei Frauen jedoch etwas niedriger mit 40-49 Jahren [13-15]. Ältere Studien nennen ebenfalls einen Altersgipfel für Frauen bei 15- 24 Jahren [12].

Darüber hinaus zeigen sich deutliche Variabilitäten zwischen den verschiedenen ethnischen Bevölkerungsgruppen. Afroamerikanisch- und asiatischstämmige Menschen sind auffällig häufiger betroffen als kaukasischstämmige Menschen [12, 14-17]. Die Prävalenz für afroamerikanischstämmige Menschen ist fünfmal häufiger als die Prävalenz für kaukasischstämmige Menschen [15].

2.1.3 Pathogenese

Der SLE ist charakterisiert durch eine Vielzahl von Veränderungen innerhalb des Immunsystems. Von zentraler Bedeutung ist eine vermehrte Produktion von Autoantikörpern. Diese Autoantikörper sind gegen nukleäre, cytoplasmatische und Zelloberflächen-Antigene gerichtet, sowie gegen lösliche Antigene, wie Immunglobuline und Komplementfaktoren [18]. Autoantikörper gegen dsDNA (Doppelstrang-DNA), Sm und Cardiolipin sind ebenfalls charakteristisch und wurden deshalb in die Klassifikationskriterien des ACR von 1982 aufgenommen [5].

Die sich bildenden Immunkomplexe und Autoantikörper zirkulieren im peripheren Blut und können sich schließlich an den Basalmembranen der Glomeruli, der Epidermis und der Gefäßwände ablagern und somit das Komplementsystem aktivieren. Als Folge entstehen Entzündungsreaktionen, die zu Gewebsschädigungen in Form von Glomerulonephritis und/ oder Vaskulitis führen [18, 19].

Der Grund für das gehäufte Auftreten von Autoantikörpern konnte noch nicht zufrieden stellend geklärt werden. Ein Erklärungsansatz besagt, dass B-Zellen unspezifisch stimuliert werden und sich somit Antikörper gegen entsprechende Antigene bilden [20]. Hitzeschockproteine oder auch Superantigene, die bestimmte Rezeptoren unspezifisch aktivieren, dienen hierbei als Auslöser [21, 22]. Eine weitere Hypothese geht von einer Aktivierung der B-Lymphozyten durch Stimulation spezifischer Antigene aus. Die nukleären Antigene werden entweder von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufgenommen oder binden direkt an Antikörper auf der Oberfläche der B-Lymphozyten. Beide Zellen spalten die Antigene in Peptide und präsentieren diese mittels der HLA-Moleküle den T-Lymphozyten. Die dadurch aktivierten T-Lymphozyten stimulieren wiederum die B-Lymphozyten und damit die Produktion von Autoantikörpern. Die Interaktion von B- und T-Lymphozyten wird durch zahlreiche Zytokine ermöglicht. Dieser Mechanismus legt nahe, dass es nicht nur zu einer Störung der B-Zellfunktion bei Patienten mit SLE kommt; Veränderungen der Funktion bei Monozyten, T-Lymphozyten und den entsprechenden Zytokinen werden ebenfalls mit SLE assoziiert [23]. So scheint es, dass eine exzessive und unkontrollierte Stimulation der B-Lymphozyten durch T-Lymphozyten ein wichtiger Faktor in der Differenzierung und Bildung der Autoantikörper ist [18].

Die nukleären Antigene werden wahrscheinlich durch eine erhöhte Apoptoserate bei Infekten oder durch Umwelteinflüsse wie UV-Licht freigesetzt. Die Clearance dieser apoptotischen Zellen und der Immunkomplexe durch Makrophagen ist bei Patienten mit SLE jedoch beeinträchtigt [24].

Der Grund für die mangelhafte Clearance der apoptotischen Zellen bei Patienten mit SLE ist noch nicht geklärt. Eine mögliche Ursache besteht in quantitativen oder qualitativen Defekten der frühen Komplementfaktoren wie C2, C4 oder C1q [25]. Besonders der C1q-Rezeptor auf der Oberfläche von Phagozyten spielt eine wichtige Rolle in der Clearance von apoptotischen Zellen [26] da durch Bindung von Immunkomplexen an den C1q-Rezeptor die Komplementaktivierung ausgelöst wird. Eine andere Möglichkeit könnte eine reduzierte Anzahl der Komplement-bindenden

CR1-Rezeptoren auf der Oberfläche von Phagozyten sein [27, 28]. Durch diese erniedrigte Clearance zirkulieren die Antigene lange im Blut und können so zum einen die B-Lymphozyten zur Produktion von Autoantikörpern stimulieren und zum anderen Immunkomplexe bilden, die Schäden in den unterschiedlichen Organsystemen anrichten.

2.1.4 Ätiologie

Eine allgemeingültige Ursache des SLE ist nicht bekannt. Es konnten jedoch eine Reihe von Risikofaktoren des SLE charakterisiert werden, hierzu gehören Umweltfaktoren, hormonelle Faktoren, Infektionskrankheiten und genetische Faktoren.

Umweltfaktoren

Eine stark erhöhte Photosensibilität ist mit einer Prävalenz von 45-70 % [29, 30] eines der häufigsten Symptome des SLE und kann zu makulopapulösen oder blasigen Veränderungen sowie zu schweren Erythemen führen. Eine Exazerbation oder Verschlechterung dieser SLE-charakteristischen Hautläsionen sowie eine Exazerbation der systemischen Manifestationen kann durch intensive Sonnenexposition induziert werden [31, 32]. Obwohl als Haupteinwirkungsspektrum für SLE die UV-B-Strahlung (Wellenlänge 280-320nm) zählt [33, 34], haben neueste Studien gezeigt, dass UV-B-Strahlung sowie UV-A-Strahlung (Wellenlänge 320-400 nm), oder ihre Kombination, zu SLE-typischen Hautläsionen führen können [35]. Weshalb UV-Licht zu einer Exazerbation des SLE führen kann ist bislang noch ungeklärt. Eine Hypothese geht davon aus, dass UV-Strahlung eine Apoptose der Keratinozyten induziert, wodurch antigenes Material freigesetzt wird, das wiederum zur Produktion von Autoantikörpern führt. So wurde beispielsweise eine positive Assoziation zwischen dem Vorhandensein von Ro(SSA)- und La(SSB)-Antikörper und einer pathologischen Reaktion auf Lichtprovokation festgestellt [32]. Eine aktuell erschienene Studie hat diese Hypothese jedoch widerlegt, indem sie zeigt, dass die UV-B-induzierte-Apoptose in Patienten mit SLE gegenüber Kontrollen nicht signifikant erhöht ist [36].

D-Penicillamin, Methyl-DOPA, Diltiazem, Minocyclin, Hydralazin und Procainamid können einen Medikamenten-induzierten SLE auslösen, der sich nach Absetzen der Medikamente zurückbildet.

In Bezug auf berufliche Belastung und deren Bedeutung für SLE ist wenig bekannt, außer der beruflichen Siliziumexposition, die mit SLE assoziiert wird [37, 38]. So weisen neueste Studien darauf hin, dass die Belastung mit Silizium zu einer erhöhten Apoptoserate führt [39]. Auch der Einfluss von organischen Lösungsmitteln, wie Trichlorethylen, Schwermetallen, wie Kadmium, Gold oder Quecksilber, Pestiziden und Asbest, wurden untersucht. Eine eindeutige Assoziation mit SLE konnte bislang jedoch nicht festgestellt werden [39, 40]. Aromatische Amine, Hydrazine und Lösungsmittel die in Pflanzenschutzmitteln, Haarfärbemitteln und Zigarettenrauch u.a. enthalten sind, stehen ebenfalls in Verdacht, mit SLE assoziiert zu sein. Ein intensiver Gebrauch von Haarfärbemitteln und ein erhöhtes Auftreten von Kollagenosen (u.a. SLE) ließ sich allerdings nicht bestätigen [41, 42]. Einzig Raucher haben ein signifikant erhöhtes Risiko, an SLE zu erkranken [43].

Das Auftreten von Symptomen des SLE korreliert ebenfalls in einigen Studien mit dem Vorliegen von Depressivität, Ängstlichkeit und psychologischem Stress [44, 45]. So berichten SLE-Patienten von Erkrankungsschüben nach Stressereignissen. Es zeigt sich jedoch keine Korrelation zwischen den SLE-typischen laborchemischen Parametern und dem Ausmaß des Stresses [46]. Zwar berichten viele Studien über eine signifikante Assoziation zwischen dem Ausmaß von Depression, Ängstlichkeit und psychologischem Stress und dem Ausmaß der Erkrankung [47-49]. Diese Studien konnten jedoch nicht ermitteln, ob psychologischer Stress zu einer vermehrten Aktivität des SLE führt, oder ob eine vermehrte SLE-Aktivität zur Folge hat, dass Patienten vermehrt depressiv und ängstlich sind.

Hormonelle Faktoren

Beim SLE besteht, mit einem sechs bis zehnmal höheren weiblichen Anteil, ein hoher geschlechtsspezifischer Unterschied. Sexualhormone wie Östrogene, Androgene und Prolaktin (PRL) scheinen deshalb einen Einfluss auf die Entstehung, Progression und den Schweregrad des SLE zu haben [50]. Sexualhormone beeinflussen die normale Ausdifferenzierung, Reifung und Emigration von Lymphozyten [51]. Östrogen und Prolaktin sind mit einem erhöhten Risiko für SLE assoziiert [52], während Androgene, die als natürliche Immunsuppressiva wirken, das Risiko zu senken scheinen. Auch im Mausmodell des SLE konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Exposition mit Östrogenen zu einer Verschlechterung der Symptome führt. Eine erhöhte Exposition mit Androgenen bewirkt dagegen eine Verbesserung der Symptome [51]. Des Weiteren

konnte bei Patienten mit SLE ein erhöhter Prolaktinwert festgestellt werden [53], der mit der Erkrankungsaktivität und einem erhöhten ANA-Titer korreliert [54, 55]. Prolaktin wurde als Immunmodulator von Lymphozyten identifiziert, da es diese über Bindung an den oberflächlichen Prolaktin-Rezeptor zur Ausreifung und Autoantikörperproduktion stimuliert [56]. Zusätzlich erhöht Prolaktin die Synthese der Zytokine IFN γ und IL-2 [57]. In einer Studie korrelierte außerdem ein erhöhtes Prolaktin mit dem häufigeren Auftreten der Antikörper gegen dsDNA, Sm und Ro(SSA). Jedoch zeigte keine dieser Probandinnen Anzeichen für eine Autoimmunerkrankung [58].

Ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung am SLE entsteht ebenfalls durch eine hormonelle Substitutionstherapie in der Postmenopause [59], jedoch nicht durch die Einnahme oraler Kontrazeptiva [60].

Infektionskrankheiten

Virale oder bakterielle Infektionen können als Auslöser für die Entstehung oder Exazerbation des SLE dienen. Gleichzeitig sind Patienten mit SLE anfälliger für Infektionen als die Normalbevölkerung. Infektionen sind eine Hauptursache für die Morbidität und Mortalität des SLE [61]. Das Potential von Infektionen als Auslöser des SLE wurde im Mausmodell mit New Zealand black x New Zealand white (NZB x NZW) Mäusen untersucht. Diese Mäuse entwickeln ein Lupus-ähnliches Krankheitsbild und produzieren typische Autoantikörper. Werden diese Mäuse mit bakterieller oder viraler DNA exponiert, kommt es zur Produktion von anti-DNA-Antikörpern. Auch der Kontakt mit bakteriellen Polysacchariden führt zu einer beschleunigten Entwicklung des SLE. Findet stattdessen die Aufzucht der Tiere in einer keimfreien Umgebung statt, so wird die Krankheitsentstehung verzögert oder sogar verhindert [62].

Eine besondere Rolle bei der Entstehung des SLE durch Infektionen spielen das Epstein-Barr Virus (EBV) und das Cytomegalievirus (CMV) [61]. Beide Viren persistieren lange im Körper und können bei entsprechender Immunitätslage erneut exazerbieren. Da die Prävalenz von EBV sehr hoch ist, ist es schwierig einen Zusammenhang zum SLE herzustellen. In einer Studie mit Erwachsenen waren 94% der nicht an SLE erkrankten Kontrollen und über 99% der SLE-Patienten seropositiv hinsichtlich EBV, so dass in dieser Studie kein eindeutig signifikanter Unterschied vorlag [63]. Dieses Ergebnis wurde jedoch auf die hohe Prävalenz der EBV-Infektion zurückgeführt, da andererseits über 99% der jugendlichen SLE-Patienten aber nur 70%

der gleichaltrigen Kontrollen seropositiv auf EBV sind [64]. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit SLE eine sehr hohe Zahl von EBV-infizierten Lymphozyten im Blut aufweisen und dass dies mit der Häufigkeit der Krankheitssymptome assoziiert ist [65]. In einer Studie mit SLE-Patienten (18-89 Jahre) hatten 91 % Kontakt mit CMV. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis waren nur 64 % seropositiv hinsichtlich CMV und von den gesunde Kontrollen sogar nur 43 % [66].

Neben EBV und CMV wurde auch Parvovirus B19 mit der Auslösung des SLE assoziiert. So waren 17 von 72 Patienten mit SLE seropositiv hinsichtlich des Parvovirus B19, wogegen alle 22 Kontrollen seronegativ waren [67].

Endogene Retroviren sind retrovirale Sequenzen, die unabhängig innerhalb des menschlichen Genoms liegen. Das Immunsystem reagiert auf diese Retroviren mit der Produktion von Antikörpern, die sich an einige der retroviralen Proteine binden. Bei SLE-Patienten konnte im Serum eine erhöhte Konzentration dieser Antikörper gegen endogene Retroviren nachgewiesen werden. Auch besteht eine Korrelation zwischen diesen Antikörpern und spezifischen Autoantikörpern und Krankheitsmerkmalen des SLE [68, 69]. Dies wird unter anderem auf molekulares Mimikri zurückgeführt [70, 71].

Genetische Faktoren

Die genetischen Grundlagen des SLE sind in den vergangenen Jahren auf unterschiedliche Weise untersucht worden. Erstens in Mausmodellen, zweitens beim Menschen in Zwillings- und Familienstudien und drittens durch Genomanalysen von Patienten. Einen deutlichen Anhaltspunkt für eine genetische Grundlage des SLE beim Menschen ergeben Untersuchungen an Zwillingen. Beim SLE beträgt die Krankheitskonkordanz bei eineiigen Zwillingen 15 - 69 %. Betrachtet man in diesem Zusammenhang das Auftreten von Autoantikörpern, ergeben sich Konkordanzraten von 92 %. Im Vergleich dazu sind nur 2- 5 % der zweieiigen Zwillinge konkordant für SLE [72-75]. Des Weiteren ist eine positive Familienanamnese für SLE oder andere Autoimmunerkrankungen ein Risikofaktor für die Entstehung des SLE. In einer Studie berichteten 23 % der Patienten mit SLE, im Gegensatz zu nur 6 % der Kontrollen, von einem Verwandten ersten Grades mit einer Autoimmunerkrankung [76]. In älteren Studien heißt es, dass 10 – 12 % aller Patienten mit SLE einen Verwandten ersten oder zweiten Grades haben, der ebenfalls an SLE erkrankt ist [77, 78]. Das Erkrankungsrisiko für genetisch Verwandte, im Vergleich zur Normalbevölkerung, lässt sich quantifizieren und wird als λ - Wert bezeichnet. Der λ - Wert für SLE wird in

Abhängigkeit zur jeweiligen untersuchten Bevölkerungsgruppe zwischen 20 - 80 veranschlagt und liegt damit höher als bei anderen Autoimmunerkrankungen [79].

In mehreren umfassenden Studien wurden Analysen durchgeführt, um Risikogene des SLE zu identifizieren (Tabelle 2.2) [80-84]. Bei diesen genomweiten Kopplungsanalysen handelt es sich um Kartierungsverfahren. Nahe beieinander liegende Gene werden mit einer großen Wahrscheinlichkeit bei der Rekombination der Meiose gemeinsam weitergegeben. Als Marker dienen dabei häufig vorkommende Dinukleotidsequenzen, sogenannte Mikrosatelliten. Die Studien haben verschiedene Bevölkerungsgruppen mit unterschiedlichem ethnischen Hintergrund und somit unterschiedlichen Risikogenen untersucht. Durch diese Heterogenität des SLE resultiert die Ergebnisdivergenz der einzelnen Studien. Alle Studien haben mehrere Regionen entdeckt, die eine mögliche Verbindung zum SLE haben (LOD-Score >1), es wurde jedoch nur bei sieben Fällen eine starke Assoziation des SLE mit einzelnen Risikoloci identifiziert (LOD-Score >3,3). Dazu gehören die Regionen 1q22-23, 1q41-42, 2q37, 4p16, 6p21-p11, 16q13 und 17p13 (Tabelle 2.2) [75]. Es erscheint somit als immer wahrscheinlicher, dass eine Vielzahl von Genen, unter Mitwirkung von MHC- und non-MHC-Genen, an der Entstehung der Erkrankung beteiligt sind.

Tabelle 2.2: Ergebnisse der Genomanalyse zur Identifikation von Risikoregionen des SLE [79], modifiziert

Chr	Region	Lod	Bevölkerungsgruppe	Referenz
1	1p36	1.00	All	[81]
		0.69	MA	[82]
	1p13	1.53	All	[81]
	1p21	1.42	CA+MA	[82]
	1q22-24	2.75	All	[84]
	1q23-24	3.37	AA	[80]
		1.51	CA+MA	[82]
	1q31	2.04	AA+EA	[80]
	1q31	1.61	SW	[83]
	1q41-42	3.50	AA	[80]
		1.51	All	[81]
	1q44	2.40	CA+MA	[82]

Tabelle 2.2 (Forts.): Ergebnisse der Genomanalyse zur Identifikation von Risikoregionen des SLE [79], modifiziert

Chr	Region	Lod	Bevölkerungsgruppe	Referenz
2	2p15	1.68	All	[81]
	2q11	2.13	SW	[83]
	2q21-33	1.12	All	[81]
	2q32	2.09	EA	[80]
	2q35-37	1.53	All	[84]
	2q37	4.24	IC+SW	[83]
3	3p21	1.68	AA	[80]
	3cen-q11	1.24	All	[81]
4	4p15	3.20	IC	[83]
		2.18	EA	[80]
	4p16-15.2	3.84	EA	[84]
	4q28	2.00	CA	[81]
5	5p15	1,52	SW	[83]
		1.26	IC	[82]
		1.75	All	[84]
6	6p11-21	3.90	All	[81]
		0.56	CA+MA	[82]
		1.87	SW	[83]
	6p22	?	?	[83]
	6p21-22	1.70	AA	[84]
	6p23-24	2.06	AA	[84]
	6p12-q14	2.36	AA	[84]
	6q23	1.13	SW	[83]
	6q26-27	2.04	EA	[80]
7	7p15	1.79	IC	[83]
9	9p24-21	2.08	AA	[84]
11	11p15	1.41	CA	[81]
	11p13	1.87	AA	[80]
	11q14-23	2.10	AA	[80]

Tabelle 2.2 (Forts.): Ergebnisse der Genomanalyse zur Identifikation von Risikoregionen des SLE [79], modifiziert

Chr	Region	Lod	Bevölkerungsgruppe	Referenz
	11q23	1.15	SW	[83]
	11q25	2.15	EA	[80]
12	12p12-11	2.01	EA	[80]
		1.79	EA	[84]
	12q24	2.04	EA	[84]
13	13q32	2.50	AA+EA	[80]
14	14q11	2.21	EA	[80]
	14q21-23	2.81	All	[81]
		0.87	CA+MA	[82]
15	15q26	2.09	CA	[81]
16	16q13	3.64	All	[81]
		0.99	CA+MA	[82]
17	17p13.3	1.57	EA	[84]
18	18q21	1.17	SW	[83]
		1.40	CA+MA	[82]
19	19p13	2.58	IC	[83]
	19q13	2.05	IC	[83]
		2.05	EA	[80]
20	20p13-12	2.62	All	[81]
		1.13	CA+MA	[82]
	20q11	0.54	CA+MA	[82]
	20q13	2.49	AA+EA	[80]
21	21q21	1.58	IC	[83]
		1.88	EA	[80]

Chr: menschliches Chromosom; Region: chromosomale Region; LOD: LOD-Score ($\text{lod} = Zlr^2/2\ln 10$); Bevölkerungsgruppe: untersuchte Bevölkerungsgruppe: Caucasian American (CA), African American (AA), European American (EA), Icelandic (IC), Swedish (SW), Mixture of 84 Caucasian, 8 Hispanic, 6 African-American, 3 Asian, 4 mixed heritage (All); Referenz: Studie in der das Ergebnis ermittelt wurde [78], modifiziert]. Risikoloci mit einem LOD-Score $>3,3$ sind dick hervorgehoben [75]

2.2 MIC-B

2.2.1 Überblick

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex, MHC) umfasst eine Gruppe von Genen, die als Transkriptionsvorlage für Proteine dienen, die für die Immunerkennung, die Gewebeverträglichkeit (Histokompatibilität) und die immunologische Individualität wichtig sind.

Der humane MHC wird aufgrund seiner Beschreibung als eines der ersten Lymphozytenantigene, auch als Humaner Leukozyten Antigen (engl.: Human Leukocyte Antigen, HLA) Komplex, bezeichnet. Seine immunologische Funktion besteht darin, dass Antigene, die im Rahmen der spezifischen Immunantwort von T-Lymphozyten erkannt werden sollen, zunächst auf spezifischen Rezeptoren, denen vom MHC-Komplex kodierten Klasse I- und Klasse II-Molekülen, auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Dieses wird als MHC-Restriktion bezeichnet und ist eine Voraussetzung für die Unterscheidung der eigenen (autologen) von fremden (allogenen) MHC-Molekülen durch die auf T-Zellen exprimierten T-Zellrezeptoren (TZR). Der TZR erkennt das MHC-Molekül und das antigene Polypeptid zusammen in Form eines Heterodimers [85-87]. Die MHC Klasse I Moleküle interagieren hierbei mit dem TZR von $CD8^+$ zytotoxischen T-Lymphozyten und dem aus dem intrazellulären Peptidreservoir stammenden Polypeptidfragmenten. Die MHC Klasse II Moleküle präsentieren hingegen den $CD4^+$ T-Lymphozyten meist Polypeptidfragmente, die aus dem Extrazellularraum stammen [88]. Mehrfache Assoziationen bestimmter HLA-Gene und der durch sie kodierten Antigene mit Krankheiten des rheumatischen, autoimmunen, infektiösen und onkologischen Formenkreises legen die klinische Bedeutung des HLA-Komplexes dar [89].

Im Jahre 1994 wurde mittels der genetischen Charakterisierung des humanen MHC eine neue Gruppe von polymorphen Genen identifiziert. Diese zusammenfassend als MIC (engl.: MHC class I chain-related) Gene bezeichnete Gruppe, zeigt Homologien mit den klassischen HLA Molekülen. Sie binden jedoch nicht an β_2 Mikroglobulin, präsentieren keine Peptide und werden nicht auf normalen zirkulierenden Lymphozyten exprimiert [90-93].

Innerhalb der MIC-Gene bilden die MICA- und MICB-Moleküle eine neue Klasse von Glykoproteinen, die sich als Antigene auf den Oberflächen von Darm-Epithelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten befinden. MIC Moleküle sind Liganden für den weit

verbreiteten aktivierenden Immunorezeptor NKG2D (engl.: natural killer cell receptor) [91, 93-97]. Im Gegensatz zu den klassischen MHC Klasse I Molekülen reagieren die MIC Moleküle nicht auf die Interferone Typ I und Typ II, sondern sind über eine Steigerung der Hitzeschock Elemente Stress-induzierbar [98]. Während sich zwischen den MICA und MICB Proteinen eine große Ähnlichkeit feststellen lässt (84 % identisch), unterscheiden sie sich signifikant von den MHC Klasse I Molekülen mit Identitäten von 28-35% in den $\alpha 1$ - $\alpha 3$ Domänen [99-101].

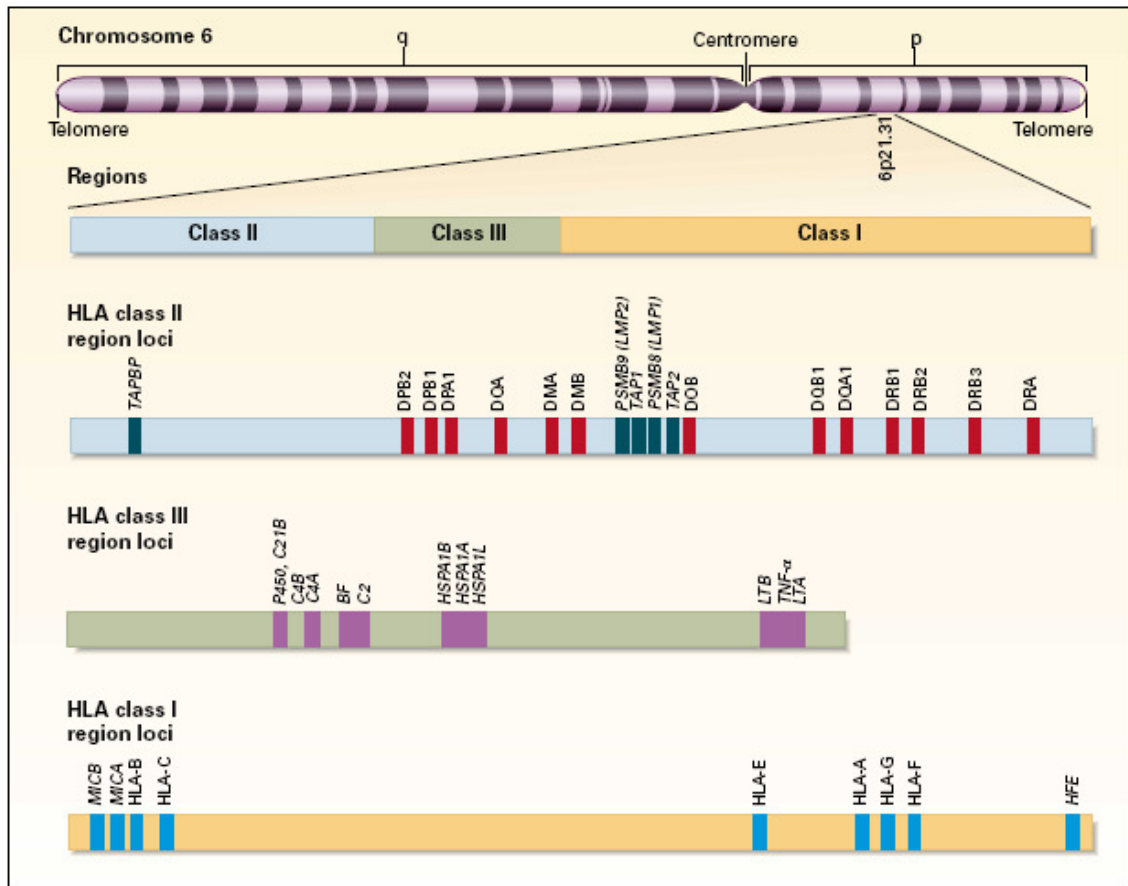
2.2.2 HLA-Komplex

Der HLA-Komplex, mit einer Gesamtlänge von 3,6 Megabasenpaaren (Mb), befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p21.31). Innerhalb des gesamten humanen Genoms ist dies der Bereich mit der höchsten Gendichte und dem ausgeprägtesten Polymorphismus. Insgesamt wurden 224 Loci im humanen MHC identifiziert. Von diesen 224 Loci werden 128 exprimiert. Die restlichen Genorte repräsentieren entweder Pseudogene oder sind Genorte mit einer bislang unbekanntem Funktion. Die genomische HLA-Region wird in drei Bereiche unterteilt [102]: Der telomere Abschnitt wird als Klasse I und der zentromere Abschnitt als Klasse II bezeichnet. Dazwischen befinden sich die Klasse III Gene (Abb. 2.1).

Die HLA Klasse I und II Moleküle sind in die Kontrolle der Immunantwort involviert, indem sie als membrangebundene Glykoproteine dem TZR antigenabgeleitete Peptide präsentieren.

Die MHC Klasse I Moleküle werden auf nahezu allen somatischen Zellen des menschlichen Organismus exprimiert. Die Expressionsrate hängt vom jeweiligen Gewebetyp ab. Die Klasse I Moleküle bestehen aus einer größeren membranverankerten Untereinheit, der α -Polypeptidkette, und einer kleineren löslichen Untereinheit, dem $\beta 2$ -Mikroglobulin ($\beta 2M$). Die Klasse I Gene kodieren jedoch nur die α -Polypeptidkette der Klasse I Moleküle. Die β -Kette wird durch das $\beta 2M$ Gen auf Chromosom 15 kodiert. Insgesamt enthält die HLA-Region mehr als 20 Klasse I Gene, von denen sechs funktionstüchtig sind. Als klassische oder Ia Genorte werden die Gene HLA-A, HLA-B und HLA-C bezeichnet. Die Klasse Ia Gene besitzen einen höheren Polymorphismus und unterscheiden sich zusätzlich in Gewebeverteilung und Funktion von den Klasse Ib Genorten HLA-E, HLA-F und HLA-G [88].

Abbildung 2.1: Darstellung des humanen MHC auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p21.31) und seine Unterteilung in die Klassen I, II, III [88].



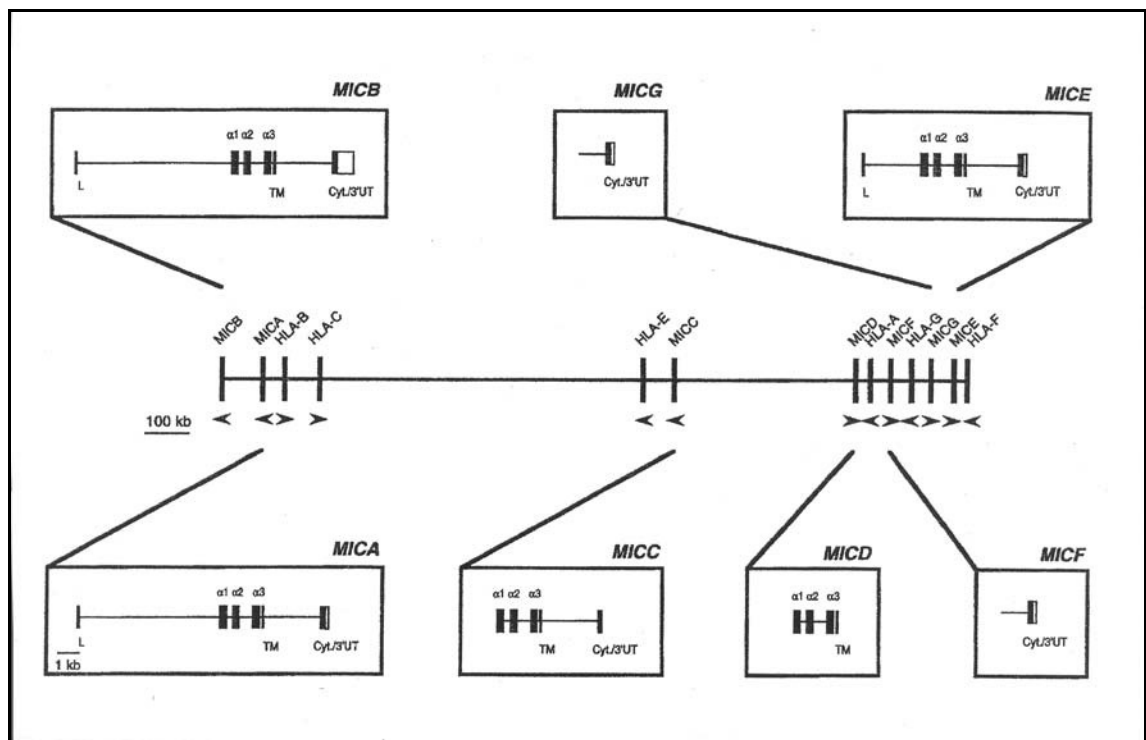
Zentromerwärts schließt sich die Klasse II Region mit einer Größe von 0,8 Mb an. Ihre Genprodukte HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP bilden Heterodimere aus zwei membranverankerten Untereinheiten, der α - und β -Kette. Des Weiteren enthält die Region einige Gene, deren Funktion in der Verarbeitung von intrazellulären Peptiden (LMP2, LMP7) und dem Transport dieser Peptidfragmente in das Endoplasmatische Retikulum (ER) besteht (TAP1, TAP2) [103]. Die MHC Klasse II Moleküle werden hauptsächlich von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert (B-Lymphozyten, aktivierten T-Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Epithel-Zellen des Thymus).

Die Klasse III Region besitzt die höchste Gendichte bei einer Größe von 1,1 Mb. Die enthaltenen Gene kodieren funktionell sehr heterogene Proteine, wie Komplementfaktoren (C2, C3, Faktor B), Hitzeschockproteine (HSP70) und Tumornekrosefaktoren (TNF α , TNF β) [104].

2.2.3 MIC-Gene in der HLA Klasse I Region

Im Jahr 1994 entdeckte die Arbeitsgruppen um Leelayuwat und Bahram unabhängig voneinander vier bzw. fünf bisher noch nicht beschriebene Genregionen innerhalb der Klasse I Region des MHC-Komplexes [90, 105]. Zusätzlich zu diesen als MICA, MICB, MICC(ψ), MICD(ψ) und MICE(ψ) bezeichneten Genregionen wurden einige Jahre später die Regionen MICF(ψ) [100] und MICG(ψ) [106] beschrieben. Die MIC Gene verteilen sich vollständig über die HLA Klasse I Region, mit einer Gesamtlänge von ca. 1,7 Mb.

Abbildung 2.2: MIC Gene und Pseudogene entlang des MHC Klasse I Komplexes [107]



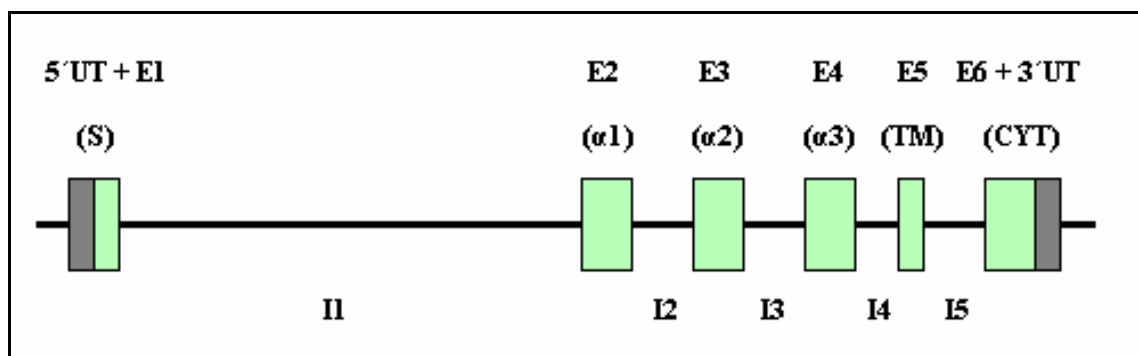
MICA und MICB kodieren funktionierende Glykoproteine, MICC-G sind Pseudogene; L: Signalsequenz (engl.: leader sequence), $\alpha 1$ - $\alpha 3$: $\alpha 1$ - $\alpha 3$ Domäne, TM: transmembrane Anteil, Cyt: cytoplasmatische Anteil, UT: untranslatierte Region

Von den insgesamt sieben MIC Genen kodieren nur MICA und MICB für ein der Klasse I α -Kette ähnliches Polypeptid. Die MIC-Gene MICC(ψ), MICD(ψ), MICF(ψ) und MICG(ψ) gelten als Pseudogene, da sie ihre strukturelle Organisation in den verschiedenen Abschnitten teilweise oder gänzlich verloren haben. Ihnen fehlt die Signalsequenz (engl.: leader sequence) und das folgende erste Intron. Bei MICF(ψ) und

MICG(ψ) befinden sich sogar nur noch Teile von Intron 5 und Exon 6 als Rudimente der ursprünglichen Struktur (Abb. 2.2) [107]. MICE(ψ) kommt in seiner Exon / Intron Verteilung den MICA und MICB Genen noch am nächsten. MICE(ψ) beinhaltet allerdings multiple Deletionen in den Exons 3 und 4, wodurch keine kontrollierte Genexpression entsteht. Somit gilt es als ein Pseudogen (Abb. 2.2) [108].

Die funktionierenden MICA und MICB Gene liegen auf der äußeren zentromeren Seite des Klasse I Komplexes (Abb. 2.1), mit einem Abstand von 41,4 bzw. 141,2 Kilobasen (kb) zu HLA-B, mit entgegengesetzter Transkriptionsrichtung. Sie haben grundsätzlich eine ähnliche Exon/Intron Organisation mit jeweils sechs Exons, die durch die dazwischen liegenden Introns getrennt sind. Das erste Exon kodiert das Signalpeptid. Exon 2, 3 und 4 werden in die $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ Domänen des MICA und MICB Moleküls translatiert und Exon 5 und 6 kodieren den transmembranösen (TM) und cytoplasmatischen (Cyt) Anteil der MICA und MICB Moleküle (Abb. 2.3) [90].

Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des MICB Gens



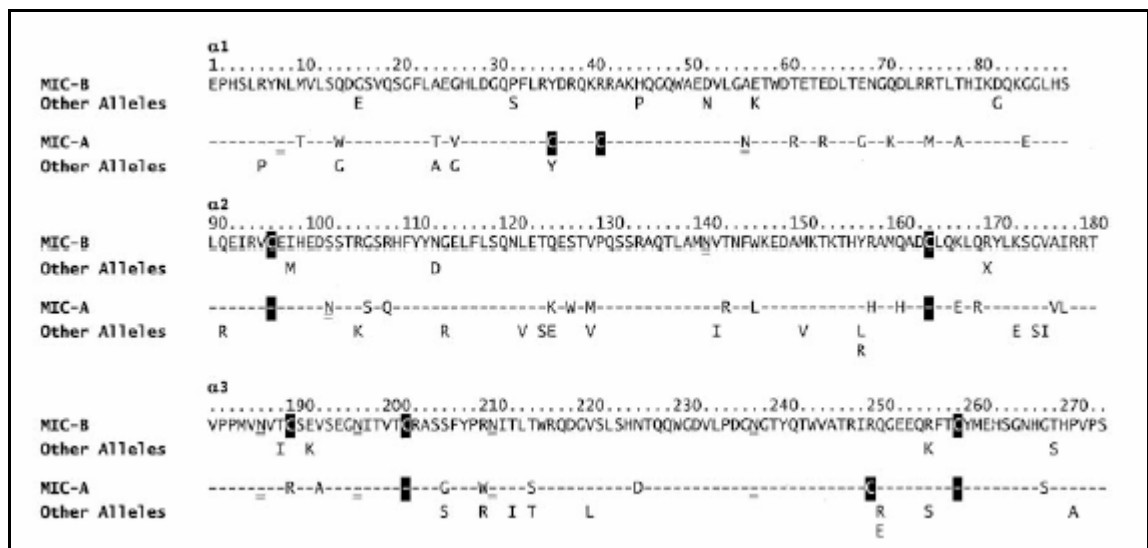
Exon (E1-E6): grüner Balken, Intron (I1-I5): schwarzer horizontaler Strich, 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (5'- und 3'-UT): grauer Balken; Signalsequenz (S), $\alpha 1$ - $\alpha 3$ Domäne ($\alpha 1$ - $\alpha 3$), transmembranöse Anteil (TM) und cytoplasmatische Anteil (CYT) des MICB Moleküls

Die Größe der aus der Transkription hervorgegangenen mRNA (engl.: messenger RNA) ist bei MICA variabel, je nach der Anzahl der im Exon 5 bei unterschiedlichen Allelen beschriebenen repetitiven Sequenzen (engl.: short tandem repeats, STR) in Form von $(GCT)_n$ Wiederholungen [109, 110]. Fünf verschiedene MICA Allele mit 4, 5, 6, 9 und 10 $(GCT)_n$ -STR konnten festgestellt werden. Das bestätigt, dass MICA mRNA, mit einer allelabhängigen Länge von 1382 bp ($(GCT)_4$) bis 1400 bp ($(GCT)_{10}$), existiert. Die

Länge des offenen Leserahmens (engl.: open reading frame, ORF) beträgt demnach bei MICA zwischen 1159 ((GCT)₄) und 1164 ((GCT)₁₀) bp.

Bei MICB beträgt die Länge der mRNA 2376 bp [90], mit einem ORF von 1149 bp. Die MICB mRNA beträgt somit ca. 2,4 kb, im Gegensatz zur MICA mRNA mit einer Größe von etwa 1,4 kb. Diese Differenz von ca. 1 kb ist anhand der deutlich größeren 3'UT-Region des MICB Gens zu erklären. Bei MICA und MICB ist die 3'UT-Region mit der Sequenz für die cytoplasmatische Domäne im Exon 6 fusioniert [100].

Abbildung 2.4: Sequenz der MICA und MICB Allele [111]



Gedankenstriche stehen für Identitäten zwischen MICA und MICB. Sequenz Substitutionen die in anderen Allelen vorhanden sind, stehen unterhalb der dazugehörigen Sequenz. Cystein ist auf schwarzem Hintergrund dargestellt, möglicherweise glykosilierte Asparagine sind zweifach unterstrichen.

Die Translationsprodukte von MICA und MICB sind in der Kettenlänge und der Domänen-Organisation identisch und ähneln sich stark in der Aminosäure (AS) Struktur, mit 84 % passenden AS-Resten. Die Tertiärstruktur der extrazellulären Domänen $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ des MICA und MICB Moleküls wird aus einer Polypeptidkette, bestehend aus 274 Aminosäuren, gebildet und teilt sich in zwei voneinander abgrenzbare Untereinheiten: Die erste Untereinheit besteht aus der $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Domäne, mit einer Länge von jeweils 85 und 92 AS. Die $\alpha 3$ Domäne bildet die zweite Untereinheit, mit einer Länge von 94 AS. Beide Untereinheiten werden über eine kurze Peptidbrücke miteinander verbunden [92, 111]. Die Molekülmasse des

nichtglykosilierten Moleküls beträgt inklusive dem Signalpeptid 43 kDa. Die Länge des kodierten Polypeptids beträgt ohne das Signalpeptid 361 AS [90].

MICA und MICB sind Liganden für den C-type lectin-like activating immunoreceptor NKG2D. Dieser wurde zunächst auf NK-Zellen nachgewiesen, später ebenfalls auf Makrophagen und CD8⁺αβ T-Lymphozyten [99, 100].

NKG2D ist mit dem Adaptermolekül DAP10 (DNA-Activation Protein) verbunden, über das eine Signaltransduktion ausgelöst wird, die via PI3-Kinase (Phosphatidylinositol 3-Kinase) die zytotoxischen Mechanismen der NK oder T Zelle einleitet. Die Interaktion von MIC und NKG2D bildet darüber ein costimulierendes Signal zur Zytokinproduktion, zellulären Proliferation und Aktivierung von NK-Zellen, aktiven Makrophagen und CD8⁺αβ T-Lymphozyten [111, 112].

Trotz eines hohen Polymorphismus der MIC-Gene wurde nur eine polymorphe Position identifiziert, die die Bindung von NKG2D zu beeinflussen scheint. Allele mit einem Methionin an Codon 129 haben eine 10-50 mal größere Kapazität zur Bildung eines NKG2D-Komplexes, als Allele mit einem Valin an dieser Position [113]. Dies bedeutet, dass die verschiedenen Bindungsaffinitäten der einzelnen MIC Moleküle allelabhängig sind.

MICA und MICB sind hoch polymorph, mit bislang 56 entdeckten MICA und 17 MICB Allelen; Zahlen mit deren Anstieg in den nächsten Jahren zu rechnen ist. Die meisten Polymorphismen, die über die extrazellulären Domänen der Proteine verteilt sind, sind die Folge eines einzelnen AS-Austausches (Abb. 2.4). Viele dieser Veränderungen sind nicht beständig. Die Position der Polymorphismen innerhalb der Sequenz und die Anzahl der unterschiedlichen Aminosäuren stehen somit im Gegensatz zu den klassischen MHC Klasse I-Polymorphismen [111].

Der für MICA beschriebene Polymorphismus umfasst 56 Allele, von denen sechs Varianten sich ausschließlich durch synonyme Nukleotidsubstitutionen unterscheiden. Die restlichen 50 Allele kodieren je ein in der Peptidsequenz divergierendes Glykopeptid. Die meisten der polymorphen Aminosäure Positionen befinden sich in Exon 3 und 4, in denen die α2 und α3 Domänen des MICA Moleküls kodiert werden. [114, 115]. Exon 2 und 3 liegen jedoch außerhalb der vermuteten Antigen-Bindungsstelle. Des Weiteren findet sich ein Polymorphismus auch in Exon 4 [113].

MICB besitzt einen geringeren Polymorphismus als MICA. Es wurden bislang 17 Allele identifiziert [98, 111-113, 116, 117]. Diese sind durch 15 Nukleotid-Substitutionen definiert, von denen zwölf nicht synonym sind. In der kaukasischen Bevölkerung

wurden von den insgesamt 17 MICB-Allelen nur sechs identifiziert. Dazu gehören MICB 01022v, MICB 0103101v, MICB 0104, MICB 0105, MICB 0106, MICB 0112 (Tab. 2.3) [112].

Tabelle 2.3: MICB Allel Bezeichnung nach der Oxford Nomenklatur [117, modifiziert]

MICB Allel (Oxford nomenclature)	Accession Number	Reference
MICB-0101	X91625	[100]
MICB-01021	AB003599	[116]
MICB-01021v	nicht zugeteilt	[118]
MICB-01022	AB002600	[116]
MICB-01022v	AJ251160	[119]
MICB-01023	AB003601	[116]
MICB-0103101	AB003602	[116]
MICB-0103101v	AJ251156	[119]
MICB-0103103	AB003604	[116]
MICB-0104	AB003605	[116]
MICB-0105	AB003606	[116]
MICB-0106	AB003607	[116]
MICB-0107N	AB003608	[116]
MICB-0110	AF021225	[113]
MICB-0111	AF021226	[113]
MICB-0112	U95732	[98]
MICB-0113	U95733	[98]

Allele, die in der kaukasischen Bevölkerung identifiziert wurden, sind blau markiert.

2.2.4 Funktion und klinische Relevanz von MICA und MICB

Eine Infektion mit dem humanen Cytomegalievirus (HCMV) führt zu einer Expression von MIC-Molekülen auf der Zelloberfläche von Fibroblasten und Endothelzellen, vermutlich als Folge des entstandenen Zellstresses. Es wurde nachgewiesen, dass es bei der Bindung von NKG2D an MICA oder MICB zu einer erhöhten TZR-abhängigen

Zytolyse der CMV-infizierten Zielzellen kommt. Dieser Mechanismus scheint die durch die CMV-Genprodukte eingeschränkte Entwicklung und Expression der MHC Klasse I-Moleküle und die damit verbundene Reduktion der zytotoxischen T-Zell-Abwehr zu kompensieren. Dies bedeutet, dass auch bei einer quantitativ verminderten Antigenpräsentation durch MHC Klasse I-Moleküle eine antivirale Kompetenz der $CD8^+ \alpha\beta$ T-Zellen gewährleistet ist [97].

Um dieser NKG2D-vermittelten Erkennung und Elimination zu entkommen, haben die CMV-infizierten Zellen eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt: So werden die zellmembranständigen MICB-Moleküle mittels des HCMV-Glykoproteins UL16 maskiert. Hierdurch wird die Interaktion von MICB und dem aktivierendem Rezeptor NKG2D / DAP10 blockiert. Ferner werden die MICB-Moleküle in den CMV-infizierten Zellen intrazellulär im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten, so dass sie die Zelloberfläche nicht erreichen. Beide Mechanismen reduzieren die NKG2D-Ligandendichte auf der Zelloberfläche und vermindern somit die NK-Zytotoxizität [120-122].

Eine weitere Funktion der MIC-Moleküle liegt möglicherweise in der Tumorabwehr. So exprimieren viele Karzinome und vor allem epitheliale Tumoren MIC-Moleküle. MICA und MICB dienen dabei als Tumor-assoziierte Antigene, die von $V\delta 1^+ \gamma\delta$ T-Zellen erkannt werden und so zur Lyse der Tumorzelle führen. Zusätzlich ist bei Tumoren, die MICA und MICB exprimieren, die Häufigkeit von $V\delta 1^+ \gamma\delta$ T-Zellen signifikant höher als bei MICA und MICB negativen Tumoren [96, 123].

Bei vier Erkrankungen konnten eindeutige Zusammenhänge mit einem bestimmten MICA Allel nachgewiesen werden. So kommt das MICA5.1 Allel signifikant häufiger bei Patienten mit einer primären Nebenniereninsuffizienz (Morbus Addison) als bei gesunden Kontrollen vor [124]. Auch bei Patienten mit primärer sklerosierender Cholangitis ist das MICA5.1-Allel zusammen mit den MHC Klasse I und II Molekülen HLA-B8 und HLA-DR3 deutlich erhöht [125]. Das MICA-TM-A6 Allel mit sechs (GCT/AGC) Wiederholungen in Exon 5 ist bei Patienten mit Morbus Behçet identifiziert worden [126]. Zusätzlich besteht eine Assoziation zu HLA-B*5101 [127, 128]. Bei japanischen Patienten mit Colitis ulcerosa konnte eine Verbindung der Erkrankung mit dem Allel MICA*004 nachgewiesen werden. MICA*004 homozygote Patienten zeigen sowohl ein früheres Auftreten als auch einen schwereren Verlauf als heterozygote Kontrollen [129].

2.3 Fragestellung

Die Prädisposition für den SLE wird durch genetische Risikofaktoren und wahrscheinlich auch durch Virusinfektionen bestimmt. Gene, die erstens in Chromosomenloci liegen, die anhand von genomweiten Screeninganalysen Risikogene des SLE enthalten, und zweitens an der Abwehr von viralen Infektionserregern beteiligt sind, sind damit potentiell an der Ätiologie des SLE beteiligt.

Hierbei ist das Gen MICB ein interessantes, funktionelles und positionelles Gen, da die Expression von MICB durch virale Infektionen induziert wird und sich das Gen im MHC-Komplex befindet. Diese Region wurde bereits durch Kopplungsanalysen als Risikoregion für den SLE identifiziert.

Ziel dieser Arbeit war es, die folgenden Fragen zu klären:

1. Sind MICB-Allele mit dem systemischen Lupus erythematoses assoziiert?
2. Wenn ja, sind die assoziierten MICB-Allele mit einzelnen klinischen Suptypen bzw. einzelnen Krankheitssymptomen oder Laborparameterveränderungen des SLE assoziiert?

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

Biofuge pico	Heraeus Sepatech
Elektrophoresis Power supply – EPS 3500	
Gel-Elektrophoresekammern	
· Mini sub TM DNA cell	Bio Rad
· Pharmacia LKB GNA 200	Pharmacia
Heizplatte und Magnetrührer MR 2002	Heidolph
Kamera MPS 515	Leitz
Molecular Analyst [®]	BioRad
Photometer (UV-Meter 1202)	Shimadzu Corporation
Rüttler Vortey Genies 2 TM	Bender & Hobein AG
Spannungsgerät LKB GPS 200/400	Pharmacia
T ₃ Thermocycler [®]	Biometra
Thermostat 5320	Eppendorf

3.2 Software

Adobe Photoshop	
Microsoft Word	
Microsoft Exel	
Molecular Analyst [®] Software Version 1.4	BioRad

3.3 Arbeitsmaterial

Nanotips	Eppendorf, Hamburg
PCR-Reaktionsgefäße (0,5 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht
Pipetten (2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl)	Eppendorf
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße Safelock (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner

3.4 Chemikalien und Enzyme

100 bp Ladder	New England Biolabs
[bp]: 100; 200; 300; 400; 500/517; 600; 700; 800; 900, 1000, 1200, 1517	
<ul style="list-style-type: none">· 60µl DNA Marker· 100µl DNA Ladepuffer· H₂O	
Aqua dest	
Agarose, ultra PURE™	GIBCO™BRL (Invitrogen, Karlsruhe)
AmpliTaq GOLD Polymerase™	Applied Biosystem, Darmstadt
DNA-Ladepuffer	
<ul style="list-style-type: none">· 100% Glycerin· 0,25% Orange G· H₂O	
dNTPs Nucleix Plus™	Amersham Biosciences, Freiburg
Essigsäure (reinst, 100%)	Merck, Haar
Ethanol (absolut)	T.J. Baker, Deventer
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Glycerol (wasserfrei, reinst)	Merck, Haar
Orange G	Sigma Aldrich, Taufkirchen
PCR-Buffer	Applied Biosystem, Darmstadt
TAE-Puffer	
<ul style="list-style-type: none">· 40nM Tris-Acetat· 1nM EDTA	

3.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide (Tabelle 3.1) wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert. Die lyophilisierten Primer wurden in destilliertem Wasser gelöst (100 pmol/μl) und bei -20°C gelagert.

Tabelle 3.1: verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz						
MIC 3070	5'-CAG	GGA	CAG	TGG	GCA	GAC	A-3'
MIC 3104	5'-CTC	ACA	GAC	CCT	AAT	CTC	CT-3'
MIC 3071	5'-GAA	GAT	GTC	CTG	GGA	GCT	G-3'
MIC 3080	5'-GAG	AGG	AAG	AGC	TCC	CCA	TT-3'
MIC 3075	5'-CCC	CCC	ATG	GTG	AAT	GTC	AT-3'
MIC 3087	5'-TTG	ACT	CTG	AAG	CAC	GAG	CG-3'

3.6 Probengewinnung

Im Rahmen einer von der Ethikkommission der MHH genehmigten Studie im Kompetenznetz Rheuma erfolgte nach schriftlicher Einwilligung die Blutentnahme von SLE-Patienten und gesunden Blutspendern als Kontrollgruppe. Die Diagnose des SLE beruhte auf den Klassifikationskriterien des American College of Rheumatology (s. Einleitung). Eine Erkrankung lag vor, sofern mindestens vier der Kriterien erfüllt waren. Parallel zur Blutentnahme wurden verschiedene klinische und laborchemische Parameter der Patienten erfasst, die in den folgenden Tabellen zusammengefasst sind:

Tabelle 3.2: Bei den Patienten erfasste klinische Parameter

Klinische Parameter	
Thrombose	Diffuser Haarausfall
Fehlgeburt	Kreisrunder Haarausfall
Sonnenallergie	Raynaud-Syndrom
Aphthen	Normale Schwangerschaft
Gelenkentzündung	Cutane Vaskulitis
Muskelschmerzen	Akrale Nekrosen
Krampfanfall	Diskoides Erythem
Depression	Schmetterlingserythem
Neuropathien	Lymphadenopathie
Psychose	Splenomegalie (>13cm)
Rippenfellentzündung	Autoimmunthrombozytopenie
Herzklappenentzündung	Hämolytische Anämie
Herzbeutelentzündung	Myositis
Ständiges Augenbrennen	Pneumonitis
Bindehautentzündung	Lungenfibrose
Ständige Mundtrockenheit	Lupusnephritis

Tabelle 3.3: Bei den Patienten erfasste Laborparameter

Laborparameter	
ANA-Titer	Anti-Ro(SSA)
S-Kreatinin	Anti-La(SSB)
Proteinurie	U1-snRNP bzw. RNP
dsDNA-AK Crithidia-IF	Anti-Sm
Erythrozyturie	Anti-Jo
Rheumafaktor	Cardiolipin-AK IgM
ENA-AK	Cardiolipin-AK IgG

3.7 DNA-Isolierung

Mit Hilfe des Qiagen DNA Blood Mini Kit wurde die DNA aus den Blutproben isoliert. In einem 1,5 ml Gefäß wurden hierbei jeweils einer 200 µl Blutprobe 20 µl Qiagen Protease hinzugefügt. Nach Zugabe des AL-Puffers musste die Probe 10 min bei 56°C inkubieren und anschließend wurden 200 µl Ethanol hinzugefügt. Die Probe wurde auf einer mit dem Kit gelieferten Säule bei 8.000 U/min eine Minute lang zentrifugiert. In einem nächsten Schritt wurden 500 µl von der Pufferlösung AW1 auf die Säule pipettiert und bei 8.000 U/min eine Minute lang zentrifugiert. Danach wurden 500 µl des AW2-Puffers hinzugefügt und bei 13.000 U/min 3min lang zentrifugiert. Nach 5 min Inkubationszeit konnte mit einem weiteren Zentrifugenschritt bei 8.000 U/min und 200 µl destilliertem Wasser die DNA isoliert werden.

3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.8.1 Prinzip

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction, PCR) wird ein genau definiertes, lineares DNA-Fragment mittels einer DNA-abhängigen Polymerase vervielfältigt. Diese *in vitro* Amplifikation erfolgt durch mehrfache Wiederholung eines Zyklus aus Aufspaltung des DNA-Doppelstrangs (Denaturation), Anlagerung der Primer (Annealing) und Synthese des DNA-Strangs (Elongation) (Abb.3.1). Für die enzymatische Reaktion werden zwei Primer benötigt, die das zu amplifizierende Fragment flankieren, und deren Sequenz zu jeweils einem der beiden DNA-Stränge komplementär ist. Als Matritze können sowohl Plasmid-DNA, als auch chromosomale DNA dienen. Das Reaktionsgemisch einer PCR enthält folgende grundlegende Komponenten:

- Hitzestabile DNA-Polymerase
- Zwei Primer (Oligonukleotide)
- Nukleotide (Gemisch aus den vier benötigten Desoxyribonukleinsäuren, sog. dNTPs)
- DNA-Vorlage
- Pufferlösung
- H₂O

Bei der *Denaturierung* wird zunächst das Reaktionsgemisch auf 94 - 96°C erhitzt, um die einzelnen DNA-Doppelstränge zu trennen. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, aufgebrochen.

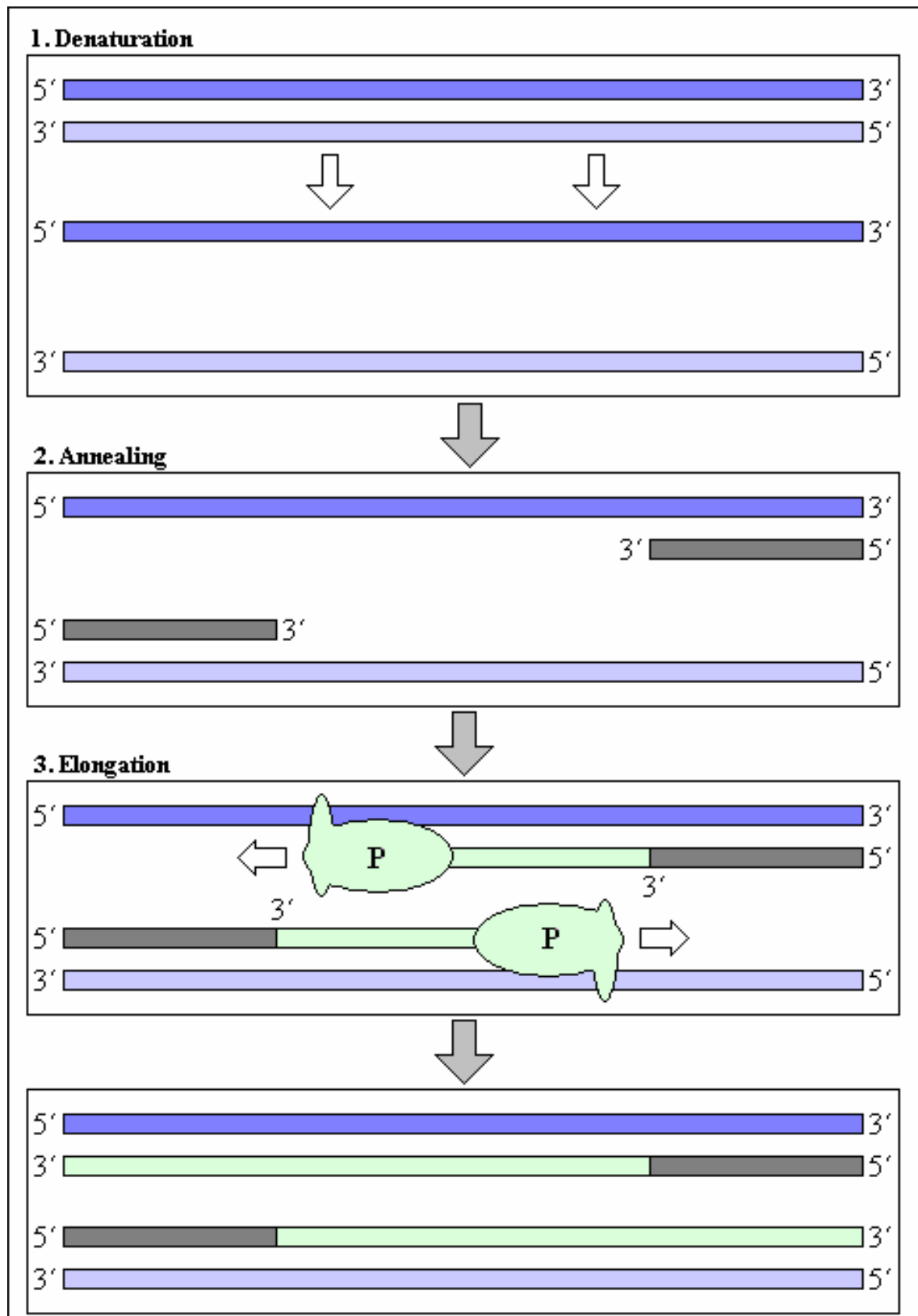
Im folgenden *Annealing* wird die Temperatur des Reaktionsgemisches gesenkt, so dass sich die Primer an die einzelnen DNA-Stränge anlagern können. Dies geschieht sequenzspezifisch, so dass sich der jeweilige Primer an eine zu seiner Sequenz komplementären Struktur anlagert. Die Temperatur während dieser Phase ist Primer-abhängig und liegt normalerweise 2 - 3°C unter dem jeweiligen Schmelzpunkt, etwa zwischen 50 - 65°C. Wird die Temperatur zu hoch gewählt, kann es passieren, dass sich die Primer nicht an die DNA anlagern. Wird dagegen die Temperatur zu niedrig gewählt, kann dies zu einer unspezifischen Anlagerung der Primer führen.

Während der *Elongation* füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Das kurze Doppelstrangstück aus Primer und DNA dient hierbei der Polymerase als Andockstelle für die Synthese. Die Polymerase beginnt am 3`-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang. Der Primer bildet den Anfang des Einzelstrangs und wird deshalb nicht wieder abgelöst. Die Temperatur hängt hierbei von der verwendeten DNA-Polymerase ab und beträgt 68 - 72°C.

Nach dem letzten Zyklus folgt ein Extensionsschritt von 5 - 10 min bei 72°C, zur Vervollständigung partiell verlängerter Produkte, da die DNA-Polymerasen mit steigender Zyklenzahl immer langsamer werden.

Initial benötigen einige Enzyme eine Aktivierung (Hotstart) von 10 min, da ihre Aktivität durch einen Antikörper inhibiert wird. So wird eine unspezifische Reaktion beim Erstellen des Reaktionsansatzes verhindert.

Abbildung 3.1: Prinzip der Polymerase Kettenreaktion (PCR)



Schematische Darstellung der Polymerase Kettenreaktion: Die blauen Balken stellen den DNA-Doppelstrang da, die grauen Balken die zugefügten Primer und die grüne Balken den jeweiligen neu synthetisierten DNA-Strang. Mit P ist die Polymerase gekennzeichnet.

3.8.2 Durchführung

Reaktionsansatz:

Abgesehen von den jeweils unterschiedlichen Primern wurde für alle Reaktionen folgender Ansatz verwendet:

2,0 µl DNA (10-50 ng)
0,4 µl dNTPs (2,5 mM)
0,2 µl AmpliTaq Gold
2,0 µl AmpliTaq Gold Pufferlösung
0,4 µl Primer sense (10 pMol / µl)
0,4 µl Primer antisense (10 pMol / µl)
14,6 µl H₂O

20,0 µl Reaktionsansatz

PCR-Programm:

Für alle Reaktionen wurde folgendes PCR-Programm genutzt:

96°C	10 min		
96°C	20 sec	}	5x
70°C	45 sec		
72°C	25 sec		
96°C	25 sec	}	21x
65°C	50 sec		
72°C	30 sec		
96°C	30 sec	}	4x
55°C	60 sec		
72°C	90 sec		
72°C	5 min		

3.9 DNA-Gelelektrophorese

3.9.1 Prinzip

Bei der Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Aus glykosidisch verbundener D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose bestehende Agarose dient als interne Matrix. In dieser wandern die DNA-Moleküle aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatreste in einem elektrischen Feld zur Anode. In Abhängigkeit zur Fragmentgröße und der aufgelegten Spannung variiert die Geschwindigkeit. Als Referenz dient eine DNA-Leiter mit DNA-Fragmenten definierter Größe. Die Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA-Stränge wird zur Färbung genutzt. Abschließend erfolgt die Auswertung unter UV-Licht.

3.9.2 Durchführung

Die gewünschte Agarosemenge wurde in 1x TAE aufgekocht und die Lösung danach sofort mit 7,5 µl Ethidiumbromid Lösung gemischt. Nach Abkühlen auf ca. 50 - 60°C wurde das Gel luftblasenfrei in einen, mit einem Kamm bestückten, Gelschlitten gegossen. Nach dem Erstarren wurde der Kamm entfernt und die entstandenen Kammern mit den DNA-Fragmenten beladen. Dazu wurden sechs Teile DNA-Lösung mit einem Teil Gel-Ladepuffer versetzt.

Der Lauf erfolgte bei 100 V (kleines Gel) bzw. 160 V (großes Gel) konstanter Spannung in der Gelelektrophoresekammer.

Zur Analyse im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel mit UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm bestrahlt, wodurch das Ethidiumbromid sichtbar wurde, das sich während der Auftrennung mit der DNA interkalierte.

3.10 Statistische Analysen

Zur Berechnung der Signifikanz der Ergebnisse wurde, mithilfe einer Vierfeldertafel, bei allen Werten Fishers exakter Test angewandt:

Tabelle 3.4: Vierfelder-Tafel:

	Kontrollen	SLE-Patienten	Summe
Risikofaktor – ja Bzw. Test positiv	a	b	a+b
Risikofaktor – nein Bzw. Test negativ	c	d	c+d
Summe	a+c	b+d	a+b+c+d=N

a: Zahl der Kontrollen mit Risikofaktor

b: Zahl der SLE-Patienten mit Risikofaktor

c: Zahl der Kontrollen ohne Risikofaktor

d: Zahl der SLE-Patienten ohne Risikofaktor

Abbildung 3.2: Fishers exakter Test:

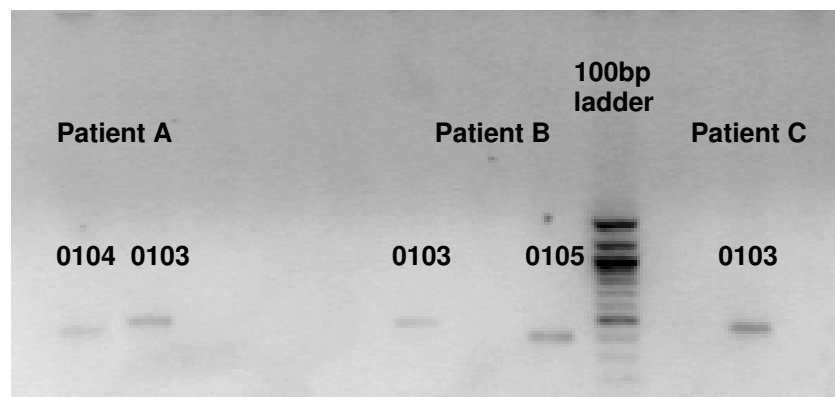
$$p = \frac{(a+b)!(a+c)!(b+d)!(c+d)!}{a!b!c!d!(a+b+c+d)!}$$

Als signifikant wurden nur Assoziationen mit $p < 0,05$ angesehen. Bei der Auswertung der klinischen, laborchemischen und genetischen Parameter wurde das Signifikanzniveau aufgrund der großen Zahl der untersuchten Parameter mit der Bonferroni Korrektur angepasst.

4. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die unterschiedlichen PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese dargestellt und die drei häufigsten MICB Allele und der daraus resultierende Genotyp analysiert (Abb. 4.1). Für die Untersuchung wurden insgesamt 229 SLE Patienten und 165 Kontrollen ausgewählt. In Tabelle 4.1 werden Ergebnisse der Untersuchung dargestellt.

Abbildung 4.1: Gelelektrophorese



Darstellung von drei unterschiedlichen PCR-Produkten aus der Patientengruppe. Bei den ersten beiden Patienten liegt eine Heterozygotie vor, mit MICB0103/0104 bei Patient A und mit MICB0103/0105 bei Patient B. Bei Patient C wurde nur MICB0103 nachgewiesen.

Bei 87/229 (38 %) der SLE Patienten wurde nur das MICB0103 Allel, bei 34/229 (15 %) nur das MICB0104 Allel und bei 23/229 (10 %) nur das MICB0105 Allel nachgewiesen. Weitere 32 Patienten (14 %) waren heterozygot für MICB0104/MICB0103, drei SLE Patienten (1 %) trugen sowohl das MICB0103 sowie das MICB0105 Allel und insgesamt zwölf Patienten (5 %) waren heterozygot für MICB0104 und MICB0105.

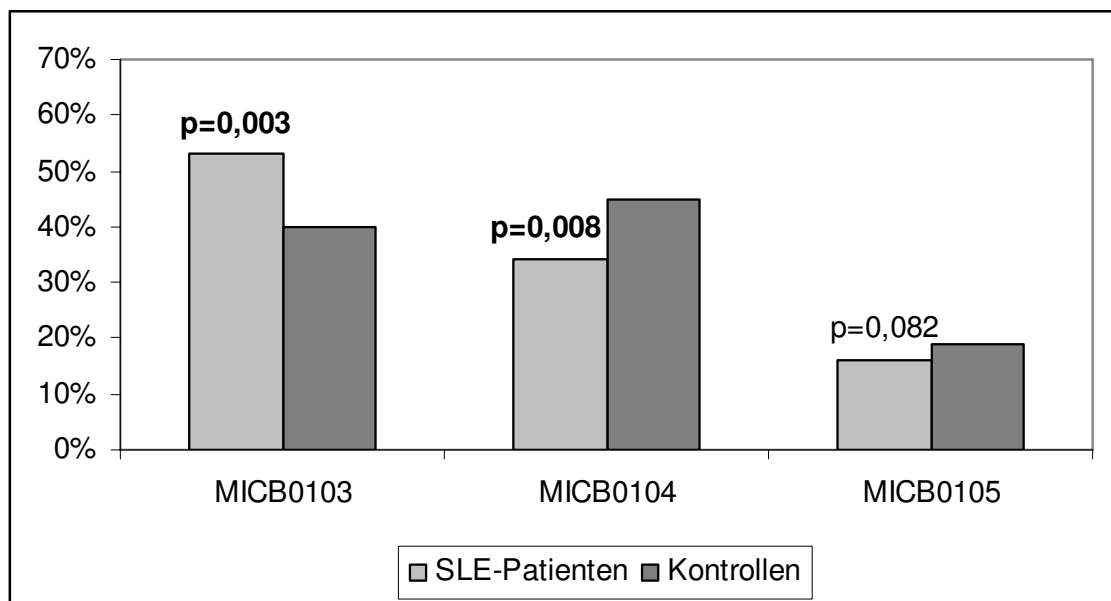
Dagegen wurde bei 43/165 (26 %) Kontrollen nur das MICB0103 Allel, bei 36/165 (22 %) der Kontrollen nur das MICB0104 Allel und bei weiteren elf Kontrollen (7 %) nur das MICB0105 Allel nachgewiesen. Insgesamt 20 Kontrollen (12 %) waren heterozygot für MICB0104/MICB0103, drei Kontrollen heterozygot für MICB0103/MICB0105 und 18 Kontrollen Träger des MICB0104 und des MICB0105 Allels. Des Weiteren waren bei 38 SLE Patienten (17 %) und bei 34 Kontrollen (21 %) die drei untersuchten MICB Allele nicht nachweisbar.

Tabelle 4.1: Verteilung der Genotypen des MICB Polymorphismus bei SLE Patienten und der Kontrollgruppe

MICB Polymorphismus	SLE Patienten	Kontrollen
Nur MICB0103	87 (38%)	43 (26%)
Nur MICB0104	34 (15%)	36 (22%)
Nur MICB0105	23 (10%)	11 (7%)
MICB0104/0103	32 (14%)	20 (12%)
MICB0103/0105	3 (1%)	3 (2%)
MICB0104/0105	12 (5%)	18 (11%)
negativ	38 (17%)	34 (21%)
total	229	165

SLE Patienten weisen im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant häufiger das Allel MICB0103 ($p = 0,004$) auf. Ferner besteht eine negative Assoziation mit dem Allel MICB0104 ($p = 0,008$). Es besteht jedoch keine Assoziation zwischen einer SLE-Erkrankung und dem Auftreten des MICB0105 Allels ($p = 0,082$) (Abbildung 4.2).

Abbildung 4.2: Verteilung der MICB Allele bei SLE-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen mit Angabe des p-Wertes



4.1 MICB0103 und SLE

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob das Vorhandensein des MICB0103-Allels mit einer veränderten Häufigkeit pathologischer Werte der in Kapitel 3 aufgelisteten klinischen und laborchemischen Parameter verbunden ist (Tabelle 4.2, 4.3)

Die meisten der Parameter weisen bei SLE-Patienten mit und ohne MICB0103 ähnliche Häufigkeiten auf. Es findet sich lediglich eine negative Korrelation von MICB0103 zu einem diffusen Haarausfall. Der geforderte p-Wert sinkt, unter Berücksichtigung der Bonferroni-Korrektur, bei einem allgemeinen Signifikanzniveau von 0,05 aber auf 0,0007, womit die Assoziation nicht mehr signifikant ist.

Tabelle 4.2: Prävalenz der angegebenen laborchemischen Parameter bei SLE-Patienten mit bzw. ohne MICB0103

Laborchemische Parameter	MICB0103 +/+, +/-	MICB0103 -/-	p-Wert
ANA-Titer (>160)	79,8%	80,8%	0,176
S-Kreatinin (>70µmol/l)	52,4%	54,7%	0,136
Proteinurie (<150mg/dl)	85,1%	89,7%	0,193
dsDNA-AK Crithidia IF	28,6%	15,8%	0,068
Erythrozyturie	9,5%	10,7%	0,234
Rheumafaktor	24,1%	16,7%	0,123
Anti-Ro (SSA)	46,4%	48,6%	0,161
Anti-La (SSB)	20,9%	20,0%	0,203
U1-snRNP bzw. RNP	12,1%	20,0%	0,130
Anti-Sm	7,7%	9,4%	0,291
Anti-Jo1	3,1%	2,9%	0,450
Cardiolipin-AK IgM	22,0%	17,0%	0,170
Cardiolipin-AK IgG	17,2%	15,0%	0,211

Tabelle 4.3: Prävalenz der angegebenen klinischen Parameter bei SLE-Patienten mit bzw. ohne MICB0103

Klinische Parameter	MICB0103 +/+, +/-	MICB0103 -/-	p-Wert
kumulative Thrombosen	16,0 %	13,9 %	0,168
Fehlgeburt	18,3%	21,9%	0,137
Sonnenallergie	57,1%	61,9%	0,112
kumulative Aphthen	30,4%	23,8%	0,098
Arthritis	79,6%	84,4%	0,127
Myalgien	47,8%	57,1%	0,068
Epilepsie	5,6%	9,2%	0,168
Depression	18,9%	20,3%	0,159
Neuropathien .	34,4%	34,9%	0,136
Psychose	1,1%	1,6%	1,000
Pleuritis	25,3%	28,1%	0,135
Endokarditis	4,6%	6,3%	0,253
Myo-/perikarditis	21,1%	28,1%	0,091
ständiges Augenbrennen	33,3%	42,2%	0,071
Konjunktivitis	26,1%	31,3%	0,111
ständige Mundtrockenheit	38,0%	46,9%	0,072
Diffuser Haarausfall	43,8%	65,1%	0,005
Kreisrunder Haarausfall	7,8%	11,5%	0,165
Raynaud-Syndrom	53,3%	46,0%	0,088
Normale Schwangerschaft	58,1%	50,0%	0,091
Cutane Vaskulitis	15,4%	12,1%	0,166
Akrale Nekrosen	1,1%	6,7%	0,073
Diskoides Erythem	39,3%	44,1%	0,115
Schmetterlingserythem	67,0%	61,2%	0,110
Lymphadenopathie	9,1%	6,7%	0,215
Splenomegalie (Länge > 13cm)	3,5%	5,3%	0,282
Hämolytische Anämie	8,1%	8,2%	0,238
Autoimmunthrombozytopenie	10,5%	10,2%	0,218
Myositis	7,8%	8,2%	0,238
Pneumonitis	3,4%	5,0%	0,283
Lungenfibrose	3,3%	4,9%	0,284
Lupusnephritis	23,3%	18,0%	0,121

Des Weiteren lässt sich eine negative Assoziation zwischen HLA-B7 und dem Vorhandensein von MICB0103 bei SLE feststellen, sowie eine deutliche Assoziation mit HLA-B8 (Tabelle 4.4). Nach der Bonferroni-Korrektur besteht nur noch eine signifikante Assoziation von MICB0103 und HLA-B8.

Tabelle 4.4: Prävalenz der angegebenen genetischen Parameter bei SLE-Patienten mit bzw. ohne MICB0103

Genetische Parameter	MICB0103 +/+, +/-	MICB0103 -/-	p-Wert
HLA-B7	20,0%	40,0%	0,003
HLA-B8	64,0%	25,7%	5,6*10⁻⁷
HLA-B13	4,0%	10,0%	0,076
HLA-B14	5,0%	5,7%	0,262
HLA-B15	15,0%	12,8%	0,166
HLA-B18	12,0%	8,6%	0,159
HLA-B27	5,0%	8,6%	0,160
HLA-B35	10,0%	10,0%	0,204
HLA-B37	0,0%	0,0%	
HLA-B38	4,0%	0,0%	0,117
HLA-B39	2,0%	4,3%	0,243
HLA-B40	15,0%	10,0%	0,120
HLA-B41	2,0%	4,3%	0,243
HLA-B44	9,0%	17,1%	0,054
HLA-B45	2,0%	1,4%	0,431
HLA-B47	1,0%	0,0%	0,588
HLA-B49	4,0%	0,0%	0,117
HLA-B50	1,0%	0,0%	0,588
HLA-B51	5,0%	2,9%	0,253
HLA-B52	2,0%	1,4%	0,431
HLA-B55	1,0%	0,0%	0,588
HLA-B56	0,0%	1,4%	0,412
HLA-B57	5,0%	2,9%	0,253
MICA5.1 (++)	39,1%	39,1%	0,155
MICA5.1 (++/+)	82,6%	71,7%	0,071
NKG2D (G/G)	64,7%	65,2%	0,158
NKG2D (A/G)	30,9%	30,4%	0,164
NKG2D (A/A)	4,4%	4,3%	0,353

4.2 MICB0104 und SLE

Bei der Korrelation des Vorhandenseins von MICB0104 mit den klinischen Parametern und Laborwerten (Tabelle 4.5, 4.6) fand sich eine negative Assoziation von MICB0104 mit einem pathologisch erhöhtem Serum-Kreatinin. Auch dsDNA-Antikörper sind seltener beim Genotyp MICB0104 zu ermitteln. Anti-La (SSB) ist häufiger bei MICB0104, dagegen sind Cardiolipin-Antikörper vom IgM-Typ seltener mit MICB0104 assoziiert. Bei Patienten dem Allel MICB0104 tritt seltener eine Depression, eine Neuropathie, ein diffuser Haarausfall, ein Raynaud-Syndrom und eine cutane Vaskulitis auf. Stattdessen besteht eine Assoziation mit dem Auftreten diskoider Erytheme und einem Schmetterlingserythem. Bei Berücksichtigung der Bonferroni-Korrektur sind diese Werte nicht mehr signifikant.

Tabelle 4.5: Prävalenz der angegebenen laborchemischen Parameter bei SLE-Patienten mit bzw. ohne MICB0104

Laborchemische Parameter	MICB0104 +/+, +/-	MICB0104 -/-	p-Wert
ANA-Titer (>160)	78,1%	82,4%	0,124
S-Kreatinin (>70µmol/l)	38,6%	62,0%	0,005
Proteinurie (<150mg/dl)	87,2%	86,6%	0,233
dsDNA-AK Crithidia IF	12,5%	31,2%	0,019
Erythrozyturie	9,3%	11,4%	0,231
Rheumafaktor	26,2%	19,0%	0,119
Anti-Ro (SSA)	57,1%	42,0%	0,058
Anti-La (SSB)	37,1%	11,6%	0,003
U1-snRNP bzw. RNP	11,4%	15,2%	0,215
Anti-Sm	2,9%	10,8%	0,131
Anti-Jo1	0,0%	4,6%	0,292
Cardiolipin-AK IgM	8,3%	27,0%	0,017
Cardiolipin-AK IgG	13,9%	17,7%	0,202

Tabelle 4.6: Prävalenz der angegebenen klinischen Parameter bei SLE-Patienten mit bzw. ohne MICB0104

Klinische Parameter	MICB0104 +/+, +/-	MICB0104 -/-	p-Wert
Kumulative Thrombosen	9,6%	18,1%	0,075
Fehlgeburt	22,6%	18,3%	0,133
Sonnenallergie	66,0%	55,5%	0,062
Kumulative Aphthen	23,1%	30,1%	0,101
Arthritis	84,9%	79,6%	0,129
Myalgien	50,9%	52,0%	0,133
Epilepsie	3,8%	8,8%	0,146
Depression	11,5%	23,5%	0,036
Neuropathien	23,1%	40,4%	0,014
Psychose	0,0%	1,9%	0,446
Pleuritis	28,9%	25,2%	0,135
Endokarditis	5,8%	5,0%	0,284
Myo-/perikarditis	27,5%	21,6%	0,113
ständiges Augenbrennen	32,1%	39,4%	0,094
Konjunktivitis	25,5%	30,1%	0,128
ständige Mundtrockenheit .	50,0%	40,2%	0,072
Diffuser Haarausfall	30,0%	45,1%	0,029
Kreisrunder Haarausfall	9,8%	8,8%	0,225
Raynaud-Syndrom	39,2%	55,9%	0,021
Normale Schwangerschaft	57,1%	55,8%	0,142
Cutane Vaskulitis	2,0%	18,2%	0,002
Akrale Nekrosen	2,0%	4,00%	0,331
Diskoides Erythem	50,0%	36,73%	0,043
Schmetterlingserythem	74,5%	60,0%	0,031
Lymphadenopathie	8,3%	8,0%	0,248
Splenomegalie (Länge > 13cm)	0,0%	6,3%	0,091
Hämolytische Anämie	8,0%	8,2%	0,248
Autoimmunthrombozytopenie	6,0%	12,6%	0,113
Myositis	5,9%	9,1%	0,209
Pneumonitis	3,9%	4,1%	0,336
Lungenfibrose	5,9%	3,0%	0,226
Lupusnephritis	23,5%	20,0%	0,145

Ergebnisse

Bei MICB0104 lässt sich eine positive Assoziation mit HLA-B7 nachweisen. Dagegen besteht eine negative Assoziation mit HLA-B8, HLA-B15 und HLA-B18 (Tabelle 4.7). Nach Verwenden der Bonferroni-Korrektur sind diese Werte nicht mehr signifikant.

Tabelle 4.7: Prävalenz der angegebenen genetischen Parameter bei SLE-Patienten mit bzw. ohne MICB0104

Genetische Parameter	MICB0104 +/+, -/-	MICB0104 -/-	p-Wert
HLA-B7	57,8%	10,4%	0,000
HLA-B8	35,9%	54,7%	0,008
HLA-B13	3,1%	8,5%	0,107
HLA-B14	4,7%	8,5%	0,270
HLA-B15	7,8%	17,0%	0,045
HLA-B18	4,7%	17,0%	0,011
HLA-B27	3,1%	7,6%	0,143
HLA-B35	9,4%	9,4%	0,213
HLA-B37	1,6%	0,9%	0,472
HLA-B38	1,6%	2,8%	0,368
HLA-B39	4,7%	1,9%	0,208
HLA-B40	9,4%	16,04%	0,090
HLA-B41	1,6%	3,8%	0,285
HLA-B44	15,6%	10,4%	0,113
HLA-B45	0,0%	1,9%	0,387
HLA-B47	0,0%	0,9%	0,624
HLA-B49	4,7%	0,9%	0,132
HLA-B50	0,0%	0,9%	0,624
HLA-B51	4,7%	3,8%	0,288
HLA-B52	0,0%	3,8%	0,148
HLA-B55	3,1%	0,0%	0,140
HLA-B56	1,6%	0,0%	0,376
HLA-B57	0,0%	8,5%	0,012
MICA5.1 (++)	52,1%	29,9%	0,009
MICA5.1 (++)/+-)	85,4%	73,1%	0,054
NKG2D (G/G)	64,6%	64,2%	0,156
NKG2D (A/G)	31,3%	29,9%	0,160
NKG2D (A/A)	4,2%	6,0%	0,307

4.4 MICB0105 und SLE

Es wurde untersucht, ob es eine Korrelation zwischen den unterschiedlichen Laborparametern bzw. klinischen Parametern und MICB0105 gibt. Unter den laborchemischen Parametern war kein Wert mit MICB0105 assoziiert. Dagegen findet sich bei den klinischen Parametern eine schwache Assoziation von MICB0105 zu Neuropathien und einem ständiges Augenbrennen bei SLE-Patienten (Tabelle 4.8 und 4.9), die sich jedoch unter Berücksichtigung der Bonferroni-Korrektur als nicht signifikant darstellen.

Tabelle 4.8: Prävalenz der angegebenen laborchemischen Parameter bei SLE-Patienten mit bzw. ohne MICB0105

Laborchemische Parameter	MICB0105 +/+, +/-	MICB0105 -/-	p-Wert
ANA-Titer (>160)	66,7%	82,3%	0,076
S-Kreatinin (>70µmol/l)	85,8%	54,6%	0,196
Proteinurie (<150mg/dl)	66,7%	60,0%	0,206
dsDNA-AK Crithidia IF	9,1%	25,6%	0,166
Erythrozyturie	18,8%	9,4%	0,162
Rheumafaktor	21,4%	21,5%	0,268
Anti-Ro (SSA)	50,0%	46,8%	0,254
Anti-La (SSB)	10,0%	21,7%	0,257
U1-snRNP bzw. RNP	30,0%	12,2%	0,113
Anti-Sm	20,0%	6,7%	0,151
Anti-Jo1	0,0%	3,4%	0,724
Cardiolipin-AK IgM	13,3%	21,2%	0,236
Cardiolipin-AK IgG	7,1%	17,9%	0,219

Tabelle 4.9: Prävalenz der angegebenen klinischen Parameter bei SLE-Patienten mit bzw. ohne MICB0105

Klinische Parameter	MICB0105 +/+, +/-	MICB0105 -/-	p-Wert
Kumulative Thrombosen	9,1%	15,9%	0,202
Fehlgeburt	22,7%	19,3%	0,202
Sonnenallergie	59,1%	59,1%	0,185
Kumulative Aphthen	39,1%	25,8%	0,082
Arthritis	81,8%	81,5%	0,232
Myalgien	57,1%	50,8%	3,539
Epilepsie	8,7%	6,8%	0,297
Depression	18,2%	19,7%	0,229
Neuropathien	45,6%	31,3%	0,022
Psychose	8,7%	0,8%	0,054
Pleuritis	28,6%	25,6%	0,197
Endokarditis	13,6%	3,9%	0,075
Myo-/perikarditis	22,7%	24,2%	0,212
ständiges Augenbrennen	52,2%	34,3%	0,049
Konjunktivitis	22,7%	29,6%	0,171
ständige Mundtrockenheit .	59,1%	40,8%	0,052
Diffuser Haarausfall	50,0%	38,5%	0,110
Kreisrunder Haarausfall	9,1%	9,2%	0,306
Raynaud-Syndrom	54,6%	49,6%	0,166
Normale Schwangerschaft	47,4%	57,8%	0,137
Cutane Vaskulitis	15,0%	14,0%	0,260
Akrale Nekrosen	5,0%	2,4%	0,353
Diskoides Erythem	40,0%	41,4%	0,192
Schmetterlingserythem	70,0%	64,1%	0,179
Lymphadenopathie	10,5%	7,8%	0,288
Splenomegalie (Länge > 13cm)	11,1%	3,3%	0,143
Hämolytische Anämie	10,0%	7,8%	0,296
Autoimmunthrombozytopenie	5,3%	11,1%	0,275
Myositis	5,0%	8,5%	0,337
Pneumonitis	10,0%	3,1%	0,152
Lungenfibrose	10,0%	3,1%	0,150
Lupusnephritis	25,0%	20,6%	0,199

Ergebnisse

Bei der Untersuchung der Assoziation anderer genetischen Parameter mit MICB0105 fand sich, wie in Tabelle 4.10 dargestellt, seltener das Merkmal HLA-B8, aber dagegen häufiger die Merkmale HLA-B13 und HLA-B39. Nach Berücksichtigung der Bonferroni-Korrektur findet sich kein signifikanter Unterschied.

Tabelle 4.10: Prävalenz der angegebenen genetischen Parameter bei SLE-Patienten mit bzw. ohne MICB0105

Genetische Parameter	MICB0105 +/+, -/-	MICB0105 -/-	p-Wert
HLA-B7	26,5%	29,7%	0,159
HLA-B8	35,3%	51,4%	0,037
HLA-B13	14,7%	4,4%	0,035
HLA-B14	8,8%	4,4%	0,178
HLA-B15	5,9%	16,2%	0,072
HLA-B18	11,8%	9,6%	0,221
HLA-B27	11,8%	5,1%	0,110
HLA-B35	5,8%	11,0%	0,191
HLA-B37	0,0%	1,5%	0,639
HLA-B38	0,0%	2,9%	0,406
HLA-B39	8,8%	1,5%	0,016
HLA-B40	5,9%	15,4%	0,085
HLA-B41	8,8%	2,2%	0,080
HLA-B44	11,8%	12,5%	0,229
HLA-B45	0,0%	2,9%	0,406
HLA-B47	0,0%	0,7%	0,800
HLA-B49	0,0%	2,9%	0,410
HLA-B50	0,0%	0,7%	0,800
HLA-B51	2,9%	3,7%	0,399
HLA-B52	2,9%	1,5%	0,387
HLA-B55	0,0%	1,5%	0,639
HLA-B56	0,0%	0,7%	0,800
HLA-B57	2,9%	2,2%	0,415
MICA5.1 (++)	43,8%	37,6%	0,192
MICA5.1 (++/+)	68,8%	78,2%	0,167
NKG2D (G/G)	62,5%	63,4%	0,2177
NKG2D (A/G)	31,3%	29,7%	0,226
NKG2D (A/A)	6,3%	5,0%	0,405

4.3 Haplotypenbestimmung

Im letzten Schritt wurde die Kopplung von MICB0103 und MICB0104 mit HLA-B und MICA5.1 untersucht. Dabei sind die Merkmale HLA-B8 bzw. HLA-B7, MICA5.1 und MICB0103 bzw. MICB0104 berücksichtigt worden. Die Auswertung ist für MICB0103 in den Tabellen 4.11 und 4.12, für MICB0104 in den Tabellen 4.13 und 4.14 dargestellt. Im Bezug auf MICB0103 sind die Haplotypen HLA-B8+MICA5.1+MICB0103+, sowie HLA-B7-MICA5.1+MICB0103+ mit jeweils 37% am häufigsten vertreten. Bei MICB0104 treten die Haplotypen HLA-B8+MICA5.1-MICB0104+ mit 28% und HLA-B7-MICA5.1-MICB0104+ mit 38% am häufigsten auf.

Tabelle 4.11: Prävalenz der Kombinationen von MICB0103, HLA-B8 und MICA5.1

Haplotyp	HLA-B8	MICA5.1	MICB0103	Anzahl n
A	+	+	+	32 (37%)
B	-	-	-	8 (9%)
C	+	-	-	0 (0%)
D	+	+	-	0 (0%)
E	-	+	+	14 (17%)
F	-	-	+	16 (18%)
G	+	-	+	8 (9%)
H	-	+	-	8 (9%)
total				86

Tabelle 4.12: Prävalenz der Kombinationen von MICB0103, HLA-B7 und MICA5.1

Haplotyp	HLA-B7	MICA5.1	MICB0103	Anzahl n
A	+	+	+	14 (17%)
B	-	-	-	7 (8%)
C	+	-	-	1 (1%)
D	+	+	-	0 (0%)
E	-	+	+	32 (37%)
F	-	-	+	12 (14%)
G	+	-	+	12 (14%)
H	-	+	-	8 (9%)
total				68

Tabelle 4.13: Prävalenz der Kombinationen von MICB0104, HLA-B8 und MICA5.1

Haplotyp	HLA-B8	MICA5.1	MICB0104	Anzahl n
A	+	+	+	16 (18%)
B	-	-	-	10 (12%)
C	+	-	-	0 (0%)
D	+	+	-	0 (0%)
E	-	+	+	18 (21%)
F	-	-	+	12 (14%)
G	+	-	+	24 (28%)
H	-	+	-	6 (7%)
total				86

Tabelle 4.14: Prävalenz der Kombinationen von MICB0104, HLA-B7 und MICA5.1

Haplotyp	HLA-B7	MICA5.1	MICB0104	Anzahl n
A	+	+	+	22 (26%)
B	-	-	-	9 (10%)
C	+	-	-	0 (0%)
D	+	+	-	1 (1%)
E	-	+	+	13 (15%)
F	-	-	+	33 (38%)
G	+	-	+	4 (5%)
H	-	+	-	4 (5%)
total				86

5. Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass, neben einer infektiösen Ursache, genetische Faktoren in der Pathogenese des SLE eine große Rolle spielen. Es wurden bereits mehrere Chromosomenregionen identifiziert, in denen Risikogene des SLE lokalisiert sind (Tabelle 2.2). Dazu zählt unter anderem die Region 6p21.31, in der das in dieser Arbeit untersuchte MICB Gen lokalisiert ist [75, 80-84].

Das MIC Molekül ist ein hochpolymorphes Oberflächenantigen, das in Stresssituationen von Darm-Epithelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten exprimiert wird [93-95, 98]. Die Expression von MICA oder MICB ist Hitzeschock-induziert oder Folge von Virusinfekten. Die beiden MIC-Moleküle werden als zelluläre Gefahrensignale gesehen, da sie auf epithelialen Tumoren sowie virusinfizierten Zellen gefunden wurden [100, 105, 107].

MICA und MICB werden über den weit verbreiteten aktivierenden Immunorezeptor NKG2D von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten, $CD8^+\alpha\beta$ T-Lymphozyten und NK-Zellen erkannt. Beide wirken somit als ein costimulierendes Signal zur Zytokinproduktion, zellulären Proliferation und Aktivierung von NK-Zellen, Makrophagen, $\gamma\delta$ T-Lymphozyten und $CD8^+\alpha\beta$ T-Lymphozyten [111, 112]. Im Gegensatz zu MHC-Klasse I Molekülen bilden MICA und MICB keinen Komplex mit $\beta 2$ -Mikroglobulin oder Antigenpeptiden.

Eine CMV-Infektion führt zu einer Expression von MIC-Molekülen auf der Zelloberfläche von Fibroblasten und Endothelzellen. Ferner konnte gezeigt werden; dass die Bindung von NKG2D an MIC die TZR-abhängige Zytolyse der CMV-infizierten Zelle erhöht, sowie zu einer verstärkten Zytokin-Antwort durch CMV-spezifische $CD28^-CD8^+\alpha\beta$ T-Lymphozyten führt [97].

Als ein auslösender Mechanismus des SLE wird eine virale oder bakterielle Infektion diskutiert. Besonders eine Infektion mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) oder dem humanen Cytomegalievirus (HCMV) scheint ein möglicher Auslöser für die Entstehung und Exazerbation des SLE zu sein [64, 130-132]. So konnte bei SLE-Patienten ein im Vergleich zu Kontrollen erhöhter Titer an anti-EBV-VCA-Antikörpern [64], sowie eine vermehrte Anzahl von EBV-infizierten Zellen im Blut nachgewiesen werden. Dies wird mit dem Auftreten von SLE-typischen Symptomen assoziiert [65]. Durch eine Infektion mit EBV kommt es zu einer Produktion des Virusproteins EBNA-1 (engl.: Epstein-Barr virus nuclear antigen-1). Einige Epitope des EBNA-1 sind sehr homolog mit Teilen des Ro- und Sm-Proteins im humanen Zellkern. Daher sind die mit dem SLE assoziierten

Autoantikörper gegen Ro und Sm kreuzreaktiv mit EBNA-1 [133]. Eine Studie belegt, dass SLE-Patienten in einem signifikant jüngerem Alter als gesunde Kontrollen an EBV-Infektionen erkranken [64]. Diese Hypothese wird durch Beobachtungen im Mausmodell unterstützt. Hierbei konnten an kongenen Mäusen die ersten Risikogene identifiziert werden. Es handelt sich hierbei unter anderem um einen Polymorphismus des Complementrezeptors 2 [134]. Der humane Complementrezeptor 2 ist ein Rezeptor für das Membranglykoprotein pg350/220 des Epstein-Barr-Virus [132].

In einer weiteren Studie wurde darüber hinaus festgestellt, dass SLE-assoziierte Autoantikörper, wie ANA (antinuclear antibodies), anti-dsDNA, anti-Ro, anti-La und anti-Sm typischerweise viele Jahre vor einer klinischen Manifestation des SLE vorhanden sind [135].

Eine Aktivierung und Inhibition von NK-Zellen, Makrophagen und T-Lymphozyten ist ein bedeutsamer Vorgang zur Kontrolle der Immunantwort und damit ein entscheidender Mechanismus in der Entstehung und Exazerbation des SLE. Neben der spezifischen Antigen-Erkennung, aus der eine Aktivierung der erkennenden Zelle folgt, benötigt die T-Zelle costimulierende Signale, um eine Immunantwort auszulösen. Ein costimulierendes System betrifft NKG2D und MICB. NKG2D trägt mit seinem Liganden MICB über die Signaluntereinheit DAP10 zur Aktivierung der Zelle bei. Während NKG2D jedoch generell von den meisten T- und NK-Zellen exprimiert wird, ist die Ausbildung von MICB durch Stress induzierbar. DAP10 wird auf Chromosom 19q13 kodiert. Diese Region wurde bei Kopplungsanalysen als eine Risikoregion des SLE identifiziert. NKG2D und wahrscheinlich MICB fungieren sowohl als regulatorische Rezeptoren auf T-Zellen als auch als zytotoxische und regulierende Rezeptoren auf NK-Zellen und Makrophagen, aufgrund der Flexibilität in der Bindung einer entsprechenden Signaluntereinheit.

Der Wirkmechanismus von MICB konnte bislang nicht vollständig entschlüsselt werden. Mehrere sich nicht ausschließende Modelle stehen zu Diskussion. Eine Möglichkeit ist eine Kompensation der durch CMV-Genprodukte eingeschränkten Entwicklung und Expression der MHC-Klasse I Moleküle. Durch eine verminderte Expression der MHC-Klasse I Moleküle folgt eine Reduktion der zytotoxischen T-Zellabwehr. Expression von MICB und seine Bindung an NKG2D auf den CD8⁺αβ T-Zellen bewirkt jedoch hier eine erhöhte TZR-abhängigen Zytolyse der CMV-infizierten Zielzelle [97].

NKG2D hat neben MICA und MICB noch ULBPs (engl.: UL-16 binding proteins) als Bindungspartner. ULBPs sind atypische MHC Klasse I ähnliche Moleküle, die über Glykophosphatidylinositol in der Zelloberfläche verankert sind. Insgesamt werden sechs verschiedene ULBP-Proteine synthetisiert, davon sind allerdings nur ULBP-1, ULBP-2 und ULBP-3 in der Lage, an NKG2D zu binden, so dass es wie bei den MIC Molekülen zu einer Aktivierung der NK-Zelle kommt.

Es gibt mehrere Escapemechanismen, mit denen CMV der Immunabwehr entkommt. Einerseits kann sich UL-16, ein vom humanen Cytomegalievirus kodiertes Protein, an ULBP-1, ULBP-2 und MICB binden. Ferner resultiert die Expression von UL-16 in einem Verlust der auf Zelloberflächen gebundenen MICB-Moleküle und einer intrazellulären Retention der NKG2D-Liganden. Dies führt zu einer verminderten Aktivität der NK-Zellen und Costimulation der CD8⁺γδ-T-Zellen. Dadurch vermag das Cytomegalie-Virus bzw. die CMV-infizierte Zelle der Immunabwehr zu entgehen [136, 137]. Andererseits kann durch die viralen Glykoproteine US2, US3, US6 und US11 die MHC Klasse I-Expression der infizierten Zelle reduziert werden. Dies verhindert die Erkennung der CMV-Antigene durch T-Zellen. Da eine MHC Klasse I-Reduktion NK-Zellen aktiviert, kodiert das Virus auch die Proteine UL-18 und UL-40, die als Liganden für die Rezeptoren LIR-1 und CD94/NKG2A arbeiten und NK-Zellen inhibieren.

Eine weitere Funktion von MICB-Molekülen ist die Tumorabwehr. MICA- und MICB-Moleküle werden von epithelialen und hämatopoetischen Tumoren exprimiert, nicht aber von gesundem Gewebe [96, 138]. Ferner haben Studien im Mausmodell gezeigt, dass die Expression der NKG2D-Liganden durch Tumorzellen das Immunsystem stimuliert, und dass die Abstoßung der Tumorzellen, die NKG2D-Liganden exprimieren, durch NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen in vivo vermittelt werden. MICB dient somit als ein Tumor-assoziiertes Antigen, dessen Erkennung durch das Immunsystem zur Lyse der Tumorzelle führt [139-142]. Es gibt Hinweise darauf, dass Tumorzellen Mechanismen entwickelt haben, um dieser NKG2D-vermittelten Immunüberwachung zu entkommen. Neben einer verminderten Expression von NKG2D durch Einwirkung von TGF-β scheinen die Tumorzellen die Oberflächenexpression der NKG2D-Liganden mittels eines proteolytischen Abwerfens der MICA-Moleküle von ihrer Zelloberfläche zu reduzieren [143, 144]. Zusätzlich verringern die Tumorzellen die Dichte der NKG2D-Liganden auf ihrer Zelloberfläche, wodurch es zu einer beeinträchtigten Lyse der Tumorzelle durch CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen kommt [145]. Auch konnte gezeigt werden, dass die Serumkonzentration

von löslichem MICA (sMICA), das von Tumorzellen abgeworfen („shedded“) wird, bei Tumorerkrankungen im Vergleich zu gesunden Kontrollen und Patienten mit benignen Erkrankungen signifikant erhöht ist und mit dem Tumorstadium sowie der Metastasierung korreliert [146]. Es wurden nur leicht erhöhte sMICB-Werte bei Patienten mit unterschiedlichen Malignomen im Vergleich zu gesunden Kontrollen ermittelt. Aber auch hier korrelieren die erhöhten sMICB-Werte in den späteren Stadien der Tumorprogression signifikant mit dem Grad der Erkrankung und der Metastasierung [147]. Eine aktuelle Studie zeigt, dass sMIC-Moleküle die NKG2D-vermittelte Immunität gegen Pankreas-Karzinom durch eine direkte Reduktion von $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten und NK-Zellen beeinträchtigen. Die erhöhten sMIC-Werte korrelieren dabei mit dem Tumor-Stadium und seiner Differenzierung [144].

An den Anfang unserer Untersuchungen haben wir die Beobachtung gestellt, dass MICB-Allele mit anderen Autoimmunerkrankungen assoziiert sind. In einer Studie konnte bei Patienten mit Zöliakie (engl.: celiac disease, CD) eine starke Assoziation mit dem MICB0106-Allel nachgewiesen werden. Zöliakie ist eine chronisch-inflammatorische Erkrankung, die durch eine Intoleranz gegenüber Gliadin ausgelöst wird. Dies führt zu einer Zottenatrophie im Dünndarm und damit einer eingeschränkten Resorptionsfähigkeit. Die häufigste HLA-Konstellation von Zöliakiepatienten ist entweder HLA-DR3 oder HLA-DQ2. In einer früheren Studie konnte bereits gezeigt werden, dass MICA5.1 (MICA*008) unabhängig von anderen HLA-Genen mit Zöliakie assoziiert ist. Es konnte nun ebenfalls nachgewiesen werden, dass MICB0106 im Kopplungsgleichgewicht mit DQ2 und MICA5.1 bei CD-Patienten steht und somit eine mögliche Rolle in der Pathogenese der Zöliakie spielt [148]. In einer aktuellen Studie konnte ein Assoziation zwischen MICB*004 und der Rheumatoiden Arthritis dokumentiert werden [149]. Die Rheumatoide Arthritis ist eine chronische Erkrankung die durch eine inflammatorische Synovitis gekennzeichnet ist, welche zu einer Destruktion der Gelenke führt.

Des Weiteren besteht in der chinesischen Bevölkerung eine Assoziation von MICB und MICA5.1 zu Colitis ulcerosa [151, 152], sowie eine Assoziation von MICA und Colitis ulcerosa in der japanischen Population [129]. Colitis ulcerosa (engl.: ulcerative colitis) und Morbus Crohn (engl.: Crohn's disease) gehören zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (engl.: inflammatory bowel disease, IBD). Beide Erkrankungen sind durch ein gesteigertes lymphozytäres, plasmazelluläres und granulozytäres Infiltrat der

Darmschleimhaut gekennzeichnet und sind per definitionem nicht durch einen pathogenen Erreger verursacht, sondern durch eine fehlregulierte und pathologisch gesteigerte Immunreaktion. In der kaukasischen Bevölkerung konnte jedoch keine Assoziation von Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn zu MICB oder MICA nachgewiesen werden [112, 152]. Dies könnte unter anderem darin begründet sein, dass das Verteilungsspektrum der einzelnen MICB-Allele in der asiatischen Bevölkerung ein anderes ist, als in der kaukasischen Population. So könnten die erhobenen Assoziationen zwischen MICB und Colitis ulcerosa auf MICB-Allelen basieren, die in der kaukasischen Bevölkerung nicht identifiziert wurden (Tabelle 2.3).

Es wurden bislang 17 MICB-Allele identifiziert, davon sechs in der kaukasischen Bevölkerung, zu denen auch die drei in dieser Arbeit untersuchten MICB0103, MICB0104 und MICB0105-Allele gehören. Unsere Arbeitsgruppe hat sich mit der Assoziation dieser drei verschiedenen MICB-Allelen bei SLE Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung beschäftigt.

Das MICB0103 Allel ($p = 0,003$) sowie das MICB0104 Allel ($p = 0,008$) treten in den hier vorgestellten Ergebnissen bei SLE-Patienten signifikant gehäuft bzw. seltener auf. Bei unseren Untersuchungen haben wir keine Hinweise auf statistisch signifikante Unterschiede in der Allelverteilung von MICB0105, im Vergleich von SLE-Patienten und gesunden Kontrollen ($p = 0,082$) gefunden.

In Kristallstrukturanalysen zeigte sich bereits, dass die Aminosäure-Mutationen im MICB0103 und MICB0104 im Gegensatz zu MICB0105 räumlich nahe an der NKG2D-Bindungsstelle liegen [111]. Es ist vorstellbar, dass die anhand unserer Untersuchungen bei SLE-Patienten vermehrt vorkommenden MICB0103 bzw. selteneren MICB0104-Allele die NKG2D-Interaktion beeinflussen und somit die NKG2D-vermittelte Zellantwort so verändern, dass es zu einer veränderten NKG2D-vermittelten Zelllyse kommt. Dies könnte zu autoimmunologischen Schäden und zur Entstehung der SLE-Erkrankung führen. Auch die Tatsache, dass der Aminosäureaustausch in MICB0105 weiter von der NKG2D-Bindungsstelle an MICB entfernt liegt und diese damit nicht zu beeinflussen scheint, unterstützt diese Hypothese, da in unseren Ergebnissen das MICB0105-Allel bei SLE-Patienten nicht vermehrt vorkommt. Kristallstrukturanalysen zeigen zusätzlich, dass ein Aminosäureaustausch in Position 52 (D/N52) im MICB0104-Molekül, und an Position 57 (K/E57) im MICB0103-Molekül zu Ladungsänderungen und damit zu einer wahrscheinlichen

Beeinflussung der Affinität zum NKG2D-Molekül führen [111]. Diese Assoziation von MICB-Allelen mit der SLE-Erkrankung ist mit der Hypothese einer Induzierung des SLE durch latente Virusinfektionen vereinbar. Durch die Reduktion der Virusabwehr wäre eine wiederholte Virusreplikation, wie sie bereits für EBV beim SLE-Schub nachgewiesen wurde, möglich.

Bei unseren Untersuchungen haben wir bei einer großen Zahl an klinischen, laborchemischen und genetischen Parametern eine schwache Assoziation zu den verschiedenen MICB-Allelen gefunden. Diese verlieren jedoch nach Bonferroni-Korrektur die Signifikanz (siehe Abschnitt 4). Um den Bedeutungsgrad der beschriebenen Beobachtungen adäquat einzuschätzen, sollte berücksichtigt werden, dass die Anzahl der 229 SLE-Patienten und 165 Kontrollen relativ gering ist und dadurch ein direkter Vergleich weniger aussagekräftig ist. Verteilungsunterschiede könnten somit durchaus auch zufallsbedingt sein. Der Bonferroni-Korrektur zufolge sollten die erhobenen schwachen Signifikanzen deshalb als zufallsbedingt angesehen werden.

Der geringe Einfluss der untersuchten MICB-Allele auf spezifische klinische, laborchemische und genetische Merkmale der SLE-Erkrankung könnte ebenfalls dadurch begründet sein, dass es trotz der möglichen Beeinflussung der NKG2D-Funktion nur zu einer generell starken Aktivierung des Immunsystems kommt und sich dies somit nicht auf einzelne Symptome des SLE auswirkt.

Wir haben jedoch eine starke Assoziation zwischen dem MICB0103 Allel und HLA-B8 bei SLE Patienten ermittelt ($p = 5,6 \cdot 10^{-7}$). MICB0103 ist folglich mit HLA-B8 weit stärker assoziiert als mit dem SLE ($p = 0,003$). Insofern kann in dieser Studie nicht eindeutig gefolgert werden, dass MICB0103 ein Risikogen des SLE an sich ist. MICB0103 kann durchaus auch nur mit dem eigentlichen, noch unbekanntem Risikogen auf dem Haplotypen HLA-B8 – DR3 im Kopplungsungleichgewicht stehen. Um im Rahmen einer Studie ein solches Risikogen zu identifizieren ist jedoch eine weitaus größere Kohorte nötig. Aus diesem Grund sind bislang nur Spekulationen über das Risikogen des SLE in dem betreffenden Chromosomenabschnitt möglich. In jüngster Zeit wurde eine Studie zur Identifizierung des Risikogen der Sarkoidose durchgeführt. Dabei wurde eine Analyse auf Chromosom 6p21 an nicht weniger als 947 unabhängigen Sarkoidose-Patienten erhoben mit dem Ergebnis, dass das BTNL2-Gen (engl.: butyrophilin-like 2) mit der Erkrankung unabhängig vom Haplotypen HLA-DRB1 assoziiert ist [153].

Bei SLE-Patienten kommt es in 70 - 100% der Fälle zu einer Nierenbeteiligung. Die Lupus-Nephritis ist durch eine mesangiale Proliferation und Ablagerungen von Immunglobulinen und Komplement-Faktoren innerhalb des glomerulären Mesangiums gekennzeichnet [154]. Immunkomplexe können die glomerulären Strukturen schädigen, indem sie verschiedene zirkulierende Entzündungszellen anziehen oder indem sie ansässige Glomerulumzellen zur Freisetzung von vasoaktiven Substanzen, Zytokinen und Komplementfaktoren aktivieren. Großen Einfluss in der Pathogenese der Lupus-Nephritis haben die Komplementfaktoren C5b-9. Sie sind in der Membran der glomerulären Zellen vorhanden, wodurch sie deren Aktivierung verursachen und somit diese angesiedelten normalen Zellen in Effektor-Entzündungszellen umwandeln [155]. Ein weiterer wichtiger Mechanismus betrifft zusätzlich den Komplementfaktor C1q, der bei der Clearance von Immunkomplexen und apoptotischen Zellen eine wichtige Rolle spielt. Dieser Faktor ist bei Patienten mit Lupus-Nephritis im Serum aufgrund des Vorhandenseins von Autoantikörpern gegen C1q erniedrigt [156].

Bei einer Lupus-Nephritis sind typischerweise Antikörper gegen dsDNA und Sm vorhanden. Des Weiteren können multiple Autoantikörper gegen das ribosomale P protein, LPS (lipoprotein lipase), Komplementfaktoren wie C1q und gegen andere Kernbestandteile der Zelle gerichtet sein [157].

In dieser Arbeit ist eine negative Assoziation mittels Fishers exaktem Test zwischen dem MICB0104-Allel und einem pathologisch erhöhtem Kreatinin ($p = 0,005$), dem Vorhandensein von dsDNA-Antikörpern ($p = 0,019$) und Cardiolipin-Antikörpern IgM ($p = 0,017$) festgestellt worden. Bringt man diese und zuvor beschriebene Beobachtungen zusammen, kann man die These aufstellen, dass SLE-Patienten mit dem MICB0104-Allel seltener an einer Lupus-Nephritis erkranken, bzw. Patienten, denen dieses Allel fehlt, häufiger an einer Lupus-Nephritis erkranken.

Ob und inwieweit die mittels Fishers exaktem Test assoziierten MICB-Allele jedoch tatsächlich für die Krankheitsentwicklung und die Entstehung der unterschiedlichen krankheitsassoziierten Symptome ursächlich sind oder ob sie Teil einer Kette von Ereignissen sind, muss weiter überprüft werden: Einerseits sind diese Werte nach der Bonferroni-Korrektur nicht mehr signifikant. Andererseits treten die in dieser Analyse rekonstruierten Haplotypen bei gesunden sowie bei erkrankten Personen auf. Dies würde bedeuten, dass diese Allelkombinationen der Gene in Zusammenhang mit MICB für die Erkrankung prädisponierend sind, jedoch nicht den eigentlichen Auslöser darstellen.

Diskussion

Ferner wurde in dieser Analyse des MICB-Allels keine komplette Sequenzierung vorgenommen. Wir haben uns bewusst auf die in der kaukasischen Bevölkerung als mit Autoimmunerkrankungen assoziierte Gene MICB0103, MICB0104 und MICB0105 beschränkt.

6. Zusammenfassung

Der SLE gehört zu den chronisch entzündlichen Autoimmunerkrankungen. Neben verschiedenen Umwelt- und hormonellen Faktoren spielen Virusinfektionen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Exazerbation des SLE. Bei an SLE erkrankten Patienten konnte eine hohe Konzentration an EBV-infizierten B-Lymphozyten nachgewiesen werden. Infektionen mit dem Epstein-Barr Virus oder dem humanen Cytomegalievirus, die im Körper persistieren und bei entsprechender Immunitätslage exazerbieren können, führen zu einem Lupus-ähnlichen Krankheitsbild und induzieren ebenfalls die Bildung von Antikörpern gegen Ro, Sm und dsDNA. An genomweiten Kopplungsanalysen konnte außerdem gezeigt werden, dass zusätzlich genetische Prädispositionen entscheidend für die Krankheitsentstehung sind: Es wurden verschiedene Chromosomenregionen innerhalb des menschlichen Genoms identifiziert, die mit SLE assoziiert sind. Weiterhin wurden die Gene in diesen Regionen auf gehäuftes Auftreten bestimmter Allele bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen untersucht, da hierdurch ein möglicher Einfluss von genetischen Veränderungen auf die Erkrankung bestehen könnte.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob MICB-Allele mit dem SLE bzw. seinen Organmanifestationen assoziiert sind. Es wurden drei Polymorphismen des MICB Moleküls untersucht. Es handelt sich hierbei um die MICB-Allele MICB0103, MICB0104 und MICB0105. MICB-Allele sind Glykoproteine, die auf Chromosom 6 (6p21.31) innerhalb des HLA-Komplexes codiert sind, und sich als Antigene auf der Oberfläche von Darm-Epithelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten befinden. Sie sind Liganden für den Immunrezeptor NKG2D, sind an der Abwehr von Viren und Tumoren beteiligt und mit einigen Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel Zöliakie, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, assoziiert.

Es wurden insgesamt 229 Patienten mit SLE sowie 165 gesunde Blutspender als Kontrollgruppe untersucht. Die SLE Patienten wurden zusätzlich nach den Merkmalen HLA-B8 und HLA-B7 charakterisiert.

Diese Arbeit zeigt ein, im Vergleich zu gesunden Kontrollen, signifikant häufigeres Auftreten des MICB0103- und selteneres Auftreten des MICB0104 Allels bei SLE-Patienten. Dieses Ergebnis weist auf eine Relevanz des MICB0103 Allels und des MICB0104 Allels in der Ätiopathogenese des SLE hin.

Ferner besteht ein starkes Kopplungsungleichgewicht zwischen dem MICB0103 Allel und HLA-B8.

Keiner der untersuchten klinischen und laborchemischen Parameter der Erkrankung korrelierte nach der Berücksichtigung eines korrigierten Signifikanzniveaus nach Bonferroni mit einem der Allele.

Mehrere Studien zeigen, dass NKG2D eine Schlüsselrolle in der Kontrolle und Bekämpfung von latenten Virusinfektionen hat, die als Entstehungsmechanismen des SLE diskutiert werden. Ob MICB, als Ligand des NKG2D-Rezeptors, direkt mit dem SLE assoziiert ist, lässt sich in dieser Arbeit nicht eindeutig klären. Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie ist MICB0103 vermutlich nicht das gesuchte Risikogen, sondern steht im Kopplungsungleichgewicht zum SLE-Risikohaplotypen HLA-B8 – DR3.

7. Schriftenverzeichnis

7.1 Abkürzungsverzeichnis

β2M.....	β-2 Mikroglobulin
Abb.....	Abbildung
ACR.....	American College of Rheumatology
ANA.....	Antinukleäre Antikörper
APC.....	Antigenpräsentierende Zelle
AS.....	Aminosäure
Bp.....	Basenpaare
BTNL2.....	engl.: butyrophilin-like 2
Bzw.....	beziehungsweise
C1q, C2, C3, C4.....	Komplement Komponenten
CD.....	Cluster of differentiation
CD.....	Zöliakie, engl.: celiac disease
CMV.....	Cytomegalievirus
Cyt.....	cytoplasmatisch
DAP.....	DNAX-Activation Protein
DNA.....	Desoxyribonucleinsäure
dNTP.....	Desoxyribonukleosintriphosphat
dsDNA.....	Doppelstrang DNA
EBNA-1.....	Epstein-Barr Virus nuclear Antigen 1
EBV.....	Epstein-Barr Virus
EDTA.....	Ethylendiamintetraacetat
ENA.....	Extrahierbare nukleäre Antigene
ER.....	Endoplasmatische Retikulum
H ₂ O.....	Wasser
HCMV.....	human Cytomegalievirus
HLA.....	human leucocyte Antigen
IBD.....	Inflammatory bowel disease
IFN _γ	Interferon γ
Ig.....	Immunglobulin

Schriftenverzeichnis

Il-2.....	Interleukin 2
Kb.....	Kilobase
kDA.....	Kilodalton
La.....	Lance Antigen (Patientenname)
LOD.....	$Zlr^2/2\ln 10$
LPS.....	Lipoproteinlipase
Mb.....	Megabasenpaare
MHC.....	major histocompatibility complex
MIC.....	MHC-class I chain-related gene
mRNA.....	messenger Ribonukleinsäure
NK.....	Natürliche Killerzelle
NKG2D.....	natural killer cell receptor
NOD.....	Non-obese diabetic
ORF.....	open reading frame
PCR.....	Polymerase chain reaction
PI3-Kinase.....	Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PRL.....	Prolaktin
Ro.....	Robert Antigen (Patientenname)
SLE.....	Systemischer Lupus Erythematoses
Sm.....	Smith Antigen (Patientenname)
sMIC.....	soluble MIC
S.....	Signalsequenz
SSA.....	soluble-substance A nuclear antigen
SSB.....	soluble-substance B nuclear antigen
STR.....	Short tandem repeats
TAE.....	Tris-Acetat- EDTA Puffer
TCR.....	T-Zelle Rezeptor
TM.....	Transmembrandomäne
TNF.....	Tumor Nekrose Faktor
ULBP.....	UL-16 binding Protein
UV.....	Ultraviolett

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1	Darstellung des humanen MHC auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p21.31) und seine Unterteilung in die Klassen I, II, III [88].	15
Abbildung 2.2:	MIC Gene und Pseudogene entlang des MHC Klasse I Komplexes [107].	16
Abbildung 2.3:	Schematische Darstellung des MICB Gens.	17
Abbildung 2.4:	Sequenz der MICA und MICB Allele [111].	18
Abbildung 3.1:	Prinzip der Polymerase Kettenreaktion (PCR).	29
Abbildung 3.2:	Fishers exakter Test.	32
Abbildung 4.1:	Gelelektrophorese.	33
Abbildung 4.2:	Verteilung der MICB Allele bei SLE-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen mit Angabe des p-Wertes.	34

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Klassifikationskriterien der SLE-Erkrankung des American College of Rheumatology von 1982, aktualisiert 1997 [5, 6].	3
Tabelle 2.2	Ergebnisse der Genomanalyse zur Identifikation von Risiko-regionen des SLE [79], modifiziert.	10
Tabelle 2.3:	MICB Allel Bezeichnung nach der Oxford Nomenklatur [117] modifiziert.	20
Tabelle 3.1:	Verwendete Oligonukleotide.	25
Tabelle 3.2:	Bei den Patienten erfasste klinische Parameter.	26
Tabelle 3.3:	Bei den Patienten erfasste Laborparameter.	26
Tabelle 3.4:	Vierfelder-Tafel.	32

Tabelle 4.1	Verteilung der Genotypen des MICB Polymorphismus bei SLE Patienten und der Kontrollgruppe.....	34
Tabelle 4.2:	Prävalenz der angegebenen laborchemischen Parameter bei SLE-Patienten mit bzw. ohne MICB0103.....	35
Tabelle 4.3:	Prävalenz der angegebenen klinischen Parameter bei SLE-Patienten mit bzw. ohne MICB0103.....	36
Tabelle 4.4:	Prävalenz der angegebenen genetischen Parameter bei SLE-Patienten mit bzw. ohne MICB0103.....	37
Tabelle 4.5:	Prävalenz der angegebenen laborchemischen Parameter bei SLE-Patienten mit bzw. ohne MICB0104.....	38
Tabelle 4.6:	Prävalenz der angegebenen klinischen Parameter bei SLE-Patienten mit bzw. ohne MICB0104.....	39
Tabelle 4.7:	Prävalenz der angegebenen genetischen Parameter bei SLE-Patienten mit bzw. ohne MICB0104.....	40
Tabelle 4.8:	Prävalenz der angegebenen laborchemischen Parameter bei SLE-Patienten mit bzw. ohne MICB0105.....	41
Tabelle 4.9:	Prävalenz der angegebenen klinischen Parameter bei SLE-Patienten mit bzw. ohne MICB0105.....	42
Tabelle 4.10:	Prävalenz der angegebenen genetischen Parameter bei SLE-Patienten mit bzw. ohne MICB0105.....	43
Tabelle 4.11:	Prävalenz der Kombinationen von MICB0103, HLA-B8 und MICA5.1.....	44
Tabelle 4.12:	Prävalenz der Kombinationen von MICB0103, HLA-B7 und MICA5.1.....	44
Tabelle 4.13:	Prävalenz der Kombinationen von MICB0104, HLA-B8 und MICA5.1.....	45
Tabelle 4.14:	Prävalenz der Kombinationen von MICB0104, HLA-B7 und MICA5.1.....	45

8. Literaturverzeichnis

1. Mills JA: Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 1994;330(26):1871-1879.
2. Pistiner M, Wallace DJ, Nessim S, Metzger AL, Klinenberg JR: Lupus erythematosus in the 1980s: a survey of 570 patients. *Semin Arthritis Rheum* 1991;21(1):55-64.
3. Iverson GL: Psychopathology associated with systemic lupus erythematosus: a methodological review. *Semin Arthritis Rheum* 1993;22(4):242-251.
4. Baldwin DS, Gluck MC, Lowenstein J, Gallo GR: Lupus nephritis. Clinical course as related to morphologic forms and their transitions. *Am J Med* 1977;62(1):12-30.
5. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25(11):1271-1277.
6. Hochberg MC: Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40(9):1725.
7. Manger K, Manger B, Repp R, Geisselbrecht M, Geiger A, Pfahlberg A, Harrer T, Kalden JR: Definition of risk factors for death, end stage renal disease, and thromboembolic events in a monocentric cohort of 338 patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2002;61(12):1065-1070.
8. Fessel WJ: Systemic lupus erythematosus in the community. Incidence, prevalence, outcome, and first symptoms; the high prevalence in black women. *Arch Intern Med* 1974;134(6):1027-1035.

9. Jacobsen S, Petersen J, Ullman S, Junker P, Voss A, Rasmussen JM, Tarp U, Poulsen LH, van Overeem HG, Skaarup B, Hansen TM, Podenphant J, Halberg P: Mortality and causes of death of 513 Danish patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 1999;28(2):75-80.
10. Hellmann DB, Petri M, Whiting-O'Keefe Q: Fatal infections in systemic lupus erythematosus: the role of opportunistic organisms. *Medicine (Baltimore)* 1987;66(5):341-348.
11. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, Mejia JC, Aydintug AO, Chwalinska-Sadowska H, de Ramon E, Fernandez-Nebro A, Galeazzi M, Valen M, Mathieu A, Houssiau F, Caro N, Alba P, Ramos-Casals M, Ingelmo M, Hughes GR: Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore)* 2003;82(5):299-308.
12. Hochberg MC: The incidence of systemic lupus erythematosus in Baltimore, Maryland, 1970-1977. *Arthritis Rheum* 1985;28(1):80-86.
13. Jonsson H, Nived O, Sturfelt G, Silman A: Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a defined population using multiple sources of retrieval. *Br J Rheumatol* 1990;29(3):185-188.
14. Hopkinson ND, Doherty M, Powell RJ: The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Nottingham, UK, 1989-1990. *Br J Rheumatol* 1993;32(2):110-115.
15. Johnson AE, Gordon C, Palmer RG, Bacon PA: The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. *Arthritis Rheum* 1995;38(4):551-558.
16. McCarty DJ, Manzi S, Medsger TA, Jr., Ramsey-Goldman R, LaPorte RE, Kwoh CK: Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum* 1995;38(9):1260-1270.

17. Samanta A, Roy S, Feehally J, Symmons DP: The prevalence of diagnosed systemic lupus erythematosus in whites and Indian Asian immigrants in Leicester city, UK. *Br J Rheumatol* 1992;31(10):679-682.
18. Mok CC, Lau CS: Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 2003;56(7):481-490.
19. Baumann U, Chouchakova N, Gewecke B, Kohl J, Carroll MC, Schmidt RE, Gessner JE: Distinct tissue site-specific requirements of mast cells and complement components C3/C5a receptor in IgG immune complex-induced injury of skin and lung. *J Immunol* 2001;167(2):1022-1027.
20. Steinberg AD, Krieg AM, Gourley MF, Klinman DM: Theoretical and experimental approaches to generalized autoimmunity. *Immunol Rev* 1990;118:129-163.
21. Young RA: Stress proteins and immunology. *Annu Rev Immunol* 1990;8:401-420.
22. Drake CG, Kotzin BL: Superantigens: biology, immunology, and potential role in disease. *J Clin Immunol* 1992;12(3):149-162.
23. Bakke AC, Kirkland PA, Kitridou RC, Quismorio FP, Jr., Rea T, Ehresmann GR, Horwitz DA: T lymphocyte subsets in systemic lupus erythematosus. Correlations with corticosteroid therapy and disease activity. *Arthritis Rheum* 1983;26(6):745-750.
24. Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR: Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998;41(7):1241-1250.
25. Walport MJ, Davies KA, Botto M: C1q and systemic lupus erythematosus. *Immunobiology* 1998;199(2):265-285.

26. Korb LC, Ahearn JM: C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J Immunol* 1997;158(10):4525-4528.
27. Mir A, Porteu F, Levy M, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L: C3b receptor (CR1) on phagocytic cells from SLE patients: analysis of the defect and familial study. *Clin Exp Immunol* 1988;73(3):461-466.
28. Kiss E, Csipo I, Cohen JH, Reveil B, Kawai M, Szegedi G: CR1 density polymorphism and expression on erythrocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 1996;25(1):53-58.
29. Hasan T, Nyberg F, Stephansson E, Puska P, Hakkinen M, Sarna S, Ros AM, Ranki A: Photosensitivity in lupus erythematosus, UV photoprovocation results compared with history of photosensitivity and clinical findings. *Br J Dermatol* 1997;136(5):699-705.
30. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, Domenech I, Aydintug AO, Jedryka-Goral A, de Ramon E, .: Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine (Baltimore)* 1993;72(2):113-124.
31. Epstein JH, Tuffanelli D, Dubois EL: Light sensitivity and lupus erythematosus. *Arch Dermatol* 1965;91:483-485.
32. Foltyn VN, Golan TD: In vitro ultraviolet irradiation induces pro-inflammatory responses in cells from premonitory SLE mice. *Lupus* 2001;10(4):272-283.
33. Cripps DJ, Rankin J: Action spectra of lupus erythematosus and experimental immunofluorescence. *Arch Dermatol* 1973;107(4):563-567.
34. Freeman RG, Knox JM, Owens DW: Cutaneous lesions of lupus erythematosus induced by monochromatic light. *Arch Dermatol* 1969;100(6):677-682.

35. Walchner M, Messer G, Kind P: Phototesting and photoprotection in LE. *Lupus* 1997;6(2):167-174.
36. Reefman E, Kuiper H, Jonkman MF, Limburg PC, Kallenberg CG, Bijl M: Skin sensitivity to UVB irradiation in systemic lupus erythematosus is not related to the level of apoptosis induction in keratinocytes. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45(5):538-544.
37. D'Cruz D: Autoimmune diseases associated with drugs, chemicals and environmental factors. *Toxicol Lett* 2000;112-113:421-432.
38. Steenland K, Goldsmith DF: Silica exposure and autoimmune diseases. *Am J Ind Med* 1995;28(5):603-608.
39. Parks CG, Cooper GS: Occupational exposures and risk of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 2005;38(7):497-506.
40. Bigazzi PE: Autoimmunity and heavy metals. *Lupus* 1994;3(6):449-453.
41. Petri M, Allbritton J: Hair product use in systemic lupus erythematosus. A case-control study. *Arthritis Rheum* 1992;35(6):625-629.
42. Reidenberg MM, Drayer DE, Lorenzo B, Strom BL, West SL, Snyder ES, Freundlich B, Stolley PD: Acetylation phenotypes and environmental chemical exposure of people with idiopathic systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1993;36(7):971-973.
43. Nagata C, Fujita S, Iwata H, Kurosawa Y, Kobayashi K, Kobayashi M, Motegi K, Omura T, Yamamoto M, Nose T, .: Systemic lupus erythematosus: a case-control epidemiologic study in Japan. *Int J Dermatol* 1995;34(5):333-337.
44. Wallace DJ: The role of stress and trauma in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 1987;16(3):153-157.

45. Pawlak CR, Witte T, Heiken H, Hundt M, Schubert J, Wiese B, Bischoff-Renken A, Gerber K, Licht B, Goebel MU, Heijnen CJ, Schmidt RE, Schedlowski M: Flares in patients with systemic lupus erythematosus are associated with daily psychological stress. *Psychother Psychosom* 2003;72(3):159-165.
46. Wekking EM, Vingerhoets AJ, van Dam AP, Nossent JC, Swaak AJ: Daily stressors and systemic lupus erythematosus: a longitudinal analysis--first findings. *Psychother Psychosom* 1991;55(2-4):108-113.
47. Joyce K, Berkebile C, Hastings C, Yarboro C, Yocum D: Health status and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res* 1989;2(2):65-69.
48. Omdal R, Husby G, Mellgren SI: Mental health status in systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 1995;24(3):142-145.
49. Dobkin PL, Fortin PR, Joseph L, Esdaile JM, Danoff DS, Clarke AE: Psychosocial contributors to mental and physical health in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res* 1998;11(1):23-31.
50. McMurray RW: Sex hormones in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Front Biosci* 2001;6:E193-E206.
51. Ansar AS, Penhale WJ, Talal N: Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am J Pathol* 1985;121(3):531-551.
52. Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS: Hormonal and reproductive risk factors for development of systemic lupus erythematosus: results of a population-based, case-control study. *Arthritis Rheum* 2002;46(7):1830-1839.

53. Jacobi AM, Rohde W, Ventz M, Riemekasten G, Burmester GR, Hiepe F: Enhanced serum prolactin (PRL) in patients with systemic lupus erythematosus: PRL levels are related to the disease activity. *Lupus* 2001;10(8):554-561.
54. Rezaieyazdi Z, Hesamifard A: Correlation between serum prolactin levels and lupus activity. *Rheumatol Int* 2006.
55. Jara LJ, Gomez-Sanchez C, Silveira LH, Martinez-Osuna P, Vasey FB, Espinoza LR: Hyperprolactinemia in systemic lupus erythematosus: association with disease activity. *Am J Med Sci* 1992;303(4):222-226.
56. Peeva E, Venkatesh J, Michael D, Diamond B: Prolactin as a modulator of B cell function: implications for SLE. *Biomed Pharmacother* 2004;58(5):310-319.
57. De Bellis A, Bizzarro A, Pivonello R, Lombardi G, Bellastella A: Prolactin and autoimmunity. *Pituitary* 2005;8(1):25-30.
58. Buskila D, Berezin M, Gur H, Lin HC, Alosachie I, Terryberry JW, Barka N, Shen B, Peter JB, Shoenfeld Y: Autoantibody profile in the sera of women with hyperprolactinemia. *J Autoimmun* 1995;8(3):415-424.
59. Sanchez-Guerrero J, Liang MH, Karlson EW, Hunter DJ, Colditz GA: Postmenopausal estrogen therapy and the risk for developing systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 1995;122(6):430-433.
60. Sanchez-Guerrero J, Karlson EW, Liang MH, Hunter DJ, Speizer FE, Colditz GA: Past use of oral contraceptives and the risk of developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40(5):804-808.
61. Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y: Infections and SLE. *Autoimmunity* 2005;38(7):473-485.
62. Gilkeson GS, Pippen AM, Pisetsky DS: Induction of cross-reactive anti-dsDNA antibodies in preautoimmune NZB/NZW mice by immunization with bacterial DNA. *J Clin Invest* 1995;95(3):1398-1402.

63. James JA, Neas BR, Moser KL, Hall T, Bruner GR, Sestak AL, Harley JB: Systemic lupus erythematosus in adults is associated with previous Epstein-Barr virus exposure. *Arthritis Rheum* 2001;44(5):1122-1126.
64. James JA, Kaufman KM, Farris AD, Taylor-Albert E, Lehman TJ, Harley JB: An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1997;100(12):3019-3026.
65. Gross AJ, Hochberg D, Rand WM, Thorley-Lawson DA: EBV and systemic lupus erythematosus: a new perspective. *J Immunol* 2005;174(11):6599-6607.
66. Rider JR, Ollier WE, Lock RJ, Brookes ST, Pamphilon DH: Human cytomegalovirus infection and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 1997;15(4):405-409.
67. Hsu TC, Tsay GJ: Human parvovirus B19 infection in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40(2):152-157.
68. Query CC, Keene JD: A human autoimmune protein associated with U1 RNA contains a region of homology that is cross-reactive with retroviral p30gag antigen. *Cell* 1987;51(2):211-220.
69. Perl A, Colombo E, Dai H, Agarwal R, Mark KA, Banki K, Poiesz BJ, Phillips PE, Hoch SO, Reveille JD, .: Antibody reactivity to the HRES-1 endogenous retroviral element identifies a subset of patients with systemic lupus erythematosus and overlap syndromes. Correlation with antinuclear antibodies and HLA class II alleles. *Arthritis Rheum* 1995;38(11):1660-1671.
70. Kalden JR, Gay S: Retroviruses and autoimmune rheumatic diseases. *Clin Exp Immunol* 1994;98(1):1-5.
71. Talal N, Flescher E, Dang H: Are endogenous retroviruses involved in human autoimmune disease? *J Autoimmun* 1992;5 Suppl A:61-66.

72. Block SR, Winfield JB, Lockshin MD, D'Angelo WA, Christian CL: Studies of twins with systemic lupus erythematosus. A review of the literature and presentation of 12 additional sets. *Am J Med* 1975;59(4):533-552.
73. Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, Walker A, Mack TM: A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1992;35(3):311-318.
74. Reichlin M, Harley JB, Lockshin MD: Serologic studies of monozygotic twins with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1992;35(4):457-464.
75. Kelly JA, Moser KL, Harley JB: The genetics of systemic lupus erythematosus: putting the pieces together. *Genes Immun* 2002;3 Suppl 1:S71-S85.
76. Tsao BP: Update on human systemic lupus erythematosus genetics. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16(5):513-521.
77. Hochberg MC: The application of genetic epidemiology to systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1987;14(5):867-869.
78. Lawrence JS, Martins CL, Drake GL: A family survey of lupus erythematosus. 1. Heritability. *J Rheumatol* 1987;14(5):913-921.
79. Lindqvist AK, Alarcon-Riquelme ME: The genetics of systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 1999;50(6):562-571.
80. Moser KL, Neas BR, Salmon JE, Yu H, Gray-McGuire C, Asundi N, Bruner GR, Fox J, Kelly J, Henshall S, Bacino D, Dietz M, Hogue R, Koelsch G, Nightingale L, Shaver T, Abdou NI, Albert DA, Carson C, Petri M, Treadwell EL, James JA, Harley JB: Genome scan of human systemic lupus erythematosus: evidence for linkage on chromosome 1q in African-American pedigrees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(25):14869-14874.

81. Gaffney PM, Kearns GM, Shark KB, Ortmann WA, Selby SA, Malmgren ML, Rohlf KE, Ockenden TC, Messner RP, King RA, Rich SS, Behrens TW: A genome-wide search for susceptibility genes in human systemic lupus erythematosus sib-pair families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(25):14875-14879.
82. Shai R, Quismorio FP, Jr., Li L, Kwon OJ, Morrison J, Wallace DJ, Neuwelt CM, Brautbar C, Gauderman WJ, Jacob CO: Genome-wide screen for systemic lupus erythematosus susceptibility genes in multiplex families. *Hum Mol Genet* 1999;8(4):639-644.
83. Lindqvist AK, Steinsson K, Johanneson B, Kristjansdottir H, Arnasson A, Grondal G, Jonasson I, Magnusson V, Sturfelt G, Truedsson L, Svenungsson E, Lundberg I, Terwilliger JD, Gyllensten UB, Alarcon-Riquelme ME: A susceptibility locus for human systemic lupus erythematosus (hSLE1) on chromosome 2q. *J Autoimmun* 2000;14(2):169-178.
84. Gray-McGuire C, Moser KL, Gaffney PM, Kelly J, Yu H, Olson JM, Jedrey CM, Jacobs KB, Kimberly RP, Neas BR, Rich SS, Behrens TW, Harley JB: Genome scan of human systemic lupus erythematosus by regression modeling: evidence of linkage and epistasis at 4p16-15.2. *Am J Hum Genet* 2000;67(6):1460-1469.
85. Chien Y, Becker DM, Lindsten T, Okamura M, Cohen DI, Davis MM: A third type of murine T-cell receptor gene. *Nature* 1984;312(5989):31-35.
86. Hedrick SM, Cohen DI, Nielsen EA, Davis MM: Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature* 1984;308(5955):149-153.
87. Garboczi DN, Ghosh P, Utz U, Fan QR, Biddison WE, Wiley DC: Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 1996;384(6605):134-141.

88. Klein J, Sato A: The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343(10):702-709.
89. Klein J, Sato A: The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000;343(11):782-786.
90. Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T: A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(14):6259-6263.
91. Collins RW: Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. *Eur J Immunogenet* 2004;31(3):105-114.
92. Li P, Willie ST, Bauer S, Morris DL, Spies T, Strong RK: Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a gammadelta T cell ligand. *Immunity* 1999;10(5):577-584.
93. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T: Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(22):12445-12450.
94. Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T: Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 1998;279(5357):1737-1740.
95. Steinle A, Groh V, Spies T: Diversification, expression, and gamma delta T cell recognition of evolutionarily distant members of the MIC family of major histocompatibility complex class I-related molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(21):12510-12515.
96. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T: Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(12):6879-6884.

97. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T: Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2001;2(3):255-260.
98. Pellet P, Renaud M, Fodil N, Laloux L, Inoko H, Hauptmann G, Debre P, Bahram S, Theodorou I: Allelic repertoire of the human MICB gene. *Immunogenetics* 1997;46(5):434-436.
99. Bahram S, Mizuki N, Inoko H, Spies T: Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 1996;44(1):80-81.
100. Bahram S, Spies T: Nucleotide sequence of a human MHC class I MICB cDNA. *Immunogenetics* 1996;43(4):230-233.
101. Bahram S, Shiina T, Oka A, Tamiya G, Inoko H: Genomic structure of the human MHC class I MICB gene. *Immunogenetics* 1996;45(2):161-162.
102. Campbell RD, Trowsdale J: Map of the human MHC. *Immunol Today* 1993;14(7):349-352.
103. Kelly A, Powis SH, Kerr LA, Mockridge I, Elliott T, Bastin J, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A, Trowsdale J, Townsend A: Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature* 1992;355(6361):641-644.
104. Milner CM, Campbell RD: Genetic organization of the human MHC class III region. *Front Biosci* 2001;6:D914-D926.
105. Leelayuwat C, Townend DC, Degli-Esposti MA, Abraham LJ, Dawkins RL: A new polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I. *Immunogenetics* 1994;40(5):339-351.
106. Hampe A, Coriton O, Andrieux N, Carn G, Lepourcelet M, Mottier S, Dreano S, Gatus MT, Hitte C, Soriano N, Galibert F: A 356-Kb sequence of the subtelomeric part of the MHC Class I region. *DNA Seq* 1999;10(4-5):263-299.

107. Bahram S: MIC genes: from genetics to biology. *Adv Immunol* 2000;76:1-60.
108. Shiina T, Tamiya G, Oka A, Takishima N, Yamagata T, Kikkawa E, Iwata K, Tomizawa M, Okuaki N, Kuwano Y, Watanabe K, Fukuzumi Y, Itakura S, Sugawara C, Ono A, Yamazaki M, Tashiro H, Ando A, Ikemura T, Soeda E, Kimura M, Bahram S, Inoko H: Molecular dynamics of MHC genesis unraveled by sequence analysis of the 1,796,938-bp HLA class I region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(23):13282-13287.
109. Ota M, Katsuyama Y, Mizuki N, Ando H, Furihata K, Ono S, Pivetti-Pezzi P, Tabbara KF, Palimeris GD, Nikbin B, Davatchi F, Chams H, Geng Z, Bahram S, Inoko H: Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency data in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Uygur, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek and Italian. *Tissue Antigens* 1997;49(5):448-454.
110. Perez-Rodriguez M, Corell A, Arguello JR, Cox ST, McWhinnie A, Marsh SG, Madrigal JA: A new MICA allele with ten alanine residues in the exon 5 microsatellite. *Tissue Antigens* 2000;55(2):162-165.
111. Holmes MA, Li P, Petersdorf EW, Strong RK: Structural studies of allelic diversity of the MHC class I homolog MIC-B, a stress-inducible ligand for the activating immunoreceptor NKG2D. *J Immunol* 2002;169(3):1395-1400.
112. Ahmad T, Marshall SE, Mulcahy-Hawes K, Orchard T, Crawshaw J, Armuzzi A, Neville M, van Heel D, Barnardo M, Welsh KI, Jewell DP, Bunce M: High resolution MIC genotyping: design and application to the investigation of inflammatory bowel disease susceptibility. *Tissue Antigens* 2002;60(2):164-179.
113. Visser CJ, Tilanus MG, Schaeffer V, Tatari Z, Tamouza R, Janin A, Charron D: Sequencing-based typing reveals six novel MHC class I chain-related gene B (MICB) alleles. *Tissue Antigens* 1998;51(6):649-652.

114. Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S: Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 1996;44(5):351-357.
115. Fodil N, Pellet P, Laloux L, Hauptmann G, Theodorou I, Bahram S: MICA haplotypic diversity. *Immunogenetics* 1999;49(6):557-560.
116. Ando H, Mizuki N, Ota M, Yamazaki M, Ohno S, Goto K, Miyata Y, Wakisaka K, Bahram S, Inoko H: Allelic variants of the human MHC class I chain-related B gene (MICB). *Immunogenetics* 1997;46(6):499-508.
117. Fischer G, Arguello JR, Perez-Rodriguez M, McWhinnie A, Marsh SG, Travers PJ, Madrigal JA: Sequence-specific oligonucleotide probing for MICB alleles reveals associations with MICA and HLA-B. *Immunogenetics* 2000;51(7):591-599.
118. Fischer G, Arguello JR, Perez-Rodriguez M, Cox ST, McWhinnie A, Marsh SG, Madrigal JA: Novel intronic variants of MICB (MHC class I chain-related gene B). *Eur J Immunogenet* 1999;26(6):399-404.
119. Fischer G, Perez-Rodriguez M, Arguello JR, Cox ST, McWhinnie A, Travers PJ, Madrigal JA: Three novel MICB alleles. *Tissue Antigens* 2000;55(2):166-170.
120. Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M, Chalupny NJ: ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001;14(2):123-133.
121. Dunn C, Chalupny NJ, Sutherland CL, Dosch S, Sivakumar PV, Johnson DC, Cosman D: Human cytomegalovirus glycoprotein UL16 causes intracellular sequestration of NKG2D ligands, protecting against natural killer cell cytotoxicity. *J Exp Med* 2003;197(11):1427-1439.

122. Welte SA, Sinzger C, Lutz SZ, Singh-Jasuja H, Sampaio KL, Eknigk U, Rammensee HG, Steinle A: Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *Eur J Immunol* 2003;33(1):194-203.
123. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T: Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999;285(5428):727-729.
124. Gambelunghe G, Falorni A, Ghaderi M, Laureti S, Tortoioli C, Santeusanio F, Brunetti P, Sanjeevi CB: Microsatellite polymorphism of the MHC class I chain-related (MIC-A and MIC-B) genes marks the risk for autoimmune Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(10):3701-3707.
125. Wiencke K, Spurkland A, Schrupf E, Boberg KM: Primary sclerosing cholangitis is associated to an extended B8-DR3 haplotype including particular MICA and MICB alleles. *Hepatology* 2001;34(4 Pt 1):625-630.
126. Mizuki N, Ota M, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsuyama Y, Yamazaki M, Watanabe K, Goto K, Nakamura S, Bahram S, Inoko H: Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behcet disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(4):1298-1303.
127. Wallace GR, Verity DH, Delamaine LJ, Ohno S, Inoko H, Ota M, Mizuki N, Yabuki K, Kondiatis E, Stephens HA, Madanat W, Kanawati CA, Stanford MR, Vaughan RW: MIC-A allele profiles and HLA class I associations in Behcet's disease. *Immunogenetics* 1999;49(7-8):613-617.
128. Yabuki K, Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Palimeris G, Stavropoulos C, Koumantaki Y, Spyropoulou M, Giziaki E, Kaklamani V, Kaklamani E, Inoko H, Ohno S: Association of MICA gene and HLA-B*5101 with Behcet's disease in Greece. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(9):1921-1926.

129. Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, Katsuyama Y, Ishizuka K, Mochizuki T, Mizuki N, Seki SS, Honma T, Inoko H, Asakura H: A close relationship of triplet repeat polymorphism in MHC class I chain-related gene A (MICA) to the disease susceptibility and behavior in ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 2001;57(1):9-14.
130. Parks CG, Cooper GS, Hudson LL, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS, Pandey JP: Association of Epstein-Barr virus with systemic lupus erythematosus: effect modification by race, age, and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 genotype. *Arthritis Rheum* 2005;52(4):1148-1159.
131. Dror Y, Blachar Y, Cohen P, Livni N, Rosenmann E, Ashkenazi A: Systemic lupus erythematosus associated with acute Epstein-Barr virus infection. *Am J Kidney Dis* 1998;32(5):825-828.
132. McClain MT, Harley JB, James JA: The role of Epstein-Barr virus in systemic lupus erythematosus. *Front Biosci* 2001;6:E137-E147.
133. Poole BD, Scofield RH, Harley JB, James JA: Epstein-Barr virus and molecular mimicry in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 2006;39(1):63-70.
134. Boackle SA, Holers VM, Chen X, Szakonyi G, Karp DR, Wakeland EK, Morel L: Cr2, a candidate gene in the murine Sle1c lupus susceptibility locus, encodes a dysfunctional protein. *Immunity* 2001;15(5):775-785.
135. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, Harley JB: Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003;349(16):1526-1533.
136. Spreu J, Stehle T, Steinle A: Human cytomegalovirus-encoded UL16 discriminates MIC molecules by their alpha2 domains. *J Immunol* 2006;177(5):3143-9.

137. Wu J, Chalupny NJ, Manley TJ, Riddell SR, Cosman D, Spies T: Intracellular Retention of the MHC Class I-Related Chain B Ligand of NKG2D by the Human Cytomegalovirus UL16 Glykoprotein. *J Immunol* 2003;170:4196-4200.
138. Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG, Steinle A: Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 2003;102(4):1389-1396.
139. Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH: Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 2001;413(6852):165-171.
140. Cerwenka A, Baron JL, Lanier LL: Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(20):11521-11526.
141. Lanier LL: NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005;23:225-274.
142. Pende D, Rivera P, Marcenaro S, Chang CC, Biassoni R, Conte R, Kubin M, Cosman D, Ferrone S, Moretta L, Moretta A: Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res* 2002;62(21):6178-6186.
143. Salih HR, Rammensee HG, Steinle A: Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 2002;169(8):4098-4102.
144. Marten A, von Lilienfeld-Toal M, Buchler MW, Schmidt J: Soluble MIC is elevated in the serum of patients with pancreatic carcinoma diminishing gammadelta T cell cytotoxicity. *Int J Cancer* 2006;119(10):2359-2365.
145. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T: Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002;419(6908):734-738.

146. Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, Salih HR: Soluble MICA in malignant diseases. *Int J Cancer* 2006;118(3):684-687.
147. Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, Salih HR: Soluble MICB in malignant diseases: analysis of diagnostic significance and correlation with soluble MICA. *Cancer Immunol Immunother* 2006.
148. Gonzalez S, Rodrigo L, Lopez-Vazquez A, Fuentes D, Agudo-Ibanez L, Rodriguez-Rodero S, Fdez-Morera JL, Martinez-Borra J, Lopez-Larrea C: Association of MHC class I related gene B (MICB) to celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2004;99(4):676-680.
149. López-Arbesu R, Ballina-García FJ, Alperi-López M, López-Soto A, Rodríguez-Rodero S, Martínez-Borra J, López-Vázquez A, Fernández-Morera JL, Riestra-Noriega JL, Queiro-Silva R, Quinones-Lombrana A, López-Larrea C, González S: MHC class I chain-related gene B (MICB) is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Rheumatol* 2007;46:426-430.
150. Lu M, Xia B, Li J, Ye M, Zhang X, Tan Q: MICB microsatellite polymorphism is associated with ulcerative colitis in Chinese population. *Clin Immunol* 2006;120(2):199-204.
151. Ding Y, Xia B, Lu M, Zhang Y, Li J, Ye M, Luo H, Yu J, Zhang X, Tan J: MHC class I chain-related gene A-A5.1 allele is associated with ulcerative colitis in Chinese population. *Clin Exp Immunol* 2005;142(1):193-198.
152. Glas J, Martin K, Brunner G, Kopp R, Folwaczny C, Weiss EH, Albert ED: MICA, MICB and C1_4_1 polymorphism in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 2001;58(4):243-249.
153. Valentonyte R, Hampe J, Huse K, Rosenstiel P, Albrecht M, Stenzle A, Nagy M, Gaede KI, Franke A, Haesler R, Koch A, Lengauer T, Seegert D, Reiling N, Ehlers S, Schwinger E, Platzer M, Krawczak M, Muller-Quernheim J, Schurmann M, Schreiber S: Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. *Nat Genet* 2005;37(4):357-364.

154. Chen M, Wang YY, Zhao MH, Zhang YK, Wang HY: Autoantibodies against glomerular mesangial cells and their target antigens in lupus nephritis. *Ren Fail* 2005;27(5):507-513.
155. Nangaku M, Couser WG: Mechanisms of immune-deposit formation and the mediation of immune renal injury. *Clin Exp Nephrol* 2005;9(3):183-191.
156. Trendelenburg M: Antibodies against C1q in patients with systemic lupus erythematosus. *Springer Semin Immunopathol* 2005;27(3):276-285.
157. Reichlin M: Serological correlations with nephritis in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 2005;117(1):12-14.

9. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name:	Mona Holdack-Janssen
Geburtsdatum:	20.05.1982
Geburtsort:	Hannover
Familienstand:	ledig
Konfession:	Evangelisch-lutherisch
Nationalität:	deutsch

Klinische Ausbildung

04/2007 – 07/2007	3. Teil des Praktischen Jahres, Anästhesie und operative Intensivmedizin, Agnes-Karll-Krankenhaus Laatzen, Chefarzt Dr. med. Kaukemüller
12/2006 – 03/2007	2. Teil des Praktischen Jahres, Chirurgie, Tygerberg Hospital, University of Stellenbosch South Africa, Head Prof. Warren
08/2006 – 12/2006	1. Teil des Praktischen Jahres, Innere Medizin, Abteilung Kardiologie, Universitätsspital Zürich, Schweiz, Chefarzt Prof. Dr. med. Lüscher
07/2006 – 08/2006	Famulatur in der Praxis für Kardiologie Drs. Zündorf/Cierpka/Altevogt, Hannover
09/2005	Famulatur in der Abteilung Kinderchirurgie, Shenzhen Childrens Hospital, China
07/2005 – 08/2005	Famulatur in der Abteilung Kinderchirurgie, Medizinische Hochschule Hannover, Chefarzt Prof. Dr. med. Ure

Lebenslauf

08/2004 – 09/2004	Famulatur in der Praxis für Allgemeinmedizin, Dr. med. Gerasch, Ronnenberg
07/2004 – 08/2004	Famulatur in der Abteilung für Chirurgie, Agnes-Karll-Krankenhaus, Hannover, Leit. Arzt Dr. med. Thielhelm
03/2004 – 04/2004	Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin, Henriettenstiftung, Hannover, Dr. med. Schröder

Hochschulausbildung

Seit 04/2004	Experimentelle Arbeit in der Klinischen Immunologie, Medizinische Hochschule Hannover, Prof. Dr. med. Reinhold E. Schmidt in der Arbeitsgruppe von PD. Dr. med. Torsten Witte
01.09.2003	Ärztliche Vorprüfung
Seit 09/2001	Medizinstudium an der Medizinischen Hochschule Hannover

Schulbildung

22.06.2001	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
1992 – 2001	Integrierte Gesamtschule Hannover-Linden
1988 - 1992	Grundschule Benthe, Ronnenberg

Ehrenamtliche Tätigkeit

01/2004 – 08/2006	Mitglied beim Deutschen Famulanten Austausch (dfa)
-------------------	---

Hannover, den
(Unterschrift)

10. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all den lieben Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt.

Herrn PD Dr. med. Torsten Witte, meinem Doktorvater, für seine ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung, die vielen Diskussionen, Anregungen und Ratschläge, seine Hilfsbereitschaft, sein Engagement, seine Ruhe und Geduld bei den zahlreichen Korrekturen und vor allem für seinen Optimismus.

Herrn Prof. Dr. med. Reinhold E. Schmidt, dem Instituttleiter, für die freundliche Überlassung des Themas und die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können.

Den Mitarbeitern der Klinischen Immunologie die sich immer wieder Zeit genommen haben und mir durch ihre Hilfe und die vielen praktischen Ratschläge den Laboralltag ermöglicht und erleichtert haben.

Den Patienten und Blutspendern, die erst durch ihre bereitwillige Blutspende diese Arbeit ermöglicht haben.

Meinen Eltern, Antke und Hinrich Holdack-Janssen, die mich über meinen Lebensweg begleitet haben, ihr Verständnis, ihre Zuversicht und ihren Glauben an mich.

Meinen Freunden und besonders **meiner Schwester** Eva Holdack-Janssen, für die liebevolle Unterstützung und Motivation, die unendliche Geduld und die vielen praktischen Tipps und Tricks die zum Gelingen dieser Arbeit geführt haben.

11. Eidesstattliche Erklärung

Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 5 und 6

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel Assoziationen des MICB-Allels mit dem Systemischen Lupus Erythematoses in der Abteilung Klinische Immunologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter Betreuung von PD. Dr. med. Torsten Witte ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Hannover, den

.....

(Unterschrift)