

Aus der Abteilung Hämatologie und Onkologie
(Prof. Dr. med. L. Trümper)

im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Zytokinrezeptorpolymorphismen bei Patienten mit T-Non-Hodgkin-Lymphomen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Irene Stoller

aus

Stepnogorsk/Kasachstan

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Kube

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Walter

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 T-Non-Hodgkin-Lymphome	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Klassifikation	2
1.1.4 Klinik	3
1.1.5 Therapie und Prognose	4
1.1.6 Ätiologie und Pathogenese	4
1.2 Zytokine und ihre Bedeutung bei malignen Lymphomen	5
1.3 Genetische Polymorphismen in Zytokingenen und Zytokinrezeptorgenen	7
1.4 IL-4 und der IL-4-Rezeptor	8
1.4.1 IL-4	8
1.4.2 Der IL-4-Rezeptor	8
1.4.2.1 Struktur und Funktion des IL-4-Rezeptors	8
1.4.2.2 IL-4R- α -Kette	9
1.4.2.3 Signaltransduktion des IL-4-Rezeptors	10
1.4.3 Polymorphismen im IL-4R-Gen	11
1.4.3.1 Einteilung der genetischen Variationen	11
1.4.3.2 Genetische Assoziationsstudien	12
1.4.3.3 Funktionelle Bedeutung der Genpolymorphismen für die Signaltransduktion des IL-4-Rezeptors	13
1.4.4 Löslicher IL-4-Rezeptor	13
1.4.5 Bedeutung von IL-4 und des IL-4-Rezeptors für Lymphome	14
1.5 TNF und der TNF-Rezeptor	16
1.5.1 Tumornekrosefaktor	16
1.5.2 Die TNF-Rezeptoren I und II	16
1.5.2.1 Struktur und Funktion der TNF-Rezeptoren	16

1.5.2.2	Signaltransduktion der TNF-Rezeptoren	17
1.5.3	Promotorpolymorphismus -609 G/T im TNFRI	17
1.5.3.1	Einteilung der genetischen Variation	17
1.5.3.2	Genetische Assoziationsstudien	18
1.5.3.3	Funktionelle Bedeutung des Genopolymorphismus für die Gen- expression	19
1.5.4	Polymorphismus M196R im TNFRII	19
1.5.4.1	Einteilung der genetischen Variation	19
1.5.4.2	Genetische Assoziationsstudien	20
1.5.4.3	Funktionelle Bedeutung des Genopolymorphismus für die Si- gnaltransduktion	21
1.5.5	Lösliche TNF-Rezeptoren	21
1.5.6	TNF/TNF-Rezeptor und Lymphome	22
2	Zielsetzung dieser Arbeit	24
3	Material	25
3.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	25
3.2	Geräte	25
3.3	Software	26
3.4	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme („Kits“)	26
3.5	Polymorphismen	27
4	Methoden	28
4.1	Blutproben und Patientenkollektiv	28
4.2	Genotypisierung mit TaqMan-PCR	29
4.2.1	DNA-Isolierung	29
4.2.1.1	Prinzip	29
4.2.1.2	Durchführung	29
4.2.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA	30
4.2.3	Genotypisierung der SNPs durch TaqMan-PCR	30
4.2.3.1	Prinzip	30
4.2.3.2	Durchführung	31
4.3	Serumanalysen durch ELISA	34
4.3.1	Prinzip	34
4.3.2	Löslicher TNF-Rezeptor I/II	34
4.3.3	Löslicher IL-4-Rezeptor	36
4.4	Definitionen und statistische Analysen	37
5	Ergebnisse	38
5.1	Zusammenhang zwischen Genpolymorphismen der Zytokinrezeptoren TNFRI, TNFRII, IL-4R und der Suszeptibilität für periphere T-NHL	38

5.2	Die haplotypische Verteilung bei Patienten mit T-NHL und bei der gesunden Kontrollgruppe	43
5.3	Einfluss der untersuchten Genpolymorphismen auf die klinischen Parameter Gesamtüberleben und ereignisfreies Überleben bei Patienten mit T-NHL . . .	44
5.4	Zusammenhang zwischen Polymorphismen in untersuchten Zytokinrezeptorgenen und Serumkonzentration der entsprechenden löslichen Zytokinrezeptoren	50
6	Diskussion	51
6.1	Assoziation von TNF- und IL-4-Rezeptorgenpolymorphismen und dem Risiko, an einem T-NHL zu erkranken	51
6.2	Einfluss von TNF- und IL-4-Rezeptorgenpolymorphismen auf die Prognose von Patienten mit T-NHL	53
6.3	Einfluss von TNF- und IL-4-Rezeptorpolymorphismen auf die Serumkonzentrationen der entsprechenden Rezeptoren bei Patienten mit T-NHL	55
7	Zusammenfassung	58
8	Literaturverzeichnis	59

Abbildungsverzeichnis

1.1	Struktur des IL-4R-Gens	12
1.2	Struktur des TNFRI-Gens	18
1.3	Struktur des TNFRII-Gens	19
4.1	Mechanismus der TaqMan-basierten Genotypisierung	32
4.2	Diskriminierung zwischen zwei Allelen mittels TaqMan-basierter Genotypisierung	33
4.3	Erstellung einer Verdünnungsreihe für ELISA	35
5.1	Kaplan-Meier-Kurve TNFR -609 G/T EFS	45
5.2	Kaplan-Meier-Kurve TNFR -609 G/T OS	46
5.3	Kaplan-Meier-Kurve TNFRII M196R EFS	47
5.4	Kaplan-Meier-Kurve IL-4R I75V OS	48
5.5	Kaplan-Meier-Kurve IL-4R I75V (ALK-negativ) OS	49

Tabellenverzeichnis

1.1	Klassifikation der T-NHL	3
1.2	Untersuchte SNPs im IL-4R-Gen	11
1.3	Untersuchte SNPs im TNFRI-Gen	18
1.4	Untersuchte SNPs im TNFR2-Gen	20
3.1	Chemikalien	25
3.2	Geräte	25
3.3	Software	26
3.4	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme („Kits“)	26
3.5	Untersuchte Polymorphismen	27
4.1	Reaktionsbedingungen für TaqMan-PCR	31
5.1	Allelfrequenzen der Polymorphismen im IL-4R-, TNFRI- sowie TNFR2-Gen .	39
5.2	Genotypenverteilung der Polymorphismen in der Kontroll- und Patientengruppe	40
5.3	Prüfung auf Hardy-Weinberg-Äquilibrium	41
5.4	Zusammenhang zwischen den Polymorphismen und der Suszeptibilität für T-NHL	42
5.5	Haplotypen im IL-4R-Gen	43
5.6	Serumkonzentration der löslichen Zytokinrezeptoren bei T-NHL-Patienten . .	50

Abkürzungsverzeichnis

AILT	Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom
ALCL	Anaplastisches großzelliges T-Zell-Lymphom
ALK	Anaplastische Lymphom-Kinase
ASK	engl.: Apoptosis Signal-regulating Kinase
ATLL	Adulte T-Zell-Leukämie
c γ -Kette	engl.: Common Gamma Chain
CD	engl.: Cluster of Differentiation
CHOEP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Etoposid, Prednison
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison
cIAP	engl.: Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein
CR	Komplette Remission
CTCL	Kutanes T-Zell-Lymphom
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DFS	engl.: Disease Free Survival
DSHNHL	Deutsche Studiengruppe für hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	engl.: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FADD	engl.: Fas-Associated protein with Death Domain
GELA	franz.: Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HL	Hodgkin-Lymphom
HTLV1	Humanes T-Zell-Leukämie-Virus Typ 1
I4R-Motiv	Insulin-IL-4-Rezeptor-Motiv
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulinähnliche Wachstumsfaktoren
IL	Interleukin
IL-4R	IL-4-Rezeptor
IPI	Internationaler Prognose-Index
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun-N-terminale Kinasen
LDH	Laktatdehydrogenase
MAP	engl.: Mitogen Activated Protein

nf- κ B	engl.: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NPM	engl.: Nucleophosmin
OS	engl.: Overall Survival
PLAD	engl.: Pre-Ligand-Binding assembly domain
PTCL	Peripheres T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom
REAL	engl.: Revised European American Lymphoma Classification
RIP	engl.: Receptor Interacting Protein
SD	Standardabweichung
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SNP	engl.: Single Nucleotid Polymorphism
STAT	engl.: Signal Transducer and Activator of Transkription
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th-Zelle	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	engl.: TNF-Receptor associated Death Domain Protein
TRAF	engl.: TNF Receptor Associated Factor
VCAM-1	engl.: Vascular Cell Adhesion Molecule 1

1 Einleitung

1.1 T-Non-Hodgkin-Lymphome

1.1.1 Definition

Lymphome sind eine heterogene Gruppe von Neoplasien mit Ursprung im lymphatischen Gewebe. Sie werden unterteilt in Hodgkin-Lymphome (HL) und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). HL haben ihren Ursprung überwiegend in B-Lymphozyten und sind durch die Anwesenheit von Sternberg-Reed-Zellen und Hodgkin-Zellen im histologischen Bild erkennbar. NHL gehen entweder auf B-Zellen oder T-Zellen zurück. Die meisten NHL haben ihren Ursprung in der B-Zell-Linie, und nur ein kleiner Anteil geht aus T-Zellen hervor (CANELLOS ET AL. 2006).

Grundsätzlich werden die T-NHL in unreife („lymphoblastische“) und in reife, so genannte „periphere“ Lymphome unterteilt. Während die unreifen T-Zell-Neoplasien von T-Zell-Präkursorzellen aus dem Knochenmark und dem Thymus abstammen, gehen periphere T-Zell-Neoplasien aus T-Zellen hervor, deren Differenzierung innerhalb des Thymus bereits abgeschlossen ist, das heißt, aus reifen T-Lymphozyten außerhalb des Thymus. Diese T-Zellen haben sowohl das Stadium der Umlagerung der T-Zell-Rezeptorgene als auch der positiven und negativen Selektion gegen Antigene durchlaufen und wandern als T-Zell-Rezeptor-(TCR)- $\alpha\beta$ -positive Zellen, die entweder CD4 oder CD8 exprimieren, oder als TCR- $\delta\gamma$ -positive Zellen, die meist CD4- und CD8-negativ sind, in die „Peripherie“ (MITROU 2001, S. 221-234). Diese T-Lymphozyten sind die Ursprungszellen der peripheren T-Zell-Lymphome. Die T-lymphoblastischen Lymphome als Vertreter der Präkursor-T-Zell-Neoplasien machen im Kindesalter den größten Teil der T-Zell-Lymphome aus, während sie beim Erwachsenen mit etwa 2 % angegeben werden (HOELZER ET AL. 2002).

1.1.2 Epidemiologie

Die malignen Lymphome stellen 3 % aller weltweit auftretenden Krebserkrankungen dar und sind in Europa die fünfthäufigste maligne Erkrankung nach Lungen-, Brust-, Dickdarm- und Prostatakrebs (GROVES ET AL. 2000). Die reifen T-Zell- und NK-Zell-Neoplasien sind selten und nur für 10 % aller weltweiten NHL-Erkrankungen verantwortlich. Die Häufigkeit von peripheren T-NHL unterliegt starken regionalen Einflüssen und schwankt zwischen 1,5 % in Kanada und 18,3 % in China. Auch die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Subgruppen zeigt starke geografische Unterschiede (RÜDIGER ET AL. 2002).

So ist das adulte T-Zell-Lymphom (ATLL) mit dem humanen T-Zell-Leukämie-Virus Typ 1 (HTLV1) assoziiert und kommt besonders häufig im südlichen Japan und in den karibischen Ländern vor, wo das HTLV1 endemisch ist. Das intestinale T-Zell-Lymphom kommt in erster Linie bei Patienten mit unbehandelter glutensensitiver Enteropathie vor. Daher beobachtet man in Gebieten wie Großbritannien, wo die Zöliakie vermehrt auftritt, eine erhöhte Inzidenz dieser sonst seltenen Subgruppe.

Ein weiterer Faktor, der die Inzidenz von T-Zell-Lymphomen und NK-Zell-Lymphomen beeinflusst, ist die Herkunft der Patienten. Nasale NK- und T-Zell-Lymphome kommen bei Asiaten sehr viel häufiger als bei Menschen anderer genetischer Herkunft vor. Weitere Populationen mit einem erhöhten Risiko für diese EBV-assoziierten Krankheiten (EBV, Epstein-Barr-Virus) sind indianische Völker in Nord- und Südamerika. Es wird postuliert, dass eine genetische Prädisposition, die mit einem Immundefekt gegenüber dem EBV verbunden ist, für diese Verteilung der EBV-assoziierten Lymphome verantwortlich ist (JAFJE 2006; ISAACSON UND WRIGHT 1978). Die in Mitteleuropa häufigsten Subtypen sind das unspezifische periphere T-Zell-Lymphom (PTCL), das angioimmunoblastische T-Zell-Lymphom (AILT) und das anaplastische großzellige T-Zell-Lymphom (ALCL) mit und ohne ALK-Expression (RÜDIGER ET AL. 2002).

1.1.3 Klassifikation

Hinter dem Begriff Lymphom verbirgt sich eine Vielzahl an unterschiedlichen und eigenständigen Krankheitsentitäten. Die Klassifikation definiert diese spezifischen lymphatischen Neoplasien und bildet damit die Grundlage für die reproduzierbare Diagnose und eine optimal angepasste Therapie.

Die aktuell gültige WHO-Klassifikation basiert auf der REAL-Klassifikation („Revised European American Lymphoma Classification“, HARRIS ET AL. 1994). Die WHO-Klassifikation definiert die Non-Hodgkin-Lymphome nach zytomorphologischen, immunologischen und genetischen Kriterien. Grundsätzlich erfolgt eine Unterscheidung in B- und T-/NK-Zell-Lymphome sowie unreife (lymphoblastische) und reife (periphere) Lymphome. Die reifen Lymphome können weiter in primär leukämische, primär nodale und primär extranodale Lymphome unterteilt werden (siehe Tabelle 1.1). Die WHO-Klassifikation stellt das erste weltweit akzeptierte Einteilungssystem der malignen Lymphome dar und ermöglicht damit den Vergleich klinischer und wissenschaftlicher Studien auf internationaler Ebene. Die WHO-Klassifikation ist keine endgültige Klassifikation. Vielmehr muss jede klinische Klassifizierung als permanenter Prozess angesehen werden. So wird in der WHO-Klassifikation die Möglichkeit erwähnt, mittels Genexpressionsanalyse in naher Zukunft Untereinheiten diffuser B-Zell-Lymphome mit prognostischer Relevanz zu definieren (CANELLOS ET AL. 2006; HIDDEMANN ET AL. 2004).

ALK-positive und ALK-negative Lymphome Zu den häufigeren T-Zell-Lymphomen gehören in Europa das periphere unklassifizierte T-Zell-Lymphom, das angioimmunoblastische T-Zell-Lymphom und das großzellige anaplastische Lymphom (ALCL). Nach molekularen und

Tabelle 1.1: Klassifikation der T-Zell-Neoplasien nach WHO (Quelle: PFREUNDSCHUH 2004, S. 32)

Vorläufer T-Zell-Neoplasien
T-lymphoblastische(s) Leukämie/Lymphom Blastisches NK-Zell-Lymphom
periphere T-Zell-Neoplasien
primär leukämische Lymphome T-Zell-Prolymphozyten-Leukämie Lymphozytische großgranuläre T-Zell-Leukämie Agressive NK-Zell-Leukämie „Adulte“ T-Zell-Leukämie
primär extranodale Lymphome Extranodales NK-/T-Zell-Lymphom, nasaler Typ T-Zell-Lymphom vom Enteropathie-Typ Hepatosplenisches T-Zell-Lymphom Primär kutanes anaplastisches großzelliges Lymphom Subkutanes Pannikulitis-ähnliches T-Zell-Lymphom Mycosis fungoides Sézary-Syndrom
primär nodale Lymphome Peripheres unklassifiziertes T-Zell-Lymphom Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom Großzelliges anaplastisches Lymphom

klinischen Kriterien können mehrere Entitäten des ALC-Lymphoms unterschieden werden: das primär systemische, ALK-positive ALC-Lymphom, das primär systemische ALK-negative ALC-Lymphom und das primär kutane ALC-Lymphom. Die Expression des ALK-Proteins bei der primär systemischen ALC-Lymphom-Entität ist Folge chromosomaler Translokationen, meist t(2;5), und kann heute durch immunhistologische Färbungen zuverlässig nachgewiesen werden (siehe auch Abschnitt 1.1.6, Seite 5). Das ALK-positive ALC-Lymphom tritt vor allem bei jungen männlichen Patienten auf und besitzt nach Chemotherapie eine günstige Prognose. Im Gegensatz dazu finden sich ALK-negative ALC-Lymphome bei älteren Patienten, zeigen ein ausgewogenes Geschlechtsverhältnis und gehen mit einer ungünstigeren Prognose einher (FOSS ET AL. 2000).

1.1.4 Klinik

Hauptsymptom eines malignen Lymphoms ist üblicherweise die schmerzlose Vergrößerung eines oder mehrerer Lymphknoten. Beim Knochenmarkbefall können Symptome einer Anämie, Thrombozytopenie oder Leukozytopenie auftreten. Die Infiltration der Leber und Milz mit konsekutiver massiver Vergrößerung kann zu abdominellen Beschwerden führen. Allgemeinsymptome (B-Symptome) wie Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust können begleitend auftreten und gelten als prognostisch ungünstiges Zeichen. Blutsenkungsgeschwindigkeit, LDH und β_2 -Mikroglobulin sind häufig erhöht.

1.1.5 Therapie und Prognose

Die Basis der Vorhersage des Krankheitsverlaufs bilden prognostische Faktoren. Diese liefern Informationen über den zu erwartenden Verlauf einer Erkrankung unter einer bestimmten Therapie. Die Prognose ist nicht nur für die Aufklärung des Patienten entscheidend, sondern ermöglicht auch die Definition eines Patientenkollektivs und insofern eine Vergleichbarkeit von Therapien unterschiedlicher Studien. Vor allem aber für die Therapieplanung ist die prognostische Einschätzung bei Diagnosestellung von herausragender Bedeutung. In prospektiven Studien wurden fünf unabhängige prognostische Parameter identifiziert und im Internationalen Prognose-Index (IPI) zusammengefasst: Alter, Allgemeinzustand, Stadium nach Ann Arbor, Extranodalbefall und Serumlaktatdehydrogenase. Der auf robusten klinischen Parametern basierende IPI bildet die biologische und prognostische Heterogenität der Lymphome nur unzureichend ab. Neue Erkenntnisse legen nahe, dass der IPI möglicherweise durch biologische Prognosefaktoren verbessert werden kann, wie es am Beispiel der ALK-positiven Lymphome gezeigt werden konnte (PFREUNDSCHUH 2004).

Von der französischen Studiengruppe GELA wurde 1998 gezeigt, dass die Prognose peripherer T-Zell-Lymphome nach konventioneller Therapie mit einer Anthrazyclin-haltigen Polychemotherapie signifikant schlechter ist als bei aggressiven B-Zell-Lymphomen. Bei den 228 Patienten mit peripheren T-Zell-Lymphomen betrug die CR-Rate 54 %, bei den B-Zell-Lymphomen 63 % ($p=0,004$). Die 5-Jahres-Überlebensrate war mit 41 % gegenüber 53 % signifikant schlechter ($p=0,0004$). Nach Abzug der 45 Patienten mit anaplastisch-großzelligen T-Zell-Lymphomen betrug das 5-Jahres-Überleben der restlichen T-Zell-Lymphome sogar nur noch 35 %. In dieser Studie konnte auch für die T-Zell-Lymphome eine klare Korrelation der Prognose mit dem IPI gezeigt werden (GISSELBRECHT ET AL. 1998). Aufgrund dieser unbefriedigenden Therapieergebnisse wurde versucht, durch Modifikationen Anthrazyclin-basierter Schemata eine Verbesserung der Ergebnisse zu erzielen, die jedoch bisher ohne Erfolg blieben. Aus diesem Grund wird die Primärtherapie bei peripheren T-NHL in der Regel mit einer Polychemotherapie nach dem CHOP- oder CHOP-like-Schema mit oder ohne Hinzunahme von Etoposid (CHOEP) durchgeführt. Eine Erhöhung der Dosisintensität durch Verkürzung der Intervalle von 3 auf 2 Wochen (CHO(E)P-14) ist zwar nicht belegt, wird jedoch als biologisch sinnvoll angesehen und von den Autoren empfohlen. Eine allgemein anerkannte, durch prospektive Studien abgesicherte Standardchemotherapie ist jedoch nach wie vor nicht etabliert (HIDDEMANN ET AL. 2004).

1.1.6 Ätiologie und Pathogenese

Lymphome stammen von transformierten Lymphozyten ab und damit von Zellen, die vermehrt Noxen (bakteriell, chemisch, physikalisch) ausgesetzt sind. Zudem sind die Lymphozyten genetisch instabiler, da sie rasch proliferieren und präformierte genetische Schwachstellen aufweisen, die durch die somatische Rekombination und Mutation der T-Zell-Rezeptorgene bedingt sind. Eine große Anzahl von experimentellen und klinischen Arbeiten liefert Hinweise darauf, dass zum einen Immunsuppression, Immundysfunktion und Autoimmunerkrankungen,

zum anderen Expositionen gegenüber spezifischen Noxen wie Chemikalien, Viren oder Bakterien zu einem erhöhten Risiko für die Entstehung maligner Lymphome führen. Zusätzlich spielt die genetische Prädisposition eine wichtige Rolle in der Pathogenese der malignen Lymphome (PFREUNDSCHUH 2004).

Ein Drittel der peripheren T-NHL und beinahe alle NK-Zelltumoren manifestieren sich extranodal (GREER ET AL. 2001). Chronische virale, bakterielle oder allergene Antigenstimuli in verschiedenen extranodalen Regionen wie Darm, Haut oder Nase führen zur Ansammlung von T-Zellen mit Affinität zu diesen Regionen. Diese chronische Entzündung begünstigt genetische Veränderungen, die letztlich zu einer malignen Entartung führen. So wird bei der ATLL dem humanen T-Zell-Leukämie-Virus Typ 1 (HTLV1, TAJIMA ET AL. 1987) und bei dem nasalen NK-/T-Zell-Lymphom dem Epstein-Barr-Virus (EBV, CHAN A ET AL. 1999) eine wichtige pathogenetische Bedeutung zugeschrieben. Ein Beispiel für eine chronische allergische Stimulation ist das Gluten, das eine Zöliakie verursacht und bei Patienten in Verbindung mit genetischen Veränderungen zur Entstehung eines intestinalen T-Zell-Lymphoms beitragen kann. Die Pathogenese der peripheren T-Zell-Neoplasien auf molekularer Ebene ist noch weitgehend ungeklärt. Die einzige periphere T-Zell-Neoplasie mit einer gut charakterisierten Pathogenese ist das anaplastische großzellige T-Zell-Lymphom (ALCL). Für diese Entität konnte in den 80er-Jahren gezeigt werden, dass das ALCL mit einer balancierten chromosomalen Translokation $t(2;5)(p23;q35)$ assoziiert ist (MASON ET AL. 1990; BITTER ET AL. 1990). Diese Translokation führt zur konstitutionellen Expression eines Fusionsproteins mit Tyrosinkinaseaktivität, (*NPM-ALK*), welches über Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege zur malignen Transformation der Lymphozyten führt (KUTOK UND ASTER 2002). Die beschriebene Translokation wird in ungefähr 75 % aller ALK-positiven ALCL-Fälle gefunden (DUYSTER ET AL. 2001). In den verbleibenden 25 % der Fälle können verschiedene Rearrangements von 2p23 gefunden werden. Diese seltenen Rekombinationen führen zu einer Fusion von ALK mit verschiedenen Partnergenen (DREXLER ET AL. 2000).

1.2 Zytokine und ihre Bedeutung bei malignen Lymphomen

Im komplexen Zusammenspiel zwischen den Komponenten des Immunsystems spielen Zytokine eine essenzielle Rolle. Zytokine sind von Zellen sezernierte Protein- und Peptidfaktoren, die nach ihrer Bindung an den entsprechenden Rezeptor pleiotrope Reaktionen auslösen können. Diese können entweder autokrin auf die sezernierende Zelle selbst oder aber parakrin auf andere Zellen wirken. Zytokine werden allgemein eingeteilt in die Familie der Interleukine, Interferone, Tumornekrosefaktoren. Ihre Aufgabe in der Regulation schließt wichtige Prozesse, wie die Kontrolle zellulärer und humoraler Immunantworten, Entzündung, die Angiogenese und andere ein.

Zytokine spielen sowohl bei der Erzeugung einer proinflammatorischen als auch einer antiinflammatorischen Immunantwort eine kritische Rolle. So werden zum Beispiel Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ als proinflammatorisch angesehen, während Zytokine wie IL-10 antiinflammatorisch

wirken. Daneben wirken Zytokine wie Il-4 als wichtige Regulatoren der Th1/Th2- Immunantwort.

- Maligne Lymphome sind durch Störungen der normalen Proliferation und Differenzierung von Zellen des Immunsystems gekennzeichnet. Zytokine und Zytokinrezeptoren sind zentrale Regulatoren dieser Prozesse, daher ist ihre Beteiligung an der Transformation von Zellen wahrscheinlich.
- Im Hinblick auf die tief greifenden biologischen Effekte der Zytokine ist es nicht überraschend, dass ihre Aktivität eng reguliert wird. Zytokine werden nur synthetisiert, wenn sie benötigt werden (WHICHER UND EVANS 1990; AKIRA ET AL. 1990). Es ist davon auszugehen, dass im Lymphom — entweder in den Lymphomzellen selbst oder/und in den lymphominfiltrierenden Immunzellen — diese strengen Regulierungsmechanismen außer Kraft gesetzt sind und dadurch bestimmte Zytokine kontinuierlich sezerniert werden. Durch die autokrine und parakrine Sekretion solcher Zytokine könnten Tumorzellen ihr Wachstum selbst stimulieren und sich so unabhängig vom exogenen Kontrollmechanismus machen. Die von Lymphomzellen ausgeschütteten Zytokine induzieren nicht nur eine zelluläre Reaktion, sondern rekrutieren auch weitere Zellen zur Produktion von weiteren Zytokinen. Diese parakrine Sekretion von Zytokinen durch reaktive Zellen in der Umgebung des Tumors könnte einen weiteren Wachstumsvorteil für die Tumorzellen darstellen. Beispiele für einen autokrinen Wachstumseffekt konnten in verschiedenen Studien gezeigt werden (MERZ ET AL. 1991; JÜCKER ET AL. 1991). Auch parakrine Effekte auf das Lymphomwachstum sind beschrieben (KADIN 1990; DANCESCU ET AL. 1992).
- B-Symptome wie Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust werden häufig bei malignen Lymphomen beobachtet. Diese systemischen Symptome, die auch prognostische Bedeutung haben, könnten durch besonders intensive Produktion bestimmter Zytokine — entweder durch Lymphomzellen oder durch reaktive Zellen — hervorgerufen sein. An den typischen Veränderungen verschiedener Laborwerte bei Lymphompatienten sind vermutlich ebenfalls bestimmte Zytokine beteiligt. So ist der prognostisch wichtige LDH-Wert nicht nur Ausdruck von Tumorwachstum und -zerfall, sondern spiegelt auch die Immunreaktion zwischen Wirt und Lymphom wider (TRACEY ET AL. 1988). Auch die polyklonale Hypergammaglobulinämie, hämolytische Anämie sowie zirkulierende Immunkomplexe und Kälteagglutinine können wohl auf eine dysregulierte humorale Immunreaktion zurückgeführt werden.
- Zytokine tragen zum charakteristischen histopathologischen Erscheinungsbild der Lymphome bei. Verschiedene Formen der Lymphome mit gleichem zellulären Ursprung könnten durch die Heterogenität der Zytokinproduktion zu erklären sein. Beim Fortschreiten eines Lymphoms unterliegen die Zellen zunehmend chromosomalen Änderungen und werden in Bezug auf ihre biologischen Eigenschaften diversifiziert. Dies führt dazu, dass jedes Lymphom ein eigenes Zytokinexpressionsmuster aufweist. Diese ausgeschütteten

Zytokine können reaktive Zellen anlocken, die ihrerseits bestimmte Zytokine produzieren. So entsteht ein einzigartiges Mikromilieu, das für das spezielle histologische Bild verantwortlich ist. Andererseits könnte die Heterogenität der Zytokinproduktion selbst in der Ausprägung der Mikroumgebung des umgebenden Gewebes begründet sein, die sich durch eine interindividuell unterschiedliche Abwehrreaktion ergibt (HSU S ET AL. 1993).

- Es ist anzunehmen, dass in den meisten Fällen weder das Tumorzellwachstum noch die assoziierten klinischen und histopathologischen Veränderungen über die Wirkung eines einzelnen oder weniger Zytokine erklärt werden können. Diese Veränderungen gehen eher auf eine abnorme Sekretion mehrerer Zytokine durch neoplastische Zellen und auch reaktive Zellen zurück (HSU S ET AL. 1993).
- Lymphompatienten zeigen häufig eine signifikante Verminderung der zellulären Immunantwort. Die Mechanismen der Immunsuppression, die bei T-NHLs beobachtet werden, sind wie bei anderen Lymphomen komplex. Es wird angenommen, dass der Immundefekt durch eine zytokinvermittelte Hemmung der zellulären Immunantwort hervorgerufen wird (KIM E ET AL. 2005).
- Zytokine und ihre Rezeptoren werden in zahlreichen Studien mit lymphoproliferativen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. So konnten bei Patienten mit malignen Lymphomen erhöhte Serumkonzentrationen von bestimmten Zytokinen und löslichen Rezeptoren nachgewiesen werden (METKAR ET AL. 2000; TRÜMPER ET AL. 1994). In klinischen Studien konnte belegt werden, dass erhöhte Serumspiegel von bestimmten Zytokinen mit der Prognose bei Patienten mit malignen Lymphomen korrelieren. Interindividuelle genetische Variationen können die Funktion und Sekretion von Zytokinen und den Rezeptoren beeinflussen. So konnten kürzlich publizierte Studien zeigen, dass Genvariationen einiger Zytokine mit der Suszeptibilität für Lymphome korrelieren, so z. B. TNF oder IL-4. Weiterhin wurden einige der Polymorphismen assoziiert mit der Prognose von Lymphompatienten (LAN ET AL. 2006; ROTHMAN ET AL. 2006; WARZOCHA ET AL. 1998).

1.3 Genetische Polymorphismen in Zytokingenen und Zytokinrezeptorgenen

Den International Human Genome Project (HGP) und Celera Genomics Corporation gelang es bis zum Jahre 2001, nahezu alle DNA-Bausteine des menschlichen Genoms vollständig zu sequenzieren. Auf Basis dieser Daten wird systematisch nach krankheitsrelevanten Genen und deren Variationen gefahndet. Durch den Vergleich der Genome zweier beliebiger Individuen wurden genetische Variationen genomweit beschrieben (CHAKRAVARTI 1999). Die häufigste genetische Variation ist der einfache Basenaustausch (single nucleotide polymorphisms, SNP), bei dem es zum Austausch eines Basenpaares im DNA-Strang kommt. Nach Schätzungen

der International SNP Map Working Group existieren ungefähr elf Millionen SNPs (SACHIDANANDAM ET AL. 2001). Zehn Millionen dieser SNPs sind bereits bekannt (HINDS ET AL. 2005). Der größte Teil der SNPs hat keine Auswirkungen auf den Phänotyp. Nur ein kleiner Teil der identifizierten Polymorphismen wirkt sich phänotypisch aus und ist vermutlich für Krankheitsentstehungen relevant. SNPs, die in der kodierenden Region lokalisiert sind, können zu einem Aminosäureaustausch führen und sind damit in der Lage, die Struktur und Funktion des Proteins zu verändern. Ein Polymorphismus, der eine Änderung der Proteinfunktion bewirkt, kann die Entstehung und den Verlauf einer Erkrankung beeinflussen. Es ist außerordentlich schwierig, aus der hohen Zahl der SNPs diejenigen zu ermitteln, die die Entstehung bestimmter Krankheiten begünstigen. Es gibt Hinweise darauf, dass einige Polymorphismen die Expression sowie die Funktion der Zytokine bzw. Rezeptoren beeinflussen könnten. In zahlreichen Arbeiten wurde gezeigt, dass Genvariationen mit dem Risiko und dem Verlauf von bestimmten Krankheiten assoziiert sein können (CHANOCK 2001). Zytokin- und Zytokinrezeptor-Genvariationen sind bereits intensiv bei Infektions- und Autoimmunerkrankungen analysiert worden. Erst später kamen Studien zu Tumorerkrankungen, darunter auch Lymphome, hinzu (HOLLEGAARD UND BIDWELL 2006).

1.4 IL-4 und der IL-4-Rezeptor

1.4.1 IL-4

IL-4 reguliert als Schlüsselzytokin die T-Zell-Differenzierung, indem es die Differenzierung der T-Helferzelle zur Th2-Zelle induziert und die Th1-Immunantwort supprimiert. Sezerniert von Th2-Zellen ist IL-4 für die Ausprägung und Aufrechterhaltung der Th2-Immunantwort verantwortlich.

1.4.2 Der IL-4-Rezeptor

1.4.2.1 Struktur und Funktion des IL-4-Rezeptors

IL-4 vermittelt seine biologische Wirkung durch die Bindung an den IL-4-Rezeptor. Der funktionelle IL-4-Rezeptor ist ein heterodimerer Rezeptorkomplex, der aus einer IL-4-Rezeptor- α -Kette und einer akzessorischen Komponente besteht. In Abhängigkeit von der akzessorischen Komponente werden zwei verschiedene IL-4R-Typen definiert. Der Typ-I-Rezeptorkomplex besteht aus der IL-4R- α -Kette und der $c\gamma$ -Kette (common gamma chain) (LETZELTER ET AL. 1998). Diese Kette ist auch Bestandteil der Rezeptoren für IL-2, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21. Für hämatopoetische Zellen wurde ausschließlich der Typ-I-Rezeptor-Komplex nachgewiesen (NELMS ET AL. 1999). Der Typ-II-Heterodimerkomplex wird aus der IL-4R- α -Kette in Kombination mit der IL-13R- α 1-Kette gebildet. Im Gegensatz zum Typ-I-Rezeptor kommt der IL-4R vom Typ II auf nicht hämatopoetischen Zellen vor (MURATA ET AL. 1998).

Im ersten Schritt erfolgt die Bindung von IL-4 an die IL-4R- α -Kette. Diese Bindung zeichnet sich durch eine besonders hohe Affinität aus, die fast die gesamte Bindungsaffinität des

Komplexes ausmacht. In einem zweiten Schritt bindet der IL-4/IL-4R- α -Komplex an die akzessorische IL-4-Rezeptorkomponente, wobei die Affinität sehr niedrig ist. Jedoch ist diese Bindung essenziell für die Aktivierung der Signaltransduktion (NELMS ET AL. 1999).

1.4.2.2 IL-4R- α -Kette

Die Klonierung der cDNA von der IL-4R- α -Kette führte zu einer ersten Charakterisierung ihrer Funktionsweise (IDZERDA ET AL. 1990; GALIZZI ET AL. 1990). Die IL-4R- α -Kette ist ein 140-kDa-Glykoprotein, bestehend aus 800 Aminosäuren. Das Vorläufermolekül trägt ein 25 Aminosäuren langes Signalpeptid (MIYAJIMA ET AL. 1992). Der extrazelluläre Teil besteht aus 207 Aminosäuren und besitzt die für die Hämatoopoetin-Rezeptorfamilie typischen zwei Merkmale: vier hochkonservierte Cysteinreste in der membrandistalen Domäne und das Aminosäuremotiv WSxWS in der membranproximalen Domäne, wobei x für eine nicht konservierte Aminosäure steht (W-Tryptophan, S-Serin).

Der transmembranäre Teil besteht aus 24 Aminosäuren, das zytoplasmatische Fragment ist 569 Aminosäuren lang. Letzteres weist im Gegensatz zur extrazellulären Domäne nur in wenigen kurzen Fragmenten Sequenzhomologien mit anderen Zytokinrezeptoruntereinheiten auf (DUSCHL UND SEBALD 1996). Daher ist über die Funktionsweise dieser Domäne nur wenig bekannt. In zahlreichen Studien wurde der funktionelle Aufbau des intrazellulären Teils von IL-4R untersucht, und es zeigen sich vier für die Signalvermittlung bedeutende Regionen:

I4R-Motiv (Insulin-IL-4 Rezeptor-Motiv): Die Sequenz wird so genannt, weil sie eine große Homologie zu Sequenzen der zytoplasmatischen Domäne des Insulinrezeptors besitzt. Sie liegt zwischen der Aminosäure 412 und 532. Das Motiv ist für die Aktivierung von IRS-1/2 und der damit verbundenen IL-4-induzierten Aktivierung der Proliferation verantwortlich. Besonders bedeutend ist der stark konservierte zentrale Tyrosinrest Y472, der von dem I4R-Motiv umgeben ist. IRS-1/2 (Insulin Receptor Substrate)-Moleküle binden an das phosphorylierte 472Y mithilfe einer N-terminalen PTB-Domäne (GUSTAFSON ET AL. 1995). Die Substitution des Tyrosins durch Phenylalanin blockiert den IRS-1/2-Signalweg, da in der IL-4R- α -Kette an der Position 472 nun keine Phosphorylierung mehr stattfinden kann. Weiterhin sind die Reste L464, P463, I466 im I4R-Motiv für die Interaktion mit IRS-2 notwendig (WANG H ET AL. 1996; ZAMORANO ET AL. 1996).

STAT6-Region: Die Region liegt zwischen den Aminosäuren 533 und 632 und enthält drei konservierte Tyrosinreste: Y550, Y578 und Y606. Die Aminosäuren, welche die Tyrosine unmittelbar umgeben, sind GYK/QXF (Y550 in GYQEF, Y578 in GYKAF, Y606 in GYKPF). STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription) bindet an diese phosphorylierten Tyrosinreste über seine SH2-Domäne und wird dadurch aktiviert. Dieser Signalweg vermittelt die IL-4-induzierte Genexpression (RYAN ET AL. 1996; WANG H ET AL. 1996).

Box-1-Region: Sie bindet und aktiviert JAK-Moleküle. Sie beginnt 237 Aminosäuren vom Start des reifen Proteins und hat die Sequenz WWDXIPXP (HARADA ET AL. 1998).

ID-1-Region: Diese Region liegt zwischen Aminosäuren 328 und 368 und ist sowohl für die Proliferation wie auch für die STAT6-Aktivierung als Antwort auf IL-4 essenziell (HARADA ET AL. 1998; SCHULTZ ET AL. 1995).

1.4.2.3 Signaltransduktion des IL-4-Rezeptors

Ein wichtiges Merkmal aller Hämatoopoetinrezeptoren ist das Fehlen einer intrinsischen Tyrosinkinase-aktivität der Rezeptorketten. Trotzdem werden der Rezeptor und diverse zytoplasmatische Proteine nach Bindung von IL-4 an den Rezeptorkomplex phosphoryliert. Vermittelt wird dies über Tyrosinkinasen, die mit den Rezeptorketten assoziiert sind. Im Falle des IL-4R-Komplexes sind das die Januskinasen JAK1 und JAK3 (MIYAZAKI ET AL. 1994), die konstitutiv an die Homologie-Box 1 in der membranproximalen Region der beiden Rezeptorketten gebunden sind (IHLE UND KERR 1995). Dabei ist JAK1 mit der IL-4R- α -Kette assoziiert, JAK3 mit der $c\gamma$ -Kette. Die Bindung von IL-4 führt zur Heterodimerisierung der Rezeptorketten und triggert so die Autophosphorylierung und Aktivierung der Januskinasen. Diese wiederum können jetzt Tyrosinreste der intrazellulären Domäne der IL-4R- α -Kette phosphorylieren, wodurch Bindungsstellen für verschiedene zytoplasmatische Signalproteine entstehen, die ihrerseits durch die Januskinasen phosphoryliert werden. Zwei Wege für die IL-4R-Signaltransduktion wurden beschrieben (NELMS ET AL. 1999). Wird der einzelne Tyrosinrest Y497 im schon erwähnten I4R-Motiv phosphoryliert, können hier IPS1 bzw. 4PS/IRS2 ankoppeln und ihrerseits durch die Januskinasen phosphoryliert werden (SUN ET AL. 1995). Da das früher als 4PS (IL-4 induced phosphotyrosin substrates) bezeichnete Molekül (CHOMARAT UND BANCHEREAU 1997) wesentliche Strukturmerkmale zum IRS-1, dem wichtigsten Phosphorylierungssubstrat der Rezeptoren für Insulin und IGF, aufweist, wurde es später als IRS-2 bezeichnet (SUN ET AL. 1995). Phosphoryliertes IRS2 kann verschiedenen SH2-Domänen enthaltende Signalmoleküle binden, was zu einer Aktivierung von Genen führt, die für die Proliferation der Zelle verantwortlich sind (SUN ET AL. 1995). Der Transkriptionsfaktor STAT6 bindet in der Region der schon beschriebenen C-terminal gelegenen Tyrosinreste Y575, Y603 und Y631. Zwei STAT6-Moleküle können nach ihrer Phosphorylierung dimerisieren, translozieren in den Zellkern und binden dort an die Promotorregion von Genen, deren Expression durch IL-4 hochreguliert wird, z. B. VCAM-1, Eotaxin, MCP-1, MCP-3, MHC-Klasse II, IgE, IgG1, IL-4R- α -Kette (MALERBA UND PIGNATTI 2005).

1.4.3 Polymorphismen im IL-4R-Gen

1.4.3.1 Einteilung der genetischen Variationen

Das Gen des IL-4 Rezeptors liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 16 im Bereich der Bande 11.2-12.1 (PRITCHARD ET AL. 1991). IL-4R wird von insgesamt zwölf Exons kodiert. Das translatierte IL-4R-Protein beinhaltet ein Signalpeptid (Exon 3- 4), eine extrazelluläre Domäne (Exon 5- 7), eine transmembranäre Domäne (Exon 9) und eine intrazelluläre Domäne (Exon 10-12). Exon 1 und 2 sind nicht translatierte Exons, Exon 8 ist nur in der löslichen, durch alternatives Splicing entstandenen, Form enthalten (KRUSE ET AL. 1999a).

Das humane IL-4R-Gen ist hoch polymorph. Nach Entdeckung der ersten Punktmutationen (single-nucleotid-polymorphisms) im kodierenden Teil von IL-4R im Jahr 1997 (DEICHMANN ET AL. 1997; HERSHEY ET AL. 1997) werden heute insgesamt 16 SNPs in der kodierenden Region beschrieben (OBER ET AL. 2000; WU ET AL. 2001). Von diesen 16 SNPs führen zehn zu einem Aminosäureaustausch, sind also nicht synonyme SNPs. Im Abschnitt des IL-4R-Gens, welcher für den intrazellulären Teil des IL-4R-Proteins kodiert, befinden sich im Exon 12 neun nicht synonyme Varianten, in dem Abschnitt für den extrazellulären Teil im Exon 5 eine nicht synonyme Variante (I50V). Zwei weitere SNPs (T-890C, T-1914C) und ein short-tandem-repeat [(CAAAA)₅₋₇ 3600] konnten in der 5'-Promotorregion von IL-4R nachgewiesen werden (HACKSTEIN ET AL. 2001). Im nicht kodierenden Bereich wurden ebenfalls zahlreiche SNPs identifiziert (SHERRY ET AL. 2001). Die genomische Struktur des IL-4R-Gens inklusive der nicht synonymen SNPs illustriert Abbildung 1.1.

Die Nomenklatur der SNPs richtet sich nach den Empfehlungen der „Nomenclature Working Group“ (ANTONARAKIS 1998), nach denen für Polymorphismen mit Aminosäureaustausch der AS-Einzelbuchstabencode verwendet wurde. Die Wildtyp-Aminosäure befindet sich vor der Kodonnummer, die mutierte Aminosäure dahinter, wobei sich die Kodonnummern auf die cDNA des reifen Proteins beziehen. Die IL-4R-Sequenz von IDZERDA gilt als Wildtyp und Abweichungen davon als Mutationen (IDZERDA ET AL. 1990).

Die Tabelle 1.2 zeigt SNPs im kodierenden Teil des IL-4R-Gens mit der jeweiligen cDNA-Position, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Tabelle 1.2: Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten SNPs im IL-4R-Gen (nach SHERRY ET AL. 2001)

SNP	rs-Nummer	Sequenz	Allelfrequenz	
			Wildtyp	Mutation
I75V	rs1805010	CGTGT(A/G)TCCCT	56,0 %	44,0 %
S503P	rs1805015	GCAAC(T/C)CCCTG	73,9 %	26,1 %
Q576R	rs1801275	CTATC(A/G)GGAGT	71,6 %	28,4 %

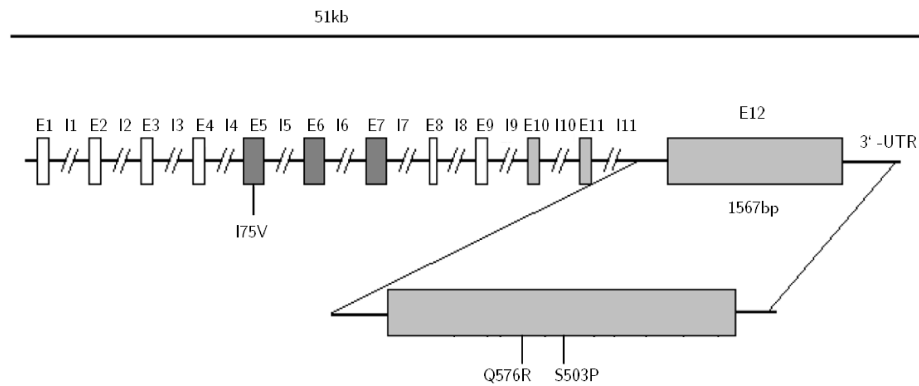


Abbildung 1.1: Aufbau der genomischen Struktur des Interleukin-4-Rezeptor-Gens. Das Gen besteht aus 12 Exons (E1-E12) und 11 Introns (I1-I11). E1-E2 werden nicht translatiert. E3-E4 kodieren das Signalpeptid, E5-E7 die extrazelluläre Domäne, E9 die transmembranäre Region und E10-E12 die intrazelluläre Domäne. Exon 8 ist nur im löslichen, durch alternatives Splicing entstandenen IL-4R enthalten. Dargestellt ist die Lokalisation der untersuchten SNPs, welche in den Exons 5 und 12 lokalisiert sind (nach WU ET AL. 2001, S. 129).

1.4.3.2 Genetische Assoziationsstudien

Die Genpolymorphismen des IL-4R-Gens wurden in zahlreichen Studien auf Assoziationen mit verschiedenen Krankheiten untersucht. Die meisten Assoziationsanalysen wurden dabei mit den IL-4R-Varianten Q576R, I75V, S503P durchgeführt. Es wurden mehrere Studien über die genetische Assoziation von SNPs im IL-4R-Gen mit *Atopie*-Phänotypen publiziert (HERSHEY ET AL. 1997; ANDREWS ET AL. 2001; HOWARD ET AL. 2002). Insgesamt bleiben die Ergebnisse der genetischen Assoziationsstudien im Hinblick auf die *Atopie* jedoch kontrovers.

In einer Studie zu Ergebnissen bei *Organtransplantationen* konnte mittels Kaplan-Meier-Analyse in einer Gruppe von 156 nierentransplantierten Patienten eine Assoziation von R576 mit einem verringerten Transplantatüberleben festgestellt werden (HACKSTEIN ET AL. 1999). In einer Studie von KANEMITSU ET AL. wurde bei Patienten mit *systemischem Lupus erythematodes* (SLE) über ein häufigeres Vorkommen der SNPs R576 und I75 im Vergleich zu Kontrollprobanden berichtet (KANEMITSU ET AL. 1999). Als Erklärung wurde eine gesteigerte IL-4-Rezeptor-Funktion durch diese Varianten postuliert. Dadurch würde ein Th2-dominantes Milieu erzeugt, das zu einer Autoantikörperproduktion führt (HACKSTEIN ET AL. 1999). Auch YOUN ET AL. konnten eine Assoziation der R576-Variante zum *systemischen Lupus erythematodes* nachweisen (YOUN ET AL. 2000). Der SNP R576 war in den funktionellen Analysen mit einer gesteigerten Expression von CD23 bei den SLE-Patienten assoziiert.

Eine weitere Assoziation zeigte sich auch zur *Progressiven systemischen Sklerodermie* und zum *Sjögren-Syndrom*. Die Studie von DALEY ET AL. zeigte eine Assoziation von R576 zur mildereren, kutan limitierten Form der *Mastozytose* im Vergleich zur Mastozytoseform mit Knochenmarkbeteiligung (DALEY ET AL. 2001). Da die unphysiologische Vermehrung von

Mastzellen durch IL-4 gebremst werden kann, wurde eine signalverstärkende Funktion der R576-Variante auf den IL-4-Rezeptor postuliert (DALEY ET AL. 2001). Bei Patienten mit *rheumatoider Arthritis* fand sich in einer Studie von PROTS kein Unterschied im Genotyp in Bezug auf die untersuchten SNPs (I75V und Q576R) in Hinblick auf die Inzidenz der Erkrankung. Es konnte jedoch ein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Verlauf (erosive Form vs. nicht erosive Form) festgestellt werden (PROTS ET AL. 2006). Andere Studien konnten Assoziationen verschiedener SNPs mit der *bronchopulmonalen Aspergillose* (KNUTSEN ET AL. 2006), sporadischem *Nierenzellkarzinom* (NAKAMURA ET AL. 2002) und *Typ-1-Diabetes* belegen.

Zusammenfassend verdeutlichen diese Assoziationen der IL-4-Rezeptor-Genpolymorphismen mit verschiedenen entzündlichen, autoimmunassoziierten und malignen Erkrankungen, dass die genetischen Variationen tatsächlich funktionelle und klinische Relevanz haben könnten.

1.4.3.3 Funktionelle Bedeutung der Genpolymorphismen für die Signaltransduktion des IL-4-Rezeptors

Zur Untersuchung des funktionellen Einflusses des Aminosäureaustausches auf die Signaltransduktion des IL-4-Rezeptors wurden mehrere in-vitro-Expressionsstudien durchgeführt. Ein zentraler Marker für die Signalweiterleitung im IL-4-Rezeptor stellt die IL-4-induzierte CD23-Expression auf der Zelloberfläche verschiedener Zellen dar.

Die beiden Varianten Q576R und S503P verursachen Aminosäureaustausche an kritischen Bindungsstellen des IL-4-Rezeptors für intrazelluläre Proteine. Diese Tatsache macht eine Beeinflussung der Signaltransduktion wahrscheinlich. P503 führt nahe der Bindungsregion des I4R-Motivs zu einem Austausch von Serin nach Prolin. R576 führt zu einem Austausch von Glutamin nach Arginin in der Nähe des Tyrosinrests auf Position 576 und könnte so möglicherweise die Bindungsspezifität des angrenzenden Tyrosinrestes zu den Signaltransduktionsmolekülen STAT6 und SHP-1 ändern (KRUSE ET AL. 1999b; HERSHEY ET AL. 1997).

Der I75V-Polymorphismus ist assoziiert mit verstärkter STAT6-Aktivierung nach Stimulation mit IL-4 (MITSUYASU ET AL. 1998). Eine weitere Studie konnte ebenfalls eine erhöhte STAT6-abhängige Transkriptionsaktivität nachweisen. Eine Beeinflussung der Th1/Th2-Differenzierung der T-Lymphozyten durch die Genvariante konnte jedoch nicht gezeigt werden (STEPHENSON ET AL. 2004).

1.4.4 Löslicher IL-4-Rezeptor

Zusätzlich zu dem 140 kDa großen transmembranen Glykoprotein wurde ein 40 kDa großer löslicher IL-4-Rezeptor identifiziert. Die lösliche Form kann entweder durch die limitierte Proteolyse an der Zelloberfläche mittels einer Metalloproteinase resultieren (JUNG ET AL. 1999) oder durch alternatives mRNA-Splicing gebildet werden (KRUSE ET AL. 1999a). Verglichen mit dem Transmembranrezeptor bindet der lösliche IL-4-Rezeptor IL-4 mit ähnlicher Affinität. Der lösliche IL-4-Rezeptor besitzt keine Signalfähigkeiten, und es wird vermutet, dass dieser als Antagonist für IL-4 fungiert, indem er IL-4 bindet und so die Bindung an Zielzellen

hemmt. Somit stellen die löslichen IL-4-Rezeptoren Regulatorproteine in der IL-4-Aktivität dar (JUNG ET AL. 1999; BERGIN ET AL. 2006).

1.4.5 Bedeutung von IL-4 und des IL-4-Rezeptors für Lymphome

T-Zellen benötigen normalerweise in vitro endogene und exogene Zytokine für ihr Wachstum. In mehreren Studien wurde nachgewiesen, dass T-Lymphozyten, die IL-2, IL-4 oder IL-9 produzieren, jedoch unabhängig von exogenen Zytokinen wachsen können (TWEEDDALE ET AL. 1989; UYTENHOVE ET AL. 1991; NOMA ET AL. 1989). Insbesondere das Zytokin IL-4 nimmt dabei eine wichtige Rolle ein. So konnte PAUL nachweisen, dass IL-4 von aktivierten T-Zellen sezerniert wird und einen autokrinen T-Zell-Wachstumsfaktor darstellt (PAUL 1991). In-vitro-Studien haben gezeigt, dass IL-4 auch das potenteste Zytokin bei der Vermittlung von Proliferation und Wachstum *maligner* T-Zellen darstellt (RAZIUDDIN ET AL. 1998).

Das AILT-T-Zell-Lymphom exprimiert IL-4 deutlich häufiger als andere T-Zell-Lymphomsubtypen. OHNISHI ET AL. vermuteten, dass das von neoplastischen T-Zellen sezernierte IL-4 für die große Vielfalt der Hintergrundzellen (Plasmazellen, Eosinophile) im histopathologischen Bild verantwortlich ist (OHNISHI ET AL. 1990).

Es gibt Hinweise darauf, dass bei kutanen T-Zell-Lymphomen eine permanente Aktivierung der malignen T-Zellen vom Th2-Typ vorliegt. So konnten ZHANG ET AL. bei Mycosis fungoides und dem Sézary-Syndrom eine konstitutive Aktivierung von STAT3 in diesen Zellen nachweisen (ZHANG ET AL. 1996). Der genaue Auslöser für diesen Mechanismus ist unbekannt (ASADULLAH ET AL. 1996; KARI ET AL. 2003; HSU S ET AL. 1994; VOWELS ET AL. 1994; VOWELS ET AL. 1992). Die konstitutive Aktivierung von diesen hautständigen, reifen CD-4-T-Zellen bewirkt ein Th2-Zytokin-Expressionsmuster und folglich eine Fehlregulation der Immunantwort. So konnte bei Patienten mit fortgeschrittenem kutanen T-Zell-Lymphom neben der erhöhten Th2-Zytokinproduktion ein Defekt in der Th1 Immunantwort nachgewiesen werden. (VOWELS ET AL. 1992; WYSOCKA ET AL. 2002) Dies wird so erklärt, dass die gesteigerte Th2-Zytokin-Produktion, insbesondere von IL-4 und IL-10, durch die aktivierten, malignen T-Zellen die Th1-Immunreaktion supprimiert und auf diese Weise zum Fortschreiten des Tumors beiträgt. Dies ist ein Mechanismus, der erklären könnte, auf welche Art und Weise die Tumorzellen das Immunsystem umgehen (KIM E ET AL. 2005).

IL-4 scheint eine zentrale Rolle beim Fortschreiten der Tumors zu spielen.

Charakteristische immunologische Befunde, die mit einem Krankheitsfortschritt verbunden sind, sind die Entwicklung einer peripheren Eosinophilie und erhöhte Serumwerte von IgE (WYSOCKA ET AL. 2002). Insbesondere die periphere Eosinophilie wurde als ein unabhängiger Prognosefaktor für einen ungünstigen Verlauf identifiziert (TANCRÈDE-BOHIN ET AL. 2004). Diese Befunde könnten auf die vermehrte Produktion von IL-4 im fortgeschrittenen Stadium zurückzuführen sein, denn IL-4 ist essenziell für die Proliferation der eosinophilen Granulozyten und für den Isotyp-Switch zu IgE.

PAPADAVID konnte zeigen, dass zytoplasmatisches IL-4 bei Patienten mit fortgeschrittenem kutanen T-Zell-Lymphom (CTCL) in höherer Konzentration als bei Patienten mit einer frühen Form von CTCL vorlag. Hingegen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten

in einem frühen Stadium der Erkrankung im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Es ergaben sich jedoch auch bei diesem Vergleich tendenzielle, jedoch keine signifikanten Hinweise auf eine Erhöhung von IL-4 (PAPADAVID ET AL. 2003).

Zusammengefasst zeigen diese Befunde, dass die von IL-4 ausgehende Förderung der Proliferation und der entsprechende Immundefekt das Wachstum von T-Zell-Lymphomen fördern, und einen Einfluss auf die Progression der Erkrankung haben.

1.5 TNF und der TNF-Rezeptor

1.5.1 Tumornekrosefaktor

Tumornekrosefaktor (TNF) ist ein pleiotropes Zytokin und gehört zur TNF-Superfamilie, die mittlerweile insgesamt 19 Mitglieder umfasst. TNF wirkt im Organismus häufig synergistisch mit anderen Zytokinen und ist am Entzündungsprozess, an der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Immunantwort, der Nekrose und der Apoptose beteiligt. Die Ergebnisse vieler Studien der letzten Jahrzehnte liefern Hinweise, dass dieses Zytokin neben seiner wichtigen physiologischen Rolle in viele pathophysiologische Prozesse involviert ist. So konnte ein Einfluss von TNF bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie systemischer Lupus erythematodes, rheumatoide Arthritis oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn nachgewiesen werden. Weiterhin spielt TNF eine wichtige Rolle in der Pathogenese des septischen Schocks und der Kachexie.

Des Weiteren spielt TNF eine wichtige Rolle bei der Entstehung maligner Tumoren. Zwar wurde TNF ursprünglich als ein Zytokin beschrieben, das bei Tumoren eine hämorrhagische Nekrose induziert, nach gegenwärtiger Ansicht gilt TNF jedoch als Wachstumsfaktor für eine Vielzahl von Tumoren. Dabei fördert TNF die Proliferation, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen. TNF aktiviert über TNFR1 den NF- κ B-Signalweg und induziert auf diese Weise die Expression verschiedener Gene, die an Invasion und Metastasierung beteiligt sind. Zusätzlich führt die Aktivierung von NF- κ B zur Unterdrückung der Apoptose, was die Tumorgenese weiter unterstützt (AGGARWAL 2003).

1.5.2 Die TNF-Rezeptoren I und II

1.5.2.1 Struktur und Funktion der TNF-Rezeptoren

Seine biologische Funktion bei der Regulation des Immunsystems und bei pathophysiologischen Prozessen vermittelt TNF durch Interaktion mit TNFR1 und TNFR2. Beim TNFR1 und II handelt es sich um Typ-I-Transmembranproteine, die zur inzwischen 29 Rezeptoren umfassenden TNF-Rezeptor-Superfamilie gehören (HEHLGANS UND PFEFFER 2005). Der TNFR1 ist im Organismus konstitutiv und mit Ausnahme von Erythrozyten und ruhenden T-Zellen ubiquitär exprimiert (ARMITAGE 1994). Dagegen findet man den TNFR2 hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems, wo seine Expression streng reguliert wird (AGGARWAL 2003). Während die Affinität von TNFR2 zum membranständigen TNF viel stärker ist als die des TNFR1, bindet TNFR2 den löslichen TNF-Liganden nur transient mit einer deutlich niedrigeren Affinität und einer sehr kurzen Halbwertszeit (KRIPPNER-HEIDENREICH ET AL. 2002). Der extrazelluläre Teil des TNFR1 besteht aus einer Ligandenbindungsdomäne und vier cysteinreichen Domänen, von denen jede typischerweise drei Cysteinbrücken aufweist (NAISMITH UND SPRANG 1998). Über diese auch als pre-ligand-binding assembly domains (PLAD) bezeichnete Domänen erfolgt die Trimerisierung des inaktiven Rezeptors (CHAN ET AL. 2000). Weiterhin besitzt der TNFR1 eine intrazelluläre Todesdomäne (Death Domain, DD), die zwischen Aminosäure 356 und 441 liegt. Während TNFR2 eine ähnliche

Ligandenbindungsdomäne und cysteinreiche Region wie TNFR1 besitzt, weist der Rezeptor keine Todesdomäne auf und gehört damit zur Gruppe der Non-DD-Rezeptoren innerhalb der TNF-Rezeptor-Superfamilie.

1.5.2.2 Signaltransduktion der TNF-Rezeptoren

Beide Rezeptoren verfügen über verschiedene Signaltransduktionkaskaden. Nach Bindung des Liganden an den TNFR1 kommt es zur Rekrutierung der für die Signaltransduktion benötigten Adapterproteine. Im ersten Schritt wird TRADD über seine Todesdomäne an den TNFR1 rekrutiert (HSU H ET AL. 1995). TRADD dient dann als Plattform für die Bindung weiterer Signalmoleküle wie TRAF 2, RIP-1 sowie FADD. Über die unterschiedlichen Signalproteine können unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert werden. So kann RIP1 und TRAF 2 über die Aktivierung von NF- κ B und MAP-Kinasen zur Expression proinflammatorischer, proliferativer und anti-apoptotischer Gene führen. Dagegen kann das Adapterprotein FADD über die Aktivierung von Caspasen die Apoptose induzieren.

Die Signaltransduktion des TNFR2 ist noch weitgehend unerforscht. TNFR2 besitzt keine Todesdomäne und ist daher nicht in der Lage, die apoptotische Caspasen-Kaskade direkt zu aktivieren. Er besitzt jedoch eine direkte Bindungsstelle für das Adaptermolekül TRAF2, das sowohl die NF- κ B-Signalweg als auch die JNK zu induzieren vermag (HELMS ET AL. 2001; JUPP ET AL. 2001; WAJANT UND SCHEURICH 2001).

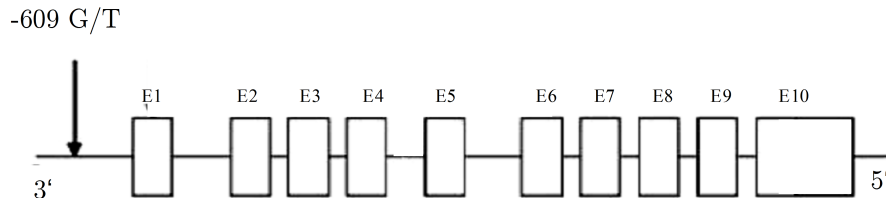
1.5.3 Promotorpolymorphismus -609 G/T im TNFR1

1.5.3.1 Einteilung der genetischen Variation

Das Gen für TNFR1 befindet sich auf Chromosom 12p13.2. Es besteht aus zehn Exons, die insgesamt 455 Aminosäuren kodieren (siehe Abbildung 1.2). Eine 809 Basenpaare umfassende Region am 5'-Ende des Gens scheint bei der Regulierung der Gentranskription aktiv zu sein. Innerhalb dieser genregulatorischen Sequenz liegt zwischen Basenpaar -385 und -207 eine C- und T- reiche Region, die eine Promotoraktivität aufweist, was in Deletionsanalysen gezeigt werden konnte. Dabei entspricht der Promotor dem eines Housekeeping-Gens. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass die Transkription an mehreren Startpunkten beginnt und sie keine typischen TATA- oder CCAAT- Motive enthalten. Die Basensequenz oberhalb des Promotors zwischen bp -809 und -385 scheint einen hemmenden Einfluss auf die Promotoraktivität auszuüben.

Tabelle 1.3: Übersicht über den in dieser Arbeit untersuchten SNP im TNFRI-Gen (SHERRY ET AL. 2001).

Polymorphismus SNP	Sequenz rs-Nummer	Allelfrequenz Wildtyp Mutation		
			rs-Nummer	Wildtyp
- 609 G/T	rs4149570	GACAG(G/T)TTCAG	69,2 %	30,8 %

**Abbildung 1.2:** Genomische Struktur des TNFRI-Gens mit Darstellung des untersuchten SNPs (nach GORDON ET AL. 2004), S. 637.

Ein Vergleich der 5'-Region des humanen TNFRI-Gens und des entsprechenden Gens bei der Maus konnte Homologien und Unterschiede aufzeigen. Dabei weisen sowohl die humanen als auch die Mausequenzen mit Promotoraktivität deutliche Homologien auf. Andererseits scheinen die supprimierenden Sequenzen oberhalb nur wenige Homologien aufzuweisen (KEMPER UND WALLACH 1993).

In dem humanen TNFRI-Gen wurden bereits verschiedene genetische Polymorphismen einschließlich der SNPs in der Promotorregion beschrieben (PITTS ET AL. 1998; WEINSHENKER ET AL. 1999). Der in dieser Arbeit untersuchte biallelische SNP liegt in der Promotorregion auf Position - 609 (siehe Tabelle 1.3).

1.5.3.2 Genetische Assoziationsstudien

Der -609G/T-Polymorphismus wurde in mehreren Studien auf Assoziation mit verschiedenen Erkrankungen untersucht. KRÜGER ET AL. untersuchte den Einfluss der Polymorphismen +36 und -609 G/T auf das Risiko, an Parkinson zu erkranken. Bei der separaten Analyse der SNPs konnte kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Allel- und Genotyphäufigkeit des -609-G/T-SNPs zwischen der Parkinson-Gruppe und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Bei der Analyse der beiden SNPs in Kombination konnte er jedoch zeigen, dass die Häufigkeit des Haplotypen -609 und +36 in der Kontrollgruppe signifikant höher war als in der Parkinson-Gruppe, was von Krüger als ein protektiver Effekt des Haplotypen gedeutet wurde (KRÜGER ET AL. 2000). In einer Studie zur akuten idiopathischen Uveitis konnte eine Assoziation des -609 SNPs mit dem Auftreten von entzündungsbedingten Komplikationen festgestellt werden (KUO ET AL. 2005). Ferner wurde analysiert, ob das Vorliegen des -609G/T-Allels die Wahrscheinlichkeit der Erkrankung an rheumatoider Arthritis bei Afroamerikanern, Kau-

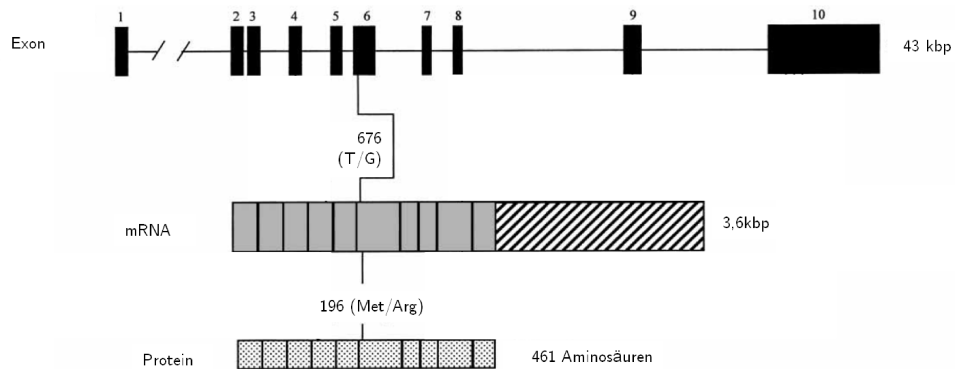


Abbildung 1.3: Genomische Struktur des TNFR1I-Gens mit Darstellung des untersuchten SNPs (nach PANTELIDIS ET AL. 1999).

kasiern und Asiaten beeinflusst. Eine Assoziation wurde zwar nicht aufgezeigt, jedoch konnte ein signifikanter Unterschied in der Allelhäufigkeit zwischen Kaukasiern und Afroamerikanern festgestellt werden (BRIDGES ET AL. 2002).

In weiteren Studien wurde die Beziehung zwischen dem Polymorphismus -609 G/T und der Inzidenz verschiedener Erkrankungen wie beispielsweise der koronaren Herzkrankheit, multiple Sklerose, Lungenkrebs oder Morbus Crohn analysiert. In diesen Arbeiten konnten jedoch keine Assoziationen nachgewiesen werden (WEINSHENKER ET AL. 1999; ALLEN ET AL. 2001; WASCHKE ET AL. 2005).

1.5.3.3 Funktionelle Bedeutung des Genpolymorphismus für die Genexpression

Die zahlreichen Assoziationen des Promotorpolymorphismus mit verschiedenen Erkrankungen deuten daraufhin, dass die genetische Variation funktionell relevant sein könnte. Jedoch ist die genaue funktionelle Bedeutung in experimentellen Studien nur wenig untersucht.

Der SNP -609 G/T liegt in der Promotorregion des Gens, welche die Expression des TNFR1I reguliert. Ein Polymorphismus in dieser Region hat daher potenziell Einfluss auf die Transkriptionsaktivität und damit auf die Konzentration des produzierten Genprodukts, die wiederum eine wichtige Rolle bei der Entstehung oder Progression von Krankheiten und Krebs spielen könnte (KIM J ET AL. 2005).

1.5.4 Polymorphismus M196R im TNFR1I

1.5.4.1 Einteilung der genetischen Variation

Das Gen für TNFR1I liegt auf Chromosom 1p36.2 und umfasst 43 kb. Es besteht aus zehn Exons, die insgesamt 461 Aminosäuren kodieren und von neun Introns unterbrochen werden (siehe Abbildung 1.2). Die ersten 22 Aminosäuren bilden das Signalpeptid für transmembra-

Tabelle 1.4: Übersicht über den in dieser Arbeit untersuchten SNP im TNFR1I-Gen (SHERRY ET AL. 2001).

Polymorphismus		Sequenz	Allelfrequenz	
SNP	rs-Nummer		Wildtyp	Mutation
M196R	rs1061622	AAGCA(T/G)GGATG	80,2 %	19,8 %

ne Proteine, der Aminosäurenbereich 23-251 stellt den extrazellulären Teil des Rezeptors dar. Die Transmembrandomäne des Proteins wird von den Aminosäuren 258-287 und die zytosplasmatische Domäne von den Aminosäuren 288-461 geformt. (SANTEE UND OWEN-SCHAUB 1996; BELTINGER ET AL. 1996). Der in dieser Arbeit untersuchte biallelische SNP liegt im Exon 6 des TNFR1I-Gens und befindet sich auf Position 676 im RNA-Transkript (siehe Tabelle 1.4). Die Änderung des Codons von ATG zu AGG führt zu einem Aminosäureaustausch an Position 196 des Proteins von Methionin (M) zu Arginin (R) (PANTELIDIS ET AL. 1999).

1.5.4.2 Genetische Assoziationsstudien

Seit der Erstbeschreibung des SNP M196R (Met196Arg) sind zahlreiche genetische Kopplungsstudien publiziert worden. In vielen Studien wurde die Beziehung zwischen dem Allel 196Arg und rheumatoider Arthritis untersucht. Dabei konnte aufgezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit, an rheumatoider Arthritis zu erkranken, und der Schweregrad dieser Krankheit bei Japanern, Briten, Kaukasiern und Südeuropäern mit der 196Arg-Variante erhöht ist (CONSTANTIN ET AL. 2004; BARTON ET AL. 2001; DIEUDÉ ET AL. 2002; FABRIS ET AL. 2002; TSUCHIYA ET AL. 2002). Weiterhin deuten einige Forschungsergebnisse darauf hin, dass das Vorliegen des 196Arg-Allels das Risiko und die Schwere von SLE bei Japanern beeinflusst (TSUCHIYA ET AL. 2002; TSUCHIYA ET AL. 2000; KOMATA ET AL. 1999). PERAL ET AL. konnten eine Assoziation der 196Arg-Variante mit dem Hyperandrogenismus und polyzystischem Ovarialsyndrom nachweisen (PERAL ET AL. 2002). SHIMADA ET AL. konnten zeigen, dass die Arg196-Allelhäufigkeit bei Patienten mit chronischer Parodontitis signifikant höher war im Vergleich zu Kontrollprobanden (SHIMADA ET AL. 2004). In der Studie von SANKAR ET AL. wurde die M196-Variante mit dem Risiko für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit assoziiert und daher das 196R Allel als protektiv angesehen (SANKAR ET AL. 2005). MESTIRI ET AL. untersuchten in ihrer Studie den Polymorphismus in Zusammenhang mit der Anfälligkeit für und der Prognose bei tunesischen Patienten mit Brustkrebs (MESTIRI ET AL. 2005). Das 196R-Allel zeigte eine signifikante Assoziation mit erhöhtem OS (overall survival) und DFS (disease-free survival). Andere Studien berichten, dass die Ergebnisse der Knochenmarktransplantation, die Anfälligkeit für Narkolepsie, Morbus Alzheimer und Colitis ulcerosa mit dem SNP assoziieren (HOHJOH ET AL. 2000; ISHIKAWA ET AL. 2002; PIERIK ET AL. 2004; PERRY ET AL. 2001). Insgesamt bleiben die Ergebnisse der genetischen Assoziationsstudien jedoch kontrovers.

1.5.4.3 Funktionelle Bedeutung des Genopolymorphismus für die Signaltransduktion

Der SNP ist in der extrazellulären Teil des Rezeptors lokalisiert. Trotz der unmittelbaren Nähe zu dem Prolinrest Pro211, der in den Shedding-Prozess involviert ist, scheint der Polymorphismus keinen Einfluss auf die proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne zu haben. Auch die Bindungsaffinität zu TNF wird von dem SNP nicht beeinflusst (MORITA ET AL. 2001). Der SNP liegt im Bereich zwischen der vierten cysteinreichen Domäne (CRD4) und der Transmembranregion, der als essenziell für die Clusterbildung der Rezeptortrimere angesehen und der für eine physische Weitergabe des Stimulus nach Ligandenbindung verantwortlich gemacht wird (BANNER ET AL. 1993). Daher wurde die Vermutung aufgestellt, dass der SNP die Proteinkonformation beeinflussen könnte (TILL ET AL. 2005).

In einer In-vitro-Studie wurde die Auswirkung der Genvariante auf die Signaltransduktion des TNFR_{II} untersucht. Die Daten der Studie deuten darauf hin, dass die mutierte 196Arg-Variante eine verminderte Fähigkeit zur Rekrutierung von TRAF2 und dadurch eine ineffizientere Aktivierung des NF- κ B-Signalweges und folglich eine deutlich verminderte Expression von NF- κ B-abhängigen Genen bewirkt (TILL ET AL. 2005).

Für aktivierte T-Lymphozyten konnte eine indirekte TRAF2-vermittelte Assoziation von TNFR_{II} mit RIP1 nachgewiesen werden. Diese Interaktion bewirkt eine Rekrutierung und Aktivierung von apikalen Caspasen durch Interaktion von TNFR_{II}/TRAF2/RIP1 mit FADD und Procaspase-8 und dadurch eine direkte Aktivierung der Caspasen-Kaskade (PIMENTEL-MUIÑOS UND SEED 1999). Bei diesem Fall der Apoptose von aktivierten Immunzellen handelt es sich um einen physiologischen Mechanismus, mit dem die adaptive Immunantwort durch gezieltes Ausschalten der klonal expandierten Lymphozytenpopulationen reguliert wird. Die pathophysiologische Konsequenz einer verminderten Rekrutierung von TRAF2 durch die Genvariante 196R, wie es in der Arbeit von Till et al. beschrieben wurde, könnte somit eine verminderte Apoptose von aktivierten T-Lymphozyten sein (TILL ET AL. 2005).

1.5.5 Lösliche TNF-Rezeptoren

Die lösliche Form der TNF-Rezeptoren (sTNFR) resultiert aus proteolytischer Abspaltung (Shedding) von der Zelloberfläche mittels einer Metalloproteinase (MÜLLBERG ET AL. 1995). Ferner kann der lösliche TNFR_{II} auch durch alternatives mRNA-Splicing gebildet werden (SEITZ ET AL. 2001; LAINEZ ET AL. 2004). Zahlreiche Zytokine wie TNF, IL-1 β , IL-6, IL-2, TGF- β , IFN- β , IFN- γ können den Shedding-Prozess induzieren und folglich die Konzentration der löslichen TNF-Rezeptoren um ein Vielfaches steigern. Die Regulierung des Shedding-Prozesses und damit der Konzentrationen an sTNFR durch TNF scheint ein negativer Feedbackmechanismus zu sein. Die löslichen Rezeptoren können hohe Konzentrationen an zirkulierenden TNF neutralisieren und somit eine überschießende Immunreaktion dämpfen. Die genaue biologische Funktion der löslichen TNFRs ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Unter physiologischen Bedingungen dissoziiert der bioaktive trimere TNF-Komplex irreversibel in inaktive Monomere. Der lösliche TNFR bildet mit dem trimeren TNF einen Komplex, stabilisiert die aktive trimere Form und verlängert dadurch die HWZ des TNF. Inso-

fern könnten die löslichen TNF-Rezeptoren als Reservoir für TNF dienen, um eine konstante Serumkonzentration an bioaktivem TNF zu ermöglichen. Des Weiteren könnte der lösliche TNFR als Transportprotein für TNF zwischen verschiedenen Körperregionen fungieren (ADERKA 1996).

Die sTNFRs lassen sich im Serum gesunder Individuen nachweisen, dabei ist die Konzentration unabhängig vom Geschlecht oder Alter und bleibt über Jahre konstant. Als Folge pathologischer Prozesse steigt die Konzentration an. So konnten bei Patienten mit rheumathoider Arthritis, Lupus erythematoses, Morbus Crohn, HIV und Sepsis erhöhte Spiegel nachgewiesen werden. Weiterhin berichten zahlreiche Studien über pathologisch erhöhte Serumkonzentrationen bei Patienten mit Brust-, Pankreas-, Dickdarm- und Ovarialkrebs sowie Lymphomen. Diese Konzentrationen korrelieren mit dem Tumorstadium und scheinen eine wichtige prognostische Bedeutung zu haben (ADERKA 1996).

Die physiologische und pathologische Bedeutung des Shedding-Prozesses wird verdeutlicht durch eine Mutation in der Extrazellulärdomäne des TNFR1, die eine Prozessierung durch die Metalloproteinase blockiert und folglich zum so genannten „tumor-necrosis -factor associated periodic syndrom“ führt. Diese hereditäre Erkrankung ist durch rezidivierende Fieberschübe und lokalisierte Entzündungen verschiedener Organe gekennzeichnet (AKSENTIJEVICH ET AL. 2001; AGANNA ET AL. 2003).

1.5.6 TNF/TNF-Rezeptor und Lymphome

TNF und TNFR werden in zahlreichen Studien mit lymphoproliferativen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. So konnten bei Patienten mit klassischen Hodgkin-Lymphomen und Non-Hodgkin-Lymphomen erhöhte Serumkonzentrationen von TNF und löslichen TNF-Rezeptoren nachgewiesen werden (METKAR ET AL. 2000; TRÜMPER ET AL. 1994). In klinischen Studien konnte belegt werden, dass erhöhte Serumspiegel von TNF und löslichem TNF-Rezeptor mit der Prognose bei Patienten mit malignen Lymphomen korrelieren. Dabei waren die klinischen Endpunkte „progression free survival“ und „overall survival“ mit dem Serumspiegel signifikant assoziiert (SALLES ET AL. 1996; WARZOCHA ET AL. 1997b; GOTO ET AL. 2006). Bei NHL-Patienten mit bestimmten Genpolymorphismen der Zytokine TNF und $LT\alpha$ wurde zudem ein erhöhtes Risiko für die Endpunkte „first line treatment failure“, kürzeres „progression free survival“ und kürzeres „overall survival“ nachgewiesen. (WARZOCHA ET AL. 1998). Die Ergebnisse dieser Studien legen nahe, dass der weltweit anerkannte Internationale Prognose-Index, der auf klinischen Parametern basiert, möglicherweise durch biologische Prognosefaktoren verbessert werden kann. Die InterLymph-Studie (ROTHMAN ET AL. 2006) untersuchte in einer großen, multizentrischen Studie epidemiologisch die genetischen Risikofaktoren für die Entstehung der NHLs. Dabei konnten bestimmte genetische Variationen im TNF-Gen identifiziert werden, die das Risiko, an einem NHL zu erkranken, signifikant erhöhen. Weitere Arbeiten untersuchten die Verteilung bestimmter SNPs in den TNF-Rezeptor-Genen bei Patienten mit HTLV1-assoziiierter Myelopathie im Vergleich zu gesunden Personen (NISHIMURA ET AL. 2000). Dabei konnte eine signifikante Assoziation des M196R-Polymorphismus im TNFR2-Gen mit dieser Krankheit aufgezeigt werden.

Die zahlreichen Assoziationen verdeutlichen die zentrale Rolle des TNF-Ligand-Rezeptor-Systems in der Pathogenese des NHLs. Als möglichen Pathomechanismus konnten verschiedene Studien nachweisen, dass eine übermäßige TNF-Produktion den Allgemeinzustand be-

einflusst, zum Gewichtsverlust bis zur Kachexie führt und eine Anämie verursacht. Zudem modifiziert die übermäßige TNF-Produktion die Immunantwort. Auf diese Weise wird zum einen die Abwehrfähigkeit des Patienten gegenüber dem Tumor beeinflusst und zum anderen die Toleranz des Patienten gegenüber der Therapie herabgesetzt (TRACEY ET AL. 1988). Andere experimentelle Daten legen nahe, dass TNF direkt das Wachstum verschiedener lymphatischer Zelllinien fördert (CORDINGLEY ET AL. 1988).

2 Zielsetzung dieser Arbeit

Für eine optimale Therapie der T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (T-NHL) ist die prognostische Einschätzung von herausragender Bedeutung. Der zurzeit verwendete *Internationale Prognose-Index* basiert auf klinischen Parametern und bildet die biologische Heterogenität der T-NHL nur unzureichend ab. Ziel dieser Arbeit ist es, neue biologische Prognosefaktoren zu ermitteln, die die Aussagekraft des IPI verbessern könnten. Zudem sollen Risikofaktoren identifiziert werden, die zur Entstehung der T-NHL beitragen. Anhand pathophysiologischer Überlegungen und bestehender klinischer Assoziationen wurden in dieser Arbeit ausgesuchte Kandidatengene bei Patienten mit T-NHL analysiert.

Im Einzelnen sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Besteht ein Zusammenhang zwischen Polymorphismen der Zytokinrezeptorgene TNFR1, TNFR2, IL-4R und der Suszeptibilität für periphere T-NHL?
2. Kann eine Assoziation zwischen den zu untersuchenden Genpolymorphismen und den klinischen Parametern wie Gesamtüberleben und ereignisfreies Überleben aufgezeigt werden?
3. Inwieweit stehen die entsprechenden Geno- oder Haplotypen der T-NHL-Patienten mit den Serumkonzentrationen der löslichen Rezeptoren dieser Patienten im Zusammenhang?

3 Material

3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tabelle 3.1: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien	Hersteller
Ethanol (96-100 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Aqua destillata	Merck, Darmstadt
Verbrauchsmaterial	Hersteller
Filtertips (10 µl-1000 µl)	Sarsted, Nümbrecht
Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml/2 ml Safelock)	Eppendorf, Hamburg
384-Well-Platte	Applied Biosystems, Foster City, USA

3.2 Geräte

Nachstehend (Tabelle 3.2) sind alle regelmäßig verwendeten Geräte und deren Hersteller aufgeführt.

Tabelle 3.2: Geräte

Geräte	Hersteller
Vortex Genie 2	Schütt Labortechnik, Göttingen
Spektrometer	Eppendorf, Hamburg
Multifuge 3-L-R	Heraeus Instruments, Hanau
Spritzflasche-Rotilabo	Carl Roth, Karlsruhe
Pipetman-Pipetten	Gilson, Bad Camberg
TaqMan 7900HT Real-Time-PCR-System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Hera-Freeze -20 °C Kühleinheit	Heraeus Instruments, Hanau
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brandt, Wertheim
Serological Pipette (10 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Hänigsen
8-Kanal-Pipette	Eppendorf, Hamburg
UVette	Eppendorf, Hamburg

3.3 Software

Folgende Software wurde in dieser Arbeit verwendet (siehe Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Software

Software	Hersteller
Software ABI SDS	Applied Biosystems, Foster City, USA
Software Elisa	—
Software Haploview Version 4.1	Daly Lab at Broad Institute, Cambridge, USA

3.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme („Kits“)

Nachstehend (Tabelle 3.4) sind die verwendeten Kits aufgeführt.

Tabelle 3.4: Kits

Kits	Hersteller
Taqman PCR universal Mastermix C-2769554-10 (rs1805010) C-8903092-20 (rs1805015) C-2351160-20 (rs1801275) C-2645704-10 (rs4149570) C-8861632-20 (rs1061622)	Applied Biosystems, Foster City, USA
QIAamp DNA Blood Midi Kit	Quiagen, Hilden
Quantikine Human IL-4sR ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Quantikine Human sTNFRII ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Quantikine Human sTNFI ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden

3.5 Polymorphismen

Die in dieser Arbeit analysierten Zytokinrezeptorpolymorphismen und ihre rs-Nummern sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.5: Untersuchte Polymorphismen

Zytokinrezeptor	SNP	rs-Nummer
IL-4-Rezeptor	I75V	rs1805010
	S503P	rs1805015
	Q576R	rs1801275
TNFR1	-609 G/T	rs4149570
TNFR2	M196R	rs1061622

4 Methoden

4.1 Blutproben und Patientenkollektiv

Zur retrospektiven genetischen und serologischen Analyse standen Serumproben aus der NHL-B1/B2-Studie der „Deutschen Studiengruppe für hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome“ (DSHNHL) und der Ricover-60-Studie zur Verfügung (PFREUNDSCHUH ET AL. 2004*b*; PFREUNDSCHUH ET AL. 2008). Von insgesamt 1399 an der DSNHL-Studie teilnehmenden Patienten wurde bei 93 Patienten ein peripheres T-Zell-Lymphom diagnostiziert (6,6 %). Bei der Ricover-60-Studie wurde bei 24 von 1220 Patienten ein peripheres T-Zell-Lymphom histologisch gesichert (1,9 %). Es standen daher aus diesen Subgruppen insgesamt Serumproben von 117 Patienten mit peripherem T-NHL zur Verfügung. Als Kontrollgruppe wurden Serumproben von 192 gesunden Probanden analysiert. Beide Studien wurden im Einklang mit den ethischen Grundsätzen für medizinische Forschung am Menschen nach der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Studienprotokolle wurden durch Ethikkommissionen genehmigt. Alle Patienten wurden vorher ausführlich aufgeklärt und mussten eine Einwilligungserklärung für ihre Teilnahme unterschreiben. Teilnahmeberechtigt waren alle Patienten, die nicht vorher bereits therapiert wurden, deren Diagnose durch eine Biopsie histologisch gesichert wurde und bei denen nach der WHO-Klassifikation ein aggressives Non-Hodgkin-Lymphom vorlag.

Die NHL-B1/B2-Studie war eine prospektive, randomisierten Phase-III-Studie, in der geprüft wurde, ob mittels Intensivierung der Dosis durch Verkürzung des Zeitintervalls zwischen den Therapiesitzungen oder durch zusätzliche Gabe von Etoposid zur CHOP-Therapie eine Verbesserung des Therapieergebnisses erreicht werden kann. Die Ergebnisse der NHL-B1/B2-Studie und deren Einschlusskriterien sind von PFREUNDSCHUH ET AL. publiziert worden. Die Patienten in dieser Studie wurden mit verschiedenen Chemotherapieregimen behandelt (CHOP-14, CHOP-21, CHOEP, CHOEP-21). Bei extranodaler Beteiligung bekamen die Patienten zusätzlich eine Radiotherapie mit 36 Gray. Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass die Reduzierung des Therapieintervalls zu einer besseren Prognose und die zusätzliche Gabe von Etoposid vor allem bei jüngeren Patienten zu einer häufigeren Komplettremission führt.

Die Ricover-60-Studie hat im Rahmen einer prospektiven, randomisierten Studie den Einfluss einer zusätzlichen Gabe von Rituximab zu einer CHOP-Therapie auf die Prognose von NHL-Patienten untersucht. Die Patienten erhielten randomisiert entweder sechs oder acht Zyklen CHOP-14 oder R-CHOP-14. Die Ergebnisse und die Einschlusskriterien sind ebenfalls von PFREUNDSCHUH ET AL. publiziert worden. Die Studie zeigte einen deutlichen Vorteil einer sechsfachen R-CHOP-Therapie gegenüber den anderen untersuchten Studienarmen.

4.2 Genotypisierung mit TaqMan-PCR

4.2.1 DNA-Isolierung

Die Isolierung der genomischen DNA aus dem Vollblut der T-NHL Patientengruppe sowie der gesunden Kontrollgruppe erfolgte mit dem QIAamp DNA Blood Midi Kit von QIAGEN.

4.2.1.1 Prinzip

Die Isolation der DNA beruht auf drei Schritten. Im ersten Schritt werden die Zellen lysiert: Dazu wird die Blutprobe mit QIAGEN-Protease und AL-Puffer versetzt und bei 70°C inkubiert. Die Protease hydrolysiert enzymatisch Peptidbindungen. AL-Puffer enthält ein chaotropes Salz auf Guanidium-Basis, das Zellmembranen degradiert und Proteine bei einer Inkubation bei 70 °C denaturiert. Im zweiten Schritt erfolgt die DNA-Aufreinigung. Dazu wird das Lysat auf die QIAamp-Zentrifugationssäule gegeben und zentrifugiert. Diese Säulen enthalten eine Filtermembran aus Silicagel, die DNA zurückhält. Nachweislich bindet DNA bei einem $\text{pH} \leq 7,5$ in Gegenwart von Ethanol und hohen Salzkonzentrationen an Silica (VOGELSTEIN UND GILLESPIE 1979), der genaue Bindungsmechanismus ist aber unbekannt. Der für den ersten Waschschrift verwendete AW1-Puffer enthält ein chaotropes Salz, sodass Proteine denaturiert und aus der Säule gespült werden. Der AW2-Puffer auf Ethanolbasis dient dazu, verbliebene Salze auszuwaschen. Im letzten Schritt kann die DNA mit destilliertem Wasser von der Säule gelöst werden.

4.2.1.2 Durchführung

Die Isolierung genomischer DNA aus 1 ml Vollblut wurde nach dem QIAamp-DNA-Blood-Midi-Kit-Protokoll durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die Zellen lysiert. Dazu wurde 1 ml der entsprechenden Blutprobe mit 100 μl QIAGEN-Protease versetzt und anschließend gemischt. Nach Zugabe von 1,2 μl AL-Puffer wurde erneut mind. 15 Sekunden gemischt (jeweils mit Vortex). Das Gemisch wurde dann 10 Minuten bei 70 °C inkubiert.

Im zweiten Schritt erfolgte die DNA-Aufreinigung. Dabei wurde zunächst 1 ml Ethanol (96-100 %) zum Lysat hinzugefügt und gemischt. Das Lysat wurde dann auf eine QIAamp-Säule, die sich in einem 1,5-ml-Auffanggefäß befand, pipettiert und 3 Minuten bei 1850 x g (3000 rpm) zentrifugiert. Danach wurde die Säule herausgenommen, das Filtrat im 1,5-ml-Auffanggefäß verworfen und die QIAamp-Spinsäule wieder in das 1,5-ml-Auffanggefäß gestellt. Nun wurde die membrangebundene DNA in zwei Schritten gereinigt. Im ersten Waschschrift wurden 2 ml Puffer AW 1 auf die Säule gegeben und 1 Minute bei 4500 x g zentrifugiert. Im folgenden Waschschrift wurde 2 ml Puffer AW 2 auf die Säule pipettiert und 15 Minuten bei 4500 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das 1,5-ml-Auffanggefäß mit dem Filtrat verworfen und die Säule in ein sauberes 1,5-ml-Auffanggefäß gestellt. Zur Eluierung der DNA wurden 200 μl destilliertes Wasser direkt auf die Membran der QIAamp-Spinsäule pipettiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde 5 Minuten bei 4500 x g (5000

rpm) zentrifugiert. Für maximale DNA-Ausbeute wurde dieser Vorgang, ohne das Filtrat zu verwerfen, noch einmal wiederholt.

4.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte durch die Bestimmung der Extinktion mit einem Spektralphotometer. Nach Abgleichung des Photometers mit destilliertem Wasser wurde die in Ampuwa gelöste DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Das Verhältnis zwischen den Extinktionen bei 260 und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren und sollte $2,0 \pm 0,2$ betragen. Die Konzentration der Nukleinsäure errechnete sich nach dem Lambert-Beerschen Gesetz. Eine Extinktion von 1 bei einer Schichtdicke der Messküvette (UVette) von 1 cm entspricht einem Gehalt von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

Bestimmung der Konzentration einer absorbierenden Probe mittels Eich-Kurve oder bekanntem Extinktionskoeffizienten Die Extinktion E ist der Konzentration des absorbierenden Stoffes direkt proportional. Im Bereich der Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes ergibt E , als Funktion von c aufgetragen, eine Gerade mit der Steigung $\epsilon \times d$. Man benutzt diesen Zusammenhang, um mithilfe der Extinktionsmessungen nach Anlegen einer Eich-Geraden unbekannte Konzentrationen eines absorbierenden Stoffes zu bestimmen. Wenn ϵ für die zu untersuchende Substanz bekannt ist, lässt sich die Konzentration anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes sofort ermitteln. Wenn die zu untersuchende Probe für die photometrischen Bestimmungen verdünnt werden muss, ist der Verdünnungsfaktor bei der Berechnung der Konzentration zu berücksichtigen.

4.2.3 Genotypisierung der SNPs durch TaqMan-PCR

4.2.3.1 Prinzip

Um zu bestimmen, ob eine Versuchsperson einen bestimmten SNP aufweist und ob diese homozygoter oder heterozygoter Träger war, wurde nach dem Verfahren der TaqMan-PCR eine allelische Diskriminierung durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine PCR-basierte Methode, die sequenzspezifische Sonden verwendet. Diese sind am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und am 3'-Ende mit einem anderen, nicht fluoreszenzmarkierten Molekül (Quencher) versehen. Der Quencher hebt die Lichtaussendung des fluoreszierenden Moleküls auf. Solange der Farbstoff und der Quencher nahe beieinander sind (zum Beispiel an den beiden Enden der Sonde), wird kein Fluoreszenzsignal emittiert.

Die Proben sind hochspezifisch für einen bestimmten Genotyp und hybridisieren deswegen ausschließlich mit der Proben-DNA, falls diese das exakt komplementäre Allel aufweist. Wenn sich die Sonde an die DNA angelagert hat, wird sie durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase während der Elongation aufgespalten. Als Konsequenz davon entfernt sich der Farbstoff von dem Quencher und ein Fluoreszenzsignal kann detektiert werden. Um zwischen zwei verschiedenen Allelen zu unterscheiden, werden verschiedene Sonden mit verschiedenen

Farbstoffen eingesetzt (FAM und VIC, siehe Abbildung 4.1), die sich jeweils in einem einzelnen Nukleotid – dem SNP – unterscheiden.

4.2.3.2 Durchführung

Für die eigentliche Reaktion wurde der TaqMan universal PCR Mastermix (Applied Biosystems) verwendet (bestehend aus AmpliTaq-Gold-DNA-Polymerase, AmpErase, dNTPs und PCR-Puffer). Zur Genotypisierung der SNPs in den untersuchten Genen wurden vorgefertigte TaqMan-Kits der Firma Applied Biosystems verwendet (zur Zuordnung der Kit-Nummer zum jeweiligen SNP siehe Tabelle 3.4, Seite 26). Der Master-Mix für die PCR-Reaktion enthielt 2,5 µl 2 x TaqMan universal Master-mix, 0,25 µl TaqMan-SNP-Genotypisierungsmix, 1,25 µl ddH₂O und 1 µl Template-DNA. Die PCR wurde unter den in der Tabelle 4.1 angegebenen Bedingungen durchgeführt.

Nach der Durchführung der PCR wurden die Allele über eine Endpunktmessung bestimmt. Für jede Probe wurde ein Laserscan mit der TaqMan 7900 HT durchgeführt. Die DNA der Testpersonen konnte homozygot (nur FAM oder VIC) oder heterozygot für eines der getesteten SNPs sein (siehe Abbildung 4.2). Die Analyse des Genotyps wurde mit der Software SDS (Applied Biosystems) durchgeführt.

Tabelle 4.1: Reaktionsbedingungen für TaqMan-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Taq-Polymerase Aktivierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	4
Primerhybridisierung/ Elongation	60 °C	1 min	

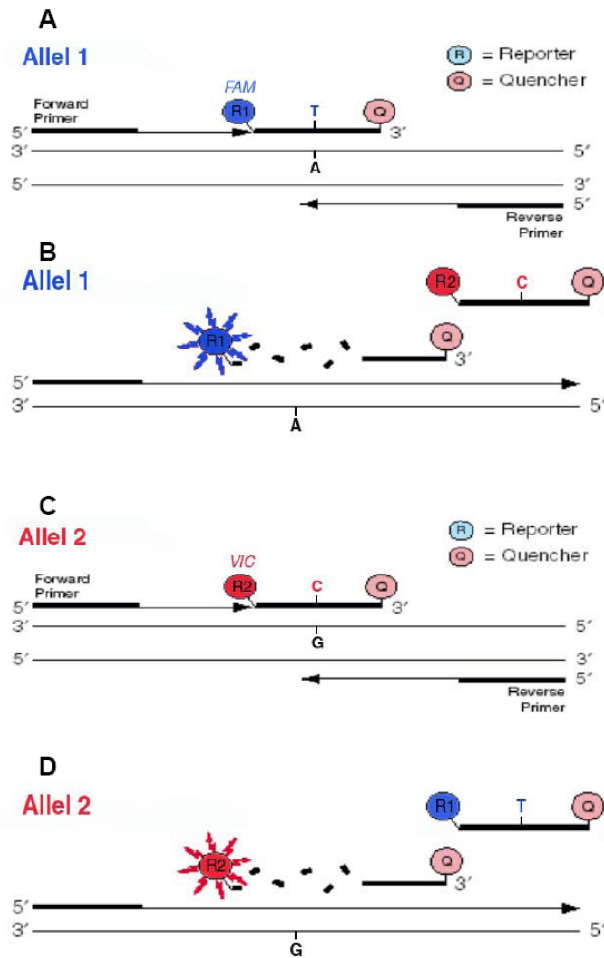


Abbildung 4.1: Mechanismus der TaqMan-basierten Genotypisierung durch FAM- und VIC-markierte Sonden

(A/B). Detektion von Allel 1 durch eine FAM-markierte Sonde (6-Carboxyfluorescein, Exzitationsmaximum: 488 nm, Emissionsmaximum: 518 nm), die mit beiden Primern hybridisiert wurden. Die Nähe des 3'-Quenchers (nicht fluoreszierender Quencher, NFQ) führt zur Absorption des durch FAM-emittierten Lichts (A). Während der Elongationsphase zerteilt die Polymerase die Sonde durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität; FAM und der Quencher entfernen sich voneinander, und das Fluoreszenzsignal wird detektierbar (B).

(C/D) Detektion des zweiten Allels durch eine VIC-markierte Probe (Exzitationsmaximum: 488 nm, Emissionsmaximum.: 518 nm) . In der Nachbarschaft des Quenchers kann keine Emission durch VIC detektiert werden (C). Nach der Zerteilung durch eine Polymerase wird VIC freigesetzt und die Fluoreszenz kann detektiert werden (D). Aufgrund der Sequenzspezifität der Sonden und der unterschiedlichen Wellenlängen der Farbstoffe kann zwischen zwei Allelen unterschieden werden.

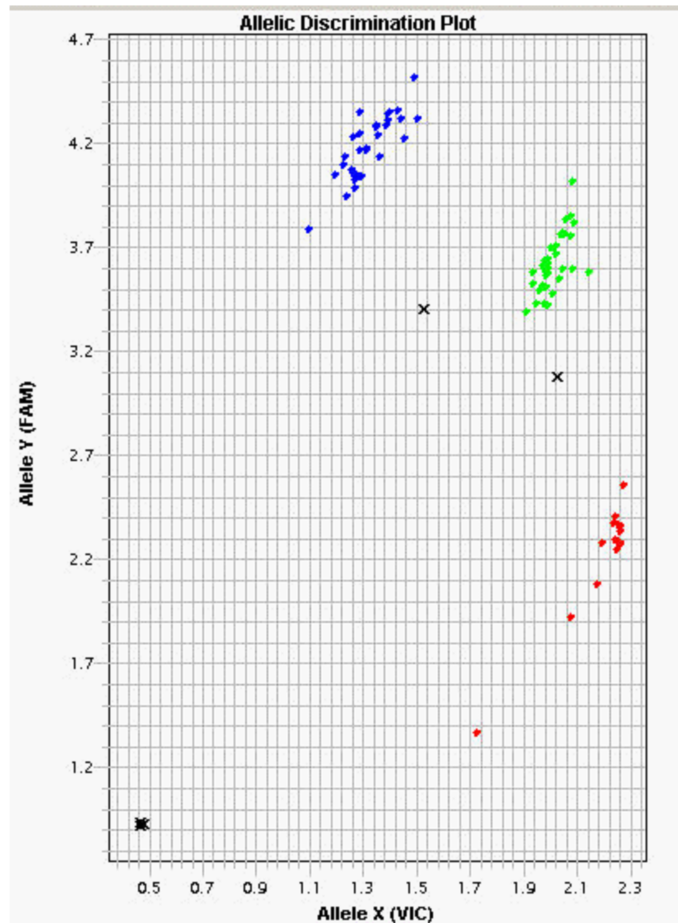


Abbildung 4.2: Diskriminierung zwischen zwei Allelen mittels TaqMan-basierter Genotypisierung. Die Intensitäten von FAM und VIC sind gegeneinander aufgetragen. Die homozygoten Proben des FAM-markierten Allels sind entlang der Ordinate angeordnet, während die homozygoten Proben des VIC-markierten Allels entlang der Abszisse erscheinen. Die heterozygoten Proben erscheinen als Mischung von FAM- und VIC-Signalen.

4.3 Serumanalysen durch ELISA

4.3.1 Prinzip

Die Serumkonzentration des löslichen TNFR1, TNFR2 sowie des IL-4R wurde mit einem enzymgekoppelten Immunoassay (ELISA) bestimmt. Angewandt wurde hierbei die quantitative Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik. Es wurden Mikrotiterplatten verwendet, die mit monoklonalen Antikörpern vorbeschichtet sind, die spezifisch für das untersuchte Antigen sind (TNFR2, TNFR1, IL-4R). Die Proben werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert, und die Antigene werden von den plattenständigen Antikörpern gebunden. Nachdem alle ungebundenen Substanzen durch Waschschrte entfernt sind, wird ein enzym-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen das Antigen hinzugefügt. Nachdem durch Waschschrte alle ungebundenen Antikörper-Enzym-Komplexe entfernt sind, wird eine chromogene Substratlösung den Vertiefungen zugefügt, woraufhin diese, in Abhängigkeit von der Menge der im ersten Schritt gebundenen Antigene, einen unterschiedlich starken Farbumschlag annehmen. Die Farbentwicklung wird unterbrochen und die Farbintensität der Lösung gemessen.

4.3.2 Löslicher TNF-Rezeptor I/II

Für die Messung des löslichen TNFR1 wurde ein „Quantikine Human sTNFR1-Immunoassay“ der Firma R&D Systems verwendet. Die Sensitivität des verwendeten sTNFR1-ELISA wird mit $<0,77$ pg/ml angegeben. Die Bestimmung des löslichen TNFR2 wurde mit dem Kit „Quantikine Human sTNFR2-Immunoassay“ der Firma R&D Systems durchgeführt. Die Nachweisgrenze des löslichen sTNFR2-Immunoassays wird im Bereich von 0,1-2,3 pg/ml angegeben.

Vorbereitung der Proben und Reagenzien Die Proben wurden um den Faktor 10 verdünnt. Dazu wurden 50 µl der Probe in 450 µl der Kalibrationslösung Rd60 verdünnt. Alle Reagenzien wurden zunächst auf Raumtemperatur gebracht. Zur Herstellung des Waschpuffers wurden 20 ml des Waschpufferkonzentrats mit sterilem Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Die Farbregenzien A und B wurden in gleichen Volumenanteilen zusammengeführt, lichtsicher aufbewahrt und innerhalb von 15 Minuten verwendet.

sTNFR2/sTNFR2-Standard Zur Erstellung eines Standards wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 500 pg/ml angesetzt. Dazu wurde der sTNFR2/sTNFR1-Standard mit 5 ml der Calibrator-Diluent-RD60-Lösung aus dem Kit versetzt. Vor der Verwendung wurde der Standard bei Raumtemperatur für mindestens 15 Minuten vorsichtig geschwenkt. 500 µl der entsprechenden Kalibrationslösung wurden in jedes Röhrchen pipettiert, mithilfe der Stammlösung wurde eine Verdünnungsserie hergestellt (siehe Abbildung 4.3). Jedes Röhrchen wurde vor dem nächsten Verdünnungsschritt sorgfältig durchmischt. Der unverdünnte Standard diente als höchstkonzentrierter Standard (500 pg/ml). Die Kalibrationslösung diente als Null-Standard (0 pg/ml).

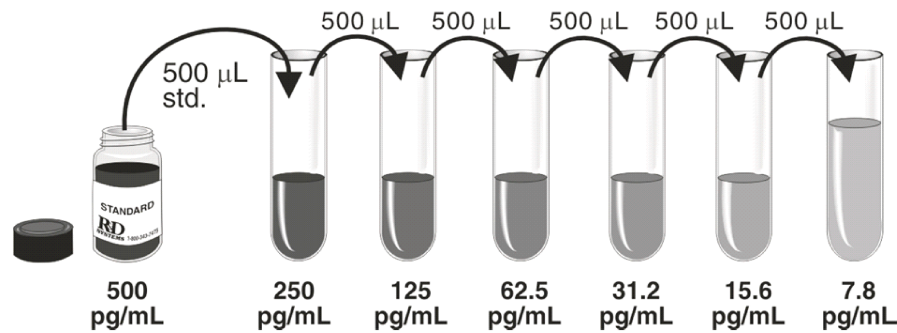


Abbildung 4.3: Erstellung einer Verdünnungsreihe für ELISA.

Versuchsdurchführung Alle Proben und Reagenzien wurden vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht. Die Daten der Proben wurden in Form von Einzelmessungen erhoben, für die jeweiligen Standards wurden Doppelmessungen durchgeführt. Alle Reagenzien, Standards und Proben wurden, wie oben beschrieben, vorbereitet. Pro Vertiefung wurden 50 µl der Verdünnungslösung RD1-6 (sTNFR_{II}) bzw. der Verdünnungslösung HD1-7 (sTNFR_I) hinzugefügt. Daraufhin wurden 200 µl des Standards, der Kontrolle oder der Probe pro Vertiefung aufgetragen. Der Versuchsansatz wurde abgedeckt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Entfernung aller ungebundenen Substanzen wurden insgesamt drei Waschschriffe durchgeführt. Die Waschschriffe erfolgten mit 400 µl des Waschpuffers pro Vertiefung. Nach dem letzten Waschvorgang wurde die verbleibende Waschlösung aufgenommen, die Mikrotiterplatte umgedreht und mit einem sauberen Papiertuch abgetupft.

Zur Ausbildung eines Sandwichkomplexes wurden 200 µl der sTNFR_{II}-Konjugationslösung bzw. sTNFR_I-Konjugationslösung in jede Vertiefung gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde abermals abgedeckt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung aller ungebundenen Antikörper-Enzym-Komplexe folgten drei Waschschriffe entsprechend der obigen Beschreibung.

Es wurden 200 µl der chromogenen Substratlösung in jede Vertiefung gegeben. Der Versuchsansatz wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Daraufhin wurden 50 µl der Stopplösung in jede Vertiefung hinzugegeben. Die Farbe in den Vertiefungen nahm einen gelblichen Ton an. Die optische Dichte jeder Vertiefung wurde innerhalb von 30 Minuten photometrisch bestimmt.

Auswertung Die Bearbeitung der mittels Mikroplattenphotometer gemessenen Daten erfolgte mit der Software Excel. Die Extinktionswerte wurden um den Leerwert korrigiert, die Ergebnisse dekadisch logarithmiert und zur Berechnung einer Regressionsgeraden herangezogen. Anhand der gemessenen Extinktionswerte konnten so die Konzentrationswerte für die Proben ermittelt werden. Die ermittelten Konzentrationen mussten anschließend multipliziert werden um den Verdünnungsfaktor 10, aufgrund der Verdünnung der Serumproben vor Beginn der Messung.

4.3.3 Löslicher IL-4-Rezeptor

Die quantitative Bestimmung der Serumkonzentration von dem löslichen humanen IL-4-Rezeptor erfolgte mit dem Kit „Quantikine Human IL-4 sR ELISA“ der Firma R&D Systems. Die Sensitivität des sIL-4R-Immunoassays wird mit < 5 pg/ml angegeben.

Vorbereitung der Reagenzien Alle Reagenzien wurden zunächst auf Raumtemperatur gebracht. Zur Herstellung des Waschpuffers wurden 20 ml des Waschpufferkonzentrats mit sterilem Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Die Farbreagenzien A und B wurden in gleichen Volumenanteilen zusammengeführt, lichtsicher aufbewahrt und innerhalb von 15 Minuten verwendet.

sIL-4R-Standard Zur Erstellung eines Standards wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1000 pg/ml angesetzt. Dazu wurde der sIL-4R-Standard mit 5 ml der Calibrator-Diluent-RD6P-Lösung aus dem Kit versetzt. Vor der Verwendung wurde der Standard bei Raumtemperatur für mindestens 15 Minuten vorsichtig geschwenkt. 500 μ l der entsprechenden Kalibrationslösung wurden in jedes Röhrchen pipettiert, mithilfe der Stammlösung wurde eine Verdünnungsserie hergestellt. Jedes Röhrchen wurde vor dem nächsten Verdünnungsschritt sorgfältig durchmischt. Der unverdünnte Standard diene als höchstkonzentrierter Standard (1000 pg/ml). Die Kalibrationslösung diene als Null-Standard (0 pg/ml).

Versuchsdurchführung Alle Proben und Reagenzien wurden vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht. Die Daten der Proben wurden in Form von Einzelmessungen erhoben, für die jeweiligen Standards wurden Doppelmessungen durchgeführt. Alle Reagenzien, Standards und Proben wurden, wie oben beschrieben, vorbereitet. Pro Vertiefung wurden 150 μ l der Verdünnungslösung RD1-W hinzugefügt. Daraufhin wurden 50 μ l des Standards, der Kontrolle oder der Probe pro Vertiefung aufgetragen. Der Versuchsansatz wurde abgedeckt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Entfernung aller ungebundenen Substanzen wurden insgesamt drei Waschschritte durchgeführt. Die Waschschritte erfolgten mit 400 μ l des Waschpuffers pro Vertiefung. Nach dem letzten Waschvorgang wurde die verbleibende Waschlösung aufgenommen, die Mikrotiterplatte umgedreht und mit einem sauberen Papiertuch abgetupft.

Zur Ausbildung eines Sandwichkomplexes wurden 200 μ l der IL-4-sR-Konjugationslösung in jede Vertiefung gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde abermals abgedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung aller ungebundenen Antikörper-Enzym-Komplexe folgten drei Waschschritte entsprechend der obigen Beschreibung.

Es wurden 200 μ l der chromogenen Substratlösung in jede Vertiefung gegeben. Der Versuchsansatz wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Daraufhin wurden 50 μ l der Stopplösung in jede Vertiefung hinzugegeben. Die Farbe in den Vertiefungen nahm einen gelblichen Ton an. Die optische Dichte jeder Vertiefung wurde innerhalb von 30 Minuten photometrisch bestimmt.

Auswertung Die Bearbeitung der mittels Mikroplattenphotometer gemessenen Daten erfolgte mit der Software Excel. Die Extinktionswerte wurden um den Leerwert korrigiert, die Ergebnisse dekadisch logarithmiert und zur Berechnung einer Regressionsgeraden herangezogen. Anhand der gemessenen Extinktionswerte konnten so die Konzentrationswerte für die Proben ermittelt werden.

4.4 Definitionen und statistische Analysen

Zur Analyse der genetischen Daten wurde das Internetprogramm des Instituts für Human-genetik (Helmholtz Zentrum München) verwendet (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de>). Die Analysen beinhalteten einen Vergleich der beobachteten und aus dem Hardy-Weinberg-Gesetz zu erwarteten Genotypverteilung mittels des Exact-Tests sowie eine Überprüfung auf Assoziation mittels des Chi-Quadrat-Tests. Zur Analyse der Haplotypen wurde die Software Haploview 4.1 (Daly Lab at Broad Institute) verwendet. Die Software wurde weiterhin verwendet, um Assoziationen der Haplotypen mit dem Auftreten von T-NHL zu ermitteln (Chi-Quadrat-Test). Diese Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Mag. A. Rosenberger (Wiss. Mitarbeiter in der Abteilung für Genetische Epidemiologie, Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt. Gesamtüberleben und ereignisfreies Überleben wurden mit der Kaplan-Meier-Kurve abgeschätzt und mit dem Log-rank-Test verglichen. Diese Analysen wurden mit dem IMISE-Institut in Leipzig durchgeführt, das über die gesamten klinischen Daten der zugrunde liegenden Studien verfügt (Dipl.-Inf. M. Kreuz, Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie, Leipzig).

Der Begriff Gesamtüberleben ist in dieser Arbeit als die Zeit zwischen Therapiebeginn und Versterben des Patienten aus jeglichen Gründen definiert. Ereignisfreies Überleben ist als Zeit zwischen Therapiebeginn und verschiedenen Ereignissen definiert. Als Ereignis wird der fortschreitende Krankheitsverlauf unter Therapie, die fehlende komplette Remission, die Anwendung weiterer Therapieschemata zusätzlich zum definierten Therapieprotokoll, ein Rezidiv der Erkrankung oder das Versterben des Patienten aus jeglichen Gründen verstanden. Diese Kriterien waren in beiden zugrunde liegenden Studien übereinstimmend definiert (NHL-B1/B2-Studie und Ricover-60-Studie).

Die Verteilung der Serumkonzentrationen auf die Genotypen wurde mittels Kruskal-Wallis-Test berechnet.

5 Ergebnisse

Aus verschiedenen Arbeiten ist bekannt, dass genetische Polymorphismen von Zytokingenen und Zytokinrezeptorgenen sowohl mit der Suszeptibilität als auch mit der Prognose von NHL assoziiert sind. Gegenstand dieser Arbeit ist die Analyse der Polymorphismen der Zytokinrezeptorgene TNFR1, TNFR2 und IL-4R bei Patienten mit peripheren T-NHL. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Genpolymorphismen mit einem erhöhten Risiko, an T-NHL zu erkranken, assoziiert sind. Im darauf folgenden Teil wurde die prognostische Bedeutung der genetischen Polymorphismen für die peripheren T-NHL analysiert. Im dritten Teil wurde untersucht, inwieweit ein Zusammenhang zwischen den Genvariationen und den Werten der löslichen Rezeptoren im Blut der T-NHL-Patienten besteht.

5.1 Zusammenhang zwischen Genpolymorphismen der Zytokinrezeptoren TNFR1, TNFR2, IL-4R und der Suszeptibilität für periphere T-NHL

Für die Untersuchungen stand ein Kollektiv von 117 Patienten mit peripheren T-NHL aus der NHL-B1/B2-Studie (PFREUNDSCHUH ET AL. 2004b; PFREUNDSCHUH ET AL. 2004a) und der Ricover-60-Studie (PFREUNDSCHUH ET AL. 2008) der Deutschen Studiengruppe für Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome und ein Kollektiv von 192 gesunden Kontrollen zur Verfügung. Es wurde zunächst die genomische DNA aus den Serumproben von Patienten und gesunden Kontrollen isoliert. Anschließend wurden die SNPs (single nucleotide polymorphism) I75V, S503P, Q576R im IL-4R-Gen, -609 G/T im TNFR1-Gen sowie M196R im TNFR2-Gen genotypisiert. Zur Genotypisierung wurde die Real-Time-PCR mit standardisierten Mastermix-Kits verwendet. Bei der Genvariation im TNFR1-Gen handelt es sich um einen Promotorpolymorphismus. Bei IL-4R und TNFR2 wurden kodierende Genpolymorphismen untersucht, die zu einem Aminosäureaustausch führen. In Tabelle 5.1 und Tabelle 5.2 sind die Allel- und Genotypfrequenzen der untersuchten Polymorphismen im Vergleich zwischen den T-NHL-Patienten (n=117) und der gesunden Kontrollgruppe (n=192) dargestellt. Einige Genotypen konnten trotz wiederholter Versuchsdurchführung nicht bestimmt werden. Die Nicht-Bestimmbarkeit eines Genotypen führte im Patientenkollektiv zum Ausschluss aus der Untersuchung für alle SNPs, während in der Kontrollgruppe diese nur für das jeweilige untersuchte SNP ausgeschlossen wurden (in den Tabellen mit n/a gekennzeichnet).

5.1 Zusammenhang zwischen Genpolymorphismen der Zytokinrezeptoren TNFRI, TNFRII, IL-4R und der Suszeptibilität für periphere T-NHL

Tabelle 5.1: Allelfrequenzen der untersuchten Polymorphismen im IL-4R-, TNFRI- sowie TNFRII-Gen im Vergleich zwischen der T-NHL-Gruppe (n=117) und der Kontrollgruppe (n=192). Für jedes Allel ist die absolute Häufigkeit sowie die relative Häufigkeit in Prozent in Klammern angegeben (n/a – nicht bestimmbar).

SNP	Allel	Kontrollgruppe	T-NHL Patienten
TNFRI (-609 G/T rs4149570)	T	146 (39 %)	92 (39 %)
	G	230 (61 %)	142 (61 %)
	n/a	8	0
TNFRII (M196R rs1061622)	G	79 (21 %)	60 (26 %)
	T	301 (79 %)	174 (74 %)
	n/a	4	0
IL-4R (I75V rs1805010)	G	157 (44 %)	108 (46 %)
	A	201 (56 %)	126 (54 %)
	n/a	26	0
IL-4R (S503P rs1805015)	C	63 (19 %)	32 (14 %)
	T	275 (81 %)	202 (86 %)
	n/a	46	0
IL-4R (Q576R rs1801275)	G	86 (24 %)	45 (19 %)
	A	268 (76 %)	189 (81 %)
	n/a	30	0

5.1 Zusammenhang zwischen Genpolymorphismen der Zytokinrezeptoren TNFRI, TNFR2, IL-4R und der Suszeptibilität für periphere T-NHL

Tabelle 5.2: Verteilung der Genotypen der untersuchten Polymorphismen in der Kontrollgruppe (n=192) und Patientengruppe (n=117). Für jedes Allel ist die absolute Häufigkeit sowie die relative Häufigkeit in Prozent in Klammern angegeben (n/a – nicht bestimmbar).

SNP	Genotyp	Kontrollgruppe n=192	T-NHL n=117	Mutierter Genotyp
TNFRI (-609 G/T rs4149570)	TT	23 (12 %)	21 (18 %)	
	GT	100 (53 %)	50 (43 %)	TT
	GG	65 (35 %)	46 (46 %)	
	n/a	4	0	
TNFR2 (M196R rs1061622)	GG	11 (6 %)	7 (6 %)	
	GT	57 (30 %)	46 (39 %)	GG
	TT	122 (64 %)	64 (55 %)	
	n/a	2	0	
IL-4R (I75V rs1805010)	GG	31 (17 %)	24 (21 %)	
	AG	95 (53 %)	60 (51 %)	GG
	AA	53 (39 %)	33 (28 %)	
	n/a	13	0	
IL-4R (S503P rs1805015)	CC	5 (3 %)	2 (2 %)	
	CT	53 (31 %)	28 (24 %)	CC
	TT	111 (66 %)	87 (74 %)	
	n/a	23	0	
IL-4R (Q576R rs1801275)	GG	7 (4 %)	3 (3 %)	
	AG	72 (41 %)	39 (33 %)	GG
	AA	98 (55 %)	75 (64 %)	
	n/a	15	0	

5.1 Zusammenhang zwischen Genpolymorphismen der Zytokinrezeptoren TNFR1, TNFR2, IL-4R und der Suszeptibilität für periphere T-NHL

Die Ergebnisse der Genotypisierung wurden darauf überprüft, inwieweit sie mit dem Gesetz nach Hardy-Weinberg übereinstimmen. Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den erwarteten und tatsächlich beobachteten Genotyphäufigkeiten für alle untersuchten Polymorphismen, womit für diese ein Hardy-Weinberg-Äquilibrium erfüllt worden ist (siehe Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3: Prüfung auf Hardy-Weinberg-Äquilibrium. Vergleich der tatsächlich beobachteten Genotypfrequenzen mit den nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz zu erwarteten Häufigkeiten. *p-Wert nach dem Exact-Test(n=117)

SNP	Kontrollgruppe p-Wert*	T-NHL-Patienten p-Wert*
TNFR1 (-609 G/T rs4149570)	0,125	0,251
TNFR2 (M196R rs1061622)	0,268	1,0
IL-4R (I75V rs1805010)	0,363	0,853
IL-4R (S503P rs1805015)	0,803	1,0
IL-4R (Q576R rs1801275)	0,219	0,561

5.1 Zusammenhang zwischen Genpolymorphismen der Zytokinrezeptoren TNFRI, TNFRII, IL-4R und der Suszeptibilität für periphere T-NHL

Um zu prüfen, ob ein Allel oder ein Genotyp bei den T-NHL-Patienten signifikant häufiger oder seltener vorkommt als in der Kontrollgruppe, wurde eine Assoziationsanalyse mittels Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Die Allel- und Genotypfrequenzen der untersuchten Polymorphismen unterschieden sich nicht signifikant zwischen der Patientengruppe und der gesunden Kontrollgruppe (siehe Tabelle 5.4). Somit konnte keine Assoziation zwischen den übrigen Genpolymorphismen und der Suszeptibilität für periphere T-NHL aufgezeigt werden.

Tabelle 5.4: Zusammenhang zwischen Genpolymorphismen der Zytokinrezeptorgene TNFRI, TNFRII, IL-4R und der Suszeptibilität für periphere T-NHL. Es wurde für jeden SNP ein allelbasierter Vergleich, ein Vergleich des mutierten Genotyps vs. heterozygoter Genotyp und dem Wildtypgenotyp sowie ein Vergleich von Wildtypgenotyp vs. heterozygotem Genotyp und dem mutierten Genotyp durchgeführt. *p-Wert nach dem Chi-Quadrat-Test (Kontrollgruppe n=192, Patientengruppe n=117)

SNP	Allel/Genotyp	p-Wert*
TNFRI	T vs. G	0,9
(-609 G/T rs4149570)	TT vs. GT + GG GG vs. GT + TT	0,17 0,4
TNFRII	G vs. T	0,16
(M196R rs1061622)	GG vs. GT + TT TT vs. GG + GT	0,94 0,098
IL-4R	G vs. A	0,58
(I75V rs1805010)	GG vs. AG + AA AA vs. AG + GG	0,49 0,79
IL-4R	C vs. T	0,12
(S503P rs1805015)	CC vs. CT + TT TT vs. CT + CC	0,50 0,12
IL-4R	G vs. A	0,15
(Q576R rs1801275)	GG vs. AG + AA AA vs. AG + GG	0,52 0,14

5.2 Die haplotypische Verteilung bei Patienten mit T-NHL und bei der gesunden Kontrollgruppe

Die Untersuchten SNPs im IL-4R-Gen wurden auf ihre haplotypische Verteilung untersucht. Vier Haplotypen traten mit Frequenzen von über 5 % auf, und zwar die Haplotypen A-T-A (45,8 %), C-T-A (31,8 %), G-C-G (10,7 %) und A-C-G (5,6 %). Keiner der Haplotypen war assoziiert mit dem Risiko, an einem peripheren T-NHL zu erkranken (siehe Tabelle 5.5).

Tabelle 5.5: Haplotypen im IL-4-Rezeptor-Gen im Vergleich zwischen T-NHL-Patienten (n=117) und gesunden Kontrollen (n=192). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in den Haplotyphäufigkeiten zwischen den T-NHL-Patienten und der Kontrollgruppe.

* Chi-Quadrat-Test.

Haplotyp I75V–S503P–Q576R	Frequenz			p-Wert *
	Gesamt	Kontrolle	T-NHL	
A-T-A	45,8 %	46,1 %	45,6 %	0,891
G-T-A	31,8 %	34,8 %	29,7 %	0,186
G-C-G	10,7 %	9,3 %	11,6 %	0,371
A-C-G	5,6 %	3,9 %	6,8 %	0,128
A-T-G	4,3 %	4,5 %	4,1 %	0,824
G-T-G	1,5 %	1,3 %	1,6 %	0,785

5.3 Einfluss der untersuchten Genpolymorphismen auf die klinischen Parameter Gesamtüberleben und ereignisfreies Überleben bei Patienten mit T-NHL

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, inwieweit die Polymorphismen IL-4R I75V, IL-4R S503P, IL-4R Q576R, TNFRI -609 G/T und TNFRII M196R mit dem Gesamtüberleben und dem ereignisfreien Überleben bei Patienten mit T-NHL assoziiert sind. Die Gesamtüberlebensrate (Overall Survival, OS) sowie das ereignisfreie Intervall (Event-free Survival, EFS) wurden mit der Kaplan-Meier-Kurve geschätzt und in einer univariaten Analyse mit dem Log-Rank-Test zwischen den Genotypen verglichen. Diese Analysen wurden gemeinsam mit dem IMISE-Institut in Leipzig durchgeführt, das über die gesamten klinischen Daten der zugrunde liegenden Studien verfügt.

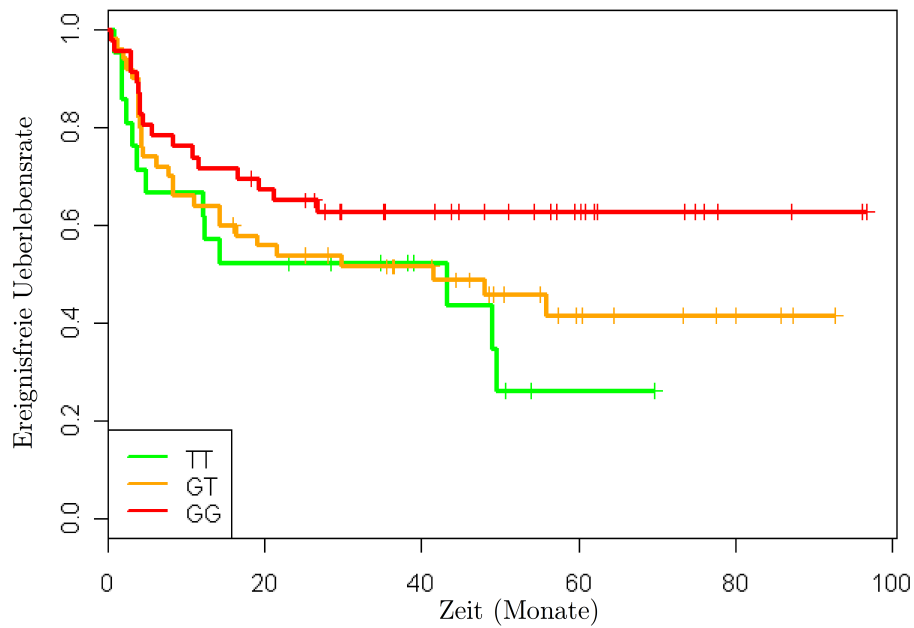
Die Allelträger TNFRI -609 T (GT und TT) zeigten ein signifikant kürzeres ereignisfreies Überleben ($p = 0,041$). Auch das Gesamtüberleben war bei den Allelträgern TNFRI -609 T (GT und TT) trendhaft kürzer ($p=0,099$, nicht signifikant). Die Überlebensrate war bei den Wildtypgenotypträgern höher als bei den mutierten Genotypträgern und heterozygoten Genotypträgern (siehe Abbildungen 5.1 und 5.2).

Die Träger des mutierten Genotyps GG des TNFRII M196R und des heterozygoten Genotyps GT zeigten im Vergleich zu den Trägern des Wildtypgenotyps TT einen Trend zu einer längeren ereignisfreien Überlebenszeit ($p = 0,066$). Die Überlebensrate war bei den mutierten Genotypträgern und den heterozygoten Genotypträgern höher im Vergleich zu den Wildtypgenotypträgern (siehe Abbildung 5.3).

Für die Genvariationen im IL-4-Rezeptor (I75V, S503P, Q576R) konnte kein signifikant längeres oder kürzeres ereignisfreies Überleben aufgezeigt werden. Die Analyse hinsichtlich des Gesamtüberlebens zeigte ebenfalls keinen eindeutigen signifikanten Unterschied für alle untersuchten Genvariationen (exemplarisch siehe Abbildung 5.4 für den SNP IL-4R I75V).

Das ALCL ist der häufigste Subtyp des peripheren T-Zell-Lymphoms und wird unterteilt in das ALK-negative und ALK-positive T-NHL. Das ALK-negative T-NHL hat im Gegensatz zum ALK-positiven eine wesentlich ungünstigere Prognose. Dies deutet darauf hin, dass das ALK-negative Lymphom letztlich eine eigenständige Krankheitsentität mit einer eigenständigen Pathogenese und Prognose darstellt (siehe 1.1.3, Seite 2). Daher wurden das Gesamtüberleben und das ereignisfreie Überleben für die ALK-negativen Lymphome zusätzlich gesondert analysiert. Hierbei konnten für alle untersuchten Polymorphismen im IL-4R-Gen und TNFRI- und TNFII-Gen keine signifikanten Assoziationen mit EFS und OS aufgezeigt werden. Exemplarisch ist in Abbildung 5.5 eine Kaplan-Meier-Kurve für den SNP I75V im IL-4R-Gen gezeigt.

TNFRI -609 G/T

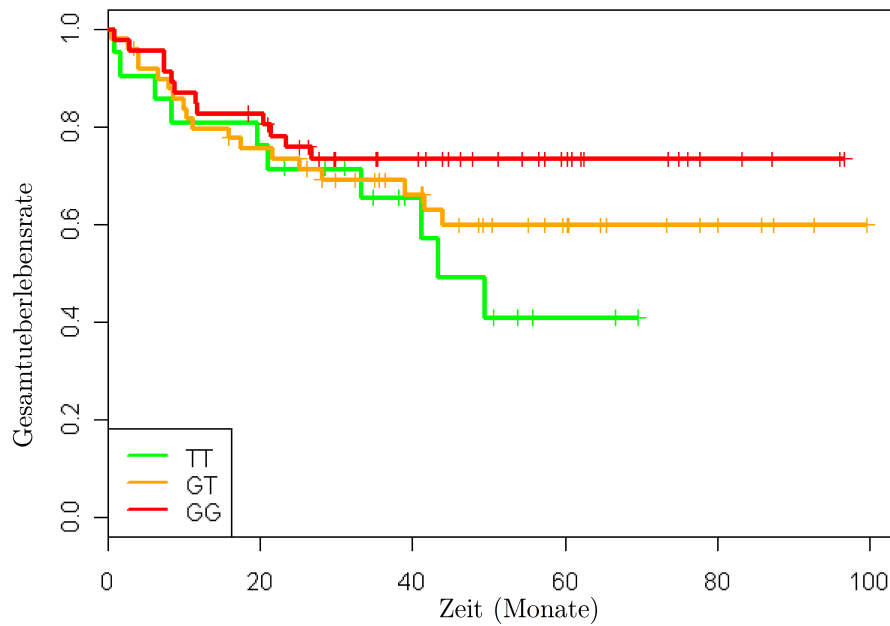


Anzahl der Patienten

TT	21	11	6	1	0	0
GT	50	27	20	8	3	0
GG	46	30	20	11	3	0

Abbildung 5.1: Mittels Kaplan-Meier-Kurve geschätztes ereignisfreies Überleben von Patienten mit T-NHL im genotypischen Vergleich für den SNP TNFRI -609 G/T. Die Träger des Allels T hatten ein signifikant kürzeres ereignisfreies Überleben als die Träger des Genotyps GG ($p = 0,041$, Log-rank-Test).

TNFRI -609 G/T

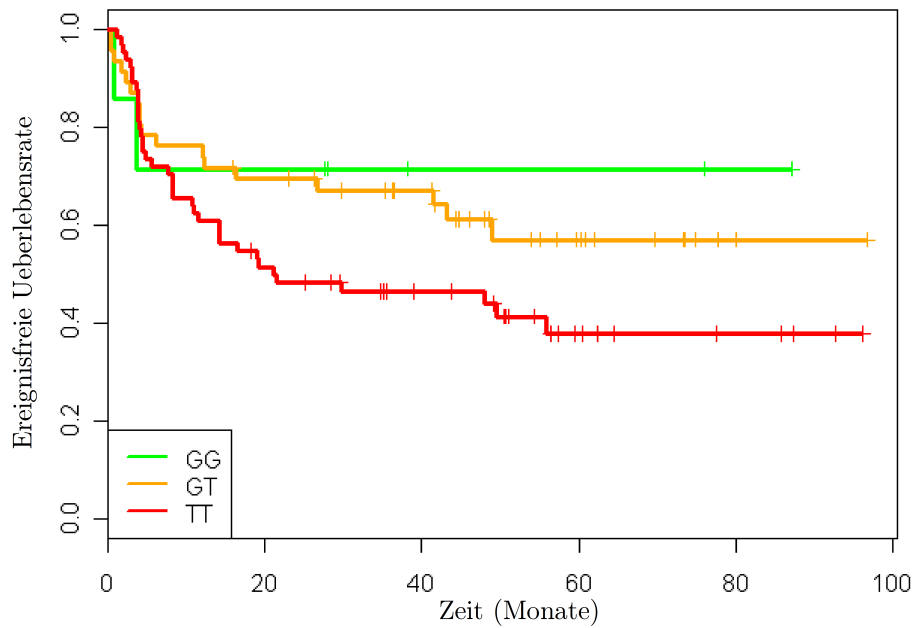


Anzahl der Patienten

TT	21	16	8	2	0	0
GT	50	36	23	11	4	0
GG	46	37	24	12	4	0

Abbildung 5.2: Mittels Kaplan-Meier-Kurve geschätztes Gesamtüberleben von Patienten mit T-NHL im genotypischen Vergleich für den SNP TNFRI -609 G/T. Die Träger des Allels T zeigten einen Trend zum kürzeren Gesamtüberleben als die Träger des Genotyps GG ($p = 0,099$, Log-rank-Test).

TNFR2 M196R

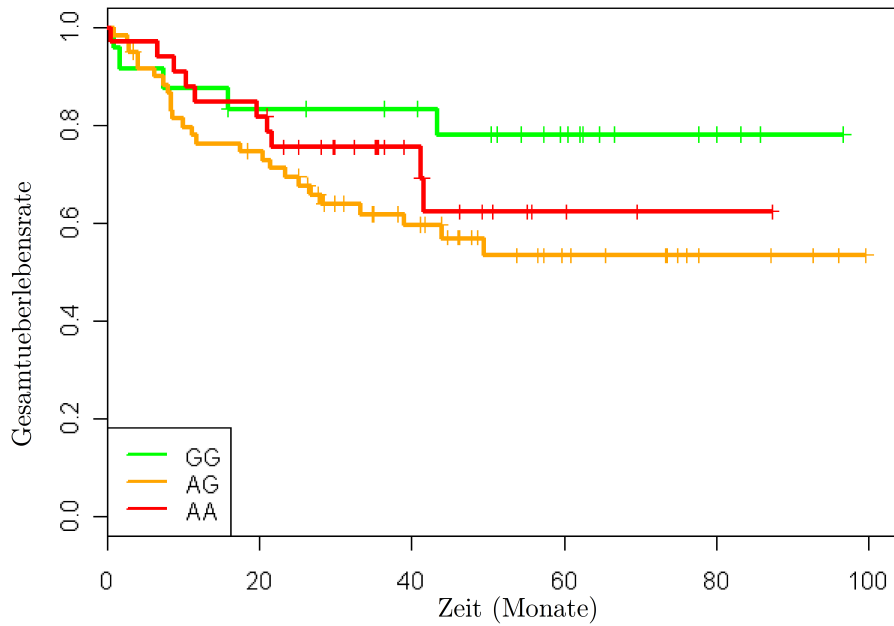


Anzahl der Patienten

GG	7	5	2	2	1	0
GT	46	31	24	10	1	0
TT	64	32	20	8	4	0

Abbildung 5.3: Mittels Kaplan-Meier-Kurve geschätztes ereignisfreies Überleben von Patienten mit T-NHL im genotypischen Vergleich für den SNP TNFR2 M196R. Für die Träger des Allels G zeigte sich ein Trend zum längeren ereignisfreien Überleben im Vergleich zu Trägern des Genotyps TT ($p = 0,066$, Log-rank-Test).

IL-4R I75V

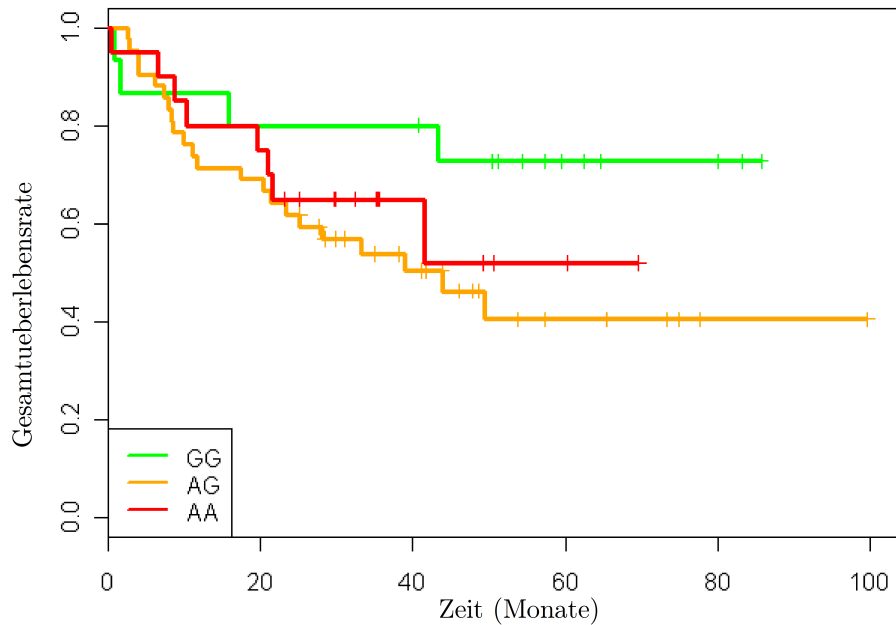


Anzahl der Patienten

GG	24	19	17	10	3	0
AG	60	43	26	11	4	0
AA	33	27	12	4	1	0

Abbildung 5.4: Mittels Kaplan-Meier-Kurve geschätztes Gesamtüberleben von Patienten mit T-NHL im genotypischen Vergleich für den SNP IL-4R I75V. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ($p = 0,498$, Log-rank-Test).

IL-4R I75V



Anzahl der Patienten

GG	15	12	12	5	2	0
AG	42	29	15	5	1	0
AA	20	15	5	2	0	0

Abbildung 5.5: Mittels Kaplan-Meier-Kurve geschätztes Gesamtüberleben von Patienten mit ALK-negativen T-NHL im genotypischen Vergleich für den SNP IL-4R I75V. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ($p = 0,354$, Log-rank-Test).

5.4 Zusammenhang zwischen Polymorphismen in untersuchten Zytokinrezeptorgenen und Serumkonzentration der entsprechenden löslichen Zytokinrezeptoren

Im letzten Schritt der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Zytokinrezeptorpolymorphismen auf die Serumkonzentration der entsprechenden löslichen Zytokinrezeptoren bei Patienten mit T-NHL untersucht. Dazu wurden zum einen die erhobenen Genotypisierungsdaten der T-NHL-Patienten herangezogen, zum anderen wurde die Konzentration der löslichen Zytokinrezeptoren mittels ELISA im Serum der Patienten gemessen. Die Serumproben wurden vor Beginn der Chemotherapie gewonnen. Von 117 Patienten mit T-NHL standen 80 Serumproben für eine ELISA zur Verfügung.

In der Tabelle 5.6 sind die mittleren Serumwerte der löslichen Zytokinrezeptoren in Abhängigkeit vom Genotyp für die untersuchten Polymorphismen dargestellt. Mit dem Kruskal-Wallis-Test wurde geprüft, ob ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Serumkonzentration zwischen den Genotypen bestand. Es konnte keine signifikante Assoziation zwischen den SNPs im IL-4R-Gen und dem Serumwert des löslichen IL-4R aufgezeigt werden. Ein Zusammenhang zwischen den Polymorphismen in den TNFR-Genen und dem Serumwert der löslichen TNF-Rezeptoren konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 5.6).

Tabelle 5.6: Serumkonzentration der löslichen Zytokinrezeptoren bei T-NHL-Patienten (n=80) in Abhängigkeit vom Genotyp. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Verteilung der Serumkonzentrationen zwischen den Genotypen festgestellt werden. * Kruskal-Wallis-Test

SNP	Genotyp	Anzahl n	Serumkonzentration (ng/ml)		p-Wert*
			Mittelwert	95%-KI	
TNFR1 (-609 G/T rs4149570)	TT	36	2,1	1,3 - 3,0	0,9477
	GT	28	2,0	1,6 - 2,4	
	GG	14	1,9	1,5 - 2,2	
TNFR2 (M196R rs1061622)	GG	43	3,1	-2,3 - 8,6	0,5615
	GT	31	3,9	2,2 - 5,6	
	TT	3	4,0	3,1 - 5,0	
IL-4R (I75V rs1805010)	GG	23	0,131	0,092 - 0,170	0,2057
	AG	39	0,123	0,091 - 0,155	
	AA	16	0,086	0,052 - 0,120	
IL-4R (S503P rs1805015)	CC	59	0,123	0,097 - 0,149	0,3751
	CT	17	0,095	0,067 - 0,124	
	TT	2	0,070	-0,311 - 0,451	
IL-4R (Q576R rs1801275)	GG	52	0,110	0,089 - 0,131	0,9868
	AG	23	0,127	0,075 - 0,178	
	AA	3	0,111	-0,041 - 0,261	

6 Diskussion

Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung verschiedener Polymorphismen in Zytokinrezeptorgenen auf eine Assoziation mit T-NHL. Die Identifizierung genetischer Faktoren kann helfen, Risikogruppen innerhalb dieser heterogenen Erkrankung genauer zu differenzieren und dadurch eine individuelle Anpassung der Therapie und Nachsorge zu ermöglichen. Des Weiteren kann die Ermittlung genetischer Faktoren dazu beitragen, Hypothesen über die pathophysiologischen Mechanismen der Lymphomentstehung zu generieren.

Inzwischen konnten in einigen Untersuchungen Assoziationen von Zytokinrezeptorgenpolymorphismen in Bezug auf das Risiko und den Verlauf vor allem der B-NHL gezeigt werden. Die vorliegende Arbeit ist eine der ersten Studien, die Polymorphismen in Rezeptorgenen von Schlüsselzytokinen bei malignem T-NHL untersucht. Im ersten Teil dieser Studie wurde untersucht, ob die Genpolymorphismen mit einem erhöhten Risiko, an T-NHL zu erkranken, assoziiert sein können (Suszeptibilität). Im zweiten Teil wurde die prognostische Bedeutung der genetischen Polymorphismen für das periphere T-NHL analysiert. Im dritten Teil wurde untersucht, inwieweit ein Zusammenhang zwischen den Genvariationen und den Werten der löslichen Rezeptoren im Blut der T-NHL-Patienten bestehen könnte.

6.1 Assoziation von TNF- und IL-4-Rezeptorgenpolymorphismen und dem Risiko, an einem T-NHL zu erkranken

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob Variationen im IL-4-Rezeptorgen und TNF-Rezeptorgen I/II mit dem Risiko, an einem T-NHL zu erkranken, assoziiert sind. Dazu wurden Serumproben von T-NHL-Patienten mittels einer TaqMan-PCR genotypisiert und mit denen einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Es standen Blutproben von 117 T-NHL-Patienten aus der NHL-B1/B2-Studie (PFREUNDSCHUH ET AL. 2004a; PFREUNDSCHUH ET AL. 2004b) und der Ricover-60-Studie (PFREUNDSCHUH ET AL. 2008) der Deutschen Studiengruppe für hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome (DSHNHL) zur Verfügung. Bei der TaqMan-PCR handelt es sich um eine etablierte und standardisierte Methode, die es ermöglicht, eine größere Anzahl von Seren semi-automatisch und einheitlich zu untersuchen. Bei der vorliegenden Untersuchung handelt es sich um eine retrospektive Untersuchung an Patientenseren, die innerhalb von zwei grosszahligen klinischen Studien gewonnen wurden. Das Studiendesign entspricht demnach nicht dem einer klassischen Fall-Kontroll-Studie.

Die ermittelten Allel- und Genotypfrequenzen in der Kontrollgruppe entsprachen den aus großen Genomstudien bekannten Frequenzen bei Kaukasiern (SHERRY ET AL. 2001). Die ge-

messene Verteilung der Genotypen entsprach der aus dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten Verteilung. Zwischen den T-NHL-Patienten und der Kontrollgruppe fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Allel- oder Genotypfrequenz, was darauf hindeutet, dass keine deutliche Assoziation zwischen den untersuchten Genpolymorphismen und dem Risiko, an einem T-NHL zu erkranken, besteht. Auch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte haplotypische Betrachtung der untersuchten SNPs im IL-4R-Gen liess keinen deutlichen Zusammenhang mit dem Auftreten eines T-NHLs erkennen.

Für den SNP IL-4R S503P stehen diese Ergebnisse in Einklang mit einer anderen Studie, welche keinen Einfluss dieses SNPs auf das Risiko für die Entwicklung eines NHL zeigen konnte (ohne Untersuchung des Subtyps T-NHL, CERHAN ET AL. 2007a). Für andere, nicht in dieser Arbeit untersuchte SNPs im IL-4-Gen und dem IL-4-Rezeptor-Gen sind Assoziationen mit NHLs bzw. T-NHLs gefunden worden. So konnte eine Arbeit bei einer großen Anzahl untersuchter SNPs für den SNP -1098T/G im IL-4-Gen eine OR von 3,84 (1,7-8,22) für das Auftreten eines T-NHL nachweisen. Im IL-4-Rezeptor-Gen zeigte sich für den SNP -28120C/T eine OR von 2,71 (1,09-6,75) (LAN ET AL. 2006). Der gleiche Polymorphismus ist auch korreliert mit dem Gesamtüberleben bei Patienten mit DLBCL (HABERMANN ET AL. 2008). Andere Studien konnten für B-Zell-Lymphome, jedoch nicht für T-Zell-Lymphome eine Assoziation eines SNPs (-29429C/T) im IL-4-Rezeptorgen aufzeigen (WANG S ET AL. 2006). Für das Risiko, an einer anderen Neoplasie zu erkranken, konnte ein Zusammenhang mit Polymorphismen im IL-4-Rezeptorgen aufgezeigt werden. Nach einer schwedischen Studie sind die auch in der vorliegenden Arbeit untersuchten Polymorphismen IL-4R S503P und IL-4R Q576R assoziiert mit dem Auftreten eines Glioblastoms (SCHWARTZBAUM ET AL. 2005).

Außer dieser Analyse liegen bislang keine Studien zu den in dieser Arbeit untersuchten SNPs in den TNF-Rezeptorgen im Zusammenhang zur Entstehung von Lymphomen vor. Jedoch konnte bezüglich des TNF/TNF-Rezeptor-Systems eine Studie des internationalen Lymphomkonsortiums InterLymph für den nicht in dieser Arbeit analysierten SNP(-308G/A) im TNF-Gen einen Einfluss auf das Risiko für die Entstehung eines NHL zeigen (ohne Untersuchung der Subgruppe der T-NHL, ROTHMAN ET AL. 2006). Eine weitere Arbeit konnte für den gleichen SNP eine signifikante Assoziation mit dem Auftreten von T-NHL zeigen (WANG S ET AL. 2006). Auch für die SNPs -863C/A und -57C/T sowie -857C/T im TNF-Gen konnten Assoziationen mit dem Auftreten von NHL bzw. T-NHL aufgezeigt werden (PURDUE ET AL. 2007; TSUKASAKI ET AL. 2001).

Dies zeigt insgesamt, dass dem IL-4 und seinem Rezeptor sowie TNF und seinem Rezeptor eine Bedeutung bei der Entstehung von Lymphomen zukommen kann und weitere Studien mit anderen SNPs in der Subgruppe der T-NHL-Patienten in Zukunft durchgeführt werden sollten. Es handelt sich bei der vorliegenden Arbeit um eine der ersten Arbeiten zu der Bedeutung von Polymorphismen in Zytokinrezeptorgen bei T-NHL. In zukünftigen Studien sollten weitere SNP in den untersuchten Zytokinsystemen in die Analysen einbezogen werden, und es könnten auch andere relevante Schlüsselzytokine untersucht werden, so zum Beispiel das IL-10, für das Assoziationen mit B-NHL nachgewiesen wurden (ROTHMAN ET AL. 2006; LECH-MARANDA ET AL. 2007; KUBE ET AL. 2008). Diese Arbeit liefert eine wichtige Orientierung für weitere

durchzuführende Studien, da mit Hilfe einer standardisierten und etablierten Messmethode Erkenntnisse über die Verteilung der untersuchten SNPs an T-NHL-Patienten gewonnen werden konnten.

6.2 Einfluss von TNF- und IL-4-Rezeptorgenpolymorphismen auf die Prognose von Patienten mit T-NHL

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, inwieweit die analysierten Polymorphismen im IL-4-Rezeptorgen und in TNF-Rezeptorgen mit dem Gesamtüberleben und dem ereignisfreien Überleben bei Patienten mit T-NHL assoziiert sein können. Dazu wurden die Ergebnisse der Genotypisierung mit den klinischen Daten von 117 T-NHL-Patienten aus der NHL-B1/B2-Studie (PFREUNDSCHUH ET AL. 2004a; PFREUNDSCHUH ET AL. 2004b) und der Ricover-60-Studie (PFREUNDSCHUH ET AL. 2008) verglichen. Die Patienten wurden in diesen Studien über einen Zeitraum von sieben Jahren beobachtet.

SNP -609 G/T im TNFRI-Gen und SNP M196 im TNFRII-Gen Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Promotorpolymorphismus TNFRI -609 G/T und einem kürzeren ereignisfreien Überleben bei T-NHL Patienten besteht ($p=0,041$). Patienten mit mindestens einem mutierten Allel TNFRI -609 T (TNFRI -609 TT und GT) haben ein signifikant kürzeres ereignisfreies Überleben als Individuen, die homozygot für das Wildtypallel TNFRI -609 G sind. Auch im Gesamtüberleben zeigte sich ein übereinstimmender Trend zu kürzerem Gesamtüberleben der Träger des mutierten Allels von TNFRI -609 T im Vergleich zu den homozygoten Wildtypallelträgern ($p=0,099$).

Auch bei dem Polymorphismus TNFRII M196R konnte ein Unterschied in den Überlebensraten aufgezeigt werden. Patienten mit der mutierten Variante TNFRII 196R zeigten im Vergleich zu homozygoten Trägern der Wildtypvariante TNFRII M196 eine längere ereignisfreie Überlebenszeit ($p=0,066$). Dieses Ergebnis erreichte nicht das statistische Signifikanzniveau. Aufgrund der Seltenheit der T-NHL und dem seltenen Vorkommen der mutierten Genotypen sind zur Überprüfung größere Studien notwendig.

Bei den Alk-negativen T-NHLs konnte kein Unterschied im OS und EFS bezüglich beider untersuchten SNPs im TNFRI/II-Gen gezeigt werden. Bei niedrigeren Patientenzahlen ($N=77$) in dieser Subgruppe traten statistisch instabile Kaplan-Meier-Kurven auf, die aus biologischen Überlegungen unplausibel erscheinen.

Bei Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit in Zusammenschau mit den Daten der Literatur erscheint ein Einfluss der untersuchten Genpolymorphismen wahrscheinlich. So stehen diese Ergebnisse im Einklang mit einer anderen Arbeit, welche zeigen konnte, dass der SNP -380G/A im TNF-Gen mit einer schlechteren Prognose bei Patienten mit NHL assoziiert ist (ohne Analyse der Subgruppe der T-NHL, WARZOCHA ET AL. 1998). Dies wurde durch zwei weitere Studien bestätigt (JUSZCZYNSKI ET AL. 2002; SEIDEMANN ET AL. 2005). Weitere untersuchte Polymorphismen im TNF-Gen waren hingegen ohne prognostische Bedeutung bei Patienten mit NHL (CERHAN ET AL. 2007b; HABERMANN ET AL. 2008). Die in der vorlie-

genden Arbeit untersuchten SNPs wurden erstmalig mit der Prognose bei NHL verglichen, so dass bislang keine anderen Studien zum Vergleich vorliegen.

Die vorliegenden Ergebnisse stehen auch in Übereinstimmung mit einer kürzlich veröffentlichten funktionellen Untersuchung, in der gezeigt werden konnte, dass der mutierte Genotyp des SNPs -609 T im TNFRI-Gen zu verminderter Expression von TNFRI führt (KIM S ET AL. 2008). Möglicherweise könnte die geringere Expression einen abgeschwächten Antitumoreffekt des TNF zur Folge haben. Dies könnte die schlechtere Prognose der Patienten mit dem T-Allel erklären. Auch eine weitere kürzlich entdeckte Assoziation dieses Promotorpolymorphismus mit einer anderen Krebserkrankung, dem hepatozellulären Karzinom, deutet darauf hin, dass die Genvariation funktionell relevant sein könnte (KIM S ET AL. 2008).

SNPs I75V, S503P und Q576R im IL-4R-Gen Für die untersuchten Variationen im IL-4-Rezeptorgen (I75V, S503P, Q576R) konnten in der gesamten untersuchten Studienpopulation keine Unterschiede im ereignisfreien Überleben oder Gesamtüberleben festgestellt werden. Auch bei der Unterguppe der ALK-negativen Lymphome konnte für die untersuchten Polymorphismen im IL-4R-Gen kein Unterschied im OS oder EFS aufgezeigt werden. Es ist zu bedenken, dass ein statistisch signifikantes Ergebnis möglicherweise durch die Seltenheit des mutierten Alleles nur in noch größeren Studien aufzufinden sein könnte. Teilweise traten instabile Kaplan-Meier-Kurven auf, die aus biologischen Überlegungen unplausibel erscheinen (siehe Abbildung 5.5).

Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse ergänzen bestehende Assoziationsstudien, welche betreffend der Bedeutung von Polymorphismen im IL-4R-Gen für die Prognose bei Lymphomen zu unterschiedlichen Ergebnissen gekommen sind. So konnte eine Studie für den SNP -28120T/C bei 458 untersuchten Patienten keinen Zusammenhang mit dem Überleben bei NHL-Patienten zeigen (CERHAN ET AL. 2007b). Im Gegensatz dazu konnte HABERMANN ET AL. bei dem Subtyp DLBCL eine signifikante Assoziation zwischen diesem SNP und der Prognose bei NHL-Patienten bei 365 untersuchten Patienten aufzeigen (HABERMANN ET AL. 2008). Auch für den in der vorliegenden Untersuchung analysierten SNP I75V konnte in einer Studie von SCHOOF ET AL. bei DLBCL-Patienten gezeigt werden, dass heterozygote und homozygote Träger der Allelvariante V75 ein kürzeres Gesamtüberleben und ereignisfreies Überleben aufweisen als Träger der Allelvariante I75 (n=278, SCHOOF ET AL. 2009). Neben diesen aufgezeigten Assoziationen mit der Prognose von Patienten mit Lymphomerkrankungen konnten auch für die Prognose anderer maligner Erkrankungen Zusammenhänge mit Polymorphismen im IL-4-Rezeptorgen gezeigt werden. Unter anderem waren in einer Studie von SCHEURER ET AL. die mutierten Genotypen des SNP S503P und T478C korreliert mit einem besseren Langzeitüberleben bei Patienten mit hochgradigen Gliomen (SCHEURER ET AL. 2008).

Für den in dieser Arbeit untersuchten SNP I75V liegen zudem Ergebnisse aus funktionellen Analysen vor. So konnte gezeigt werden, dass die I75-Variante zu einer verstärkten Signaltransduktion führt, und daher wurde diese als „*gain of function*“-Mutation bezeichnet (MITSUYASU ET AL. 1998). Eine weitere aktuellere Studie konnte für die I75V-Mutation eine erhöhte Tran-

6.3 Einfluss von TNF- und IL-4-Rezeptorpolymorphismen auf die Serumkonzentrationen der entsprechenden Rezeptoren bei Patienten mit T-NHL

skriptionsaktivität von STAT6 nachweisen, allerdings erstaunlicherweise ohne den Nachweis einer IL-4-induzierten Th2-Zell-Entwicklung (STEPHENSON ET AL. 2004). Die Assoziation von IL-4R-Genpolymorphismen mit Th2-vermittelten Erkrankungen wie Asthma und Atopie und die Hinweise auf eine Polymorphismus-assoziierte vermehrte Signaltransduktion über den IL-4R lassen dennoch vermuten, dass der IL-4R-I75V-Polymorphismus einen Einfluss auf das Th1/Th2-Gleichgewicht hat. Ein ebensolches Ungleichgewicht wurde bei T-NHL-Patienten beschrieben (KIM E ET AL. 2005). Somit könnte die Genvariante I75V die Entwicklung einer Th2-Immunantwort begünstigen, welche wiederum einen Proliferationsvorteil der T-Zellen der peripheren T-Zell-Lymphome bedingen. Auf diese Weise könnte diese genetische Variation einen Einfluss auf die Prognose von T-NHL-Patienten haben.

Die vorliegende Arbeit ist eine der ersten, welche den Zusammenhang zwischen Zytokinrezeptorpolymorphismen und der Prognose bei T-NHL untersucht. Diese Arbeit kann mit 117 Patienten als große Studie auf dem Gebiet der seltenen Erkrankung der T-NHL gelten. Es zeigen sich für das T-NHL aussagekräftige Einflüsse auf den Krankheitsverlauf. Zusammenfassend ermutigen die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse, auch in Hinblick auf die hier vorgestellte Forschungslage, den Einfluss der analysierten SNPs und auch möglicher weiterer SNPs der Zytokingene von IL-4 und TNF weiter intensiv zu untersuchen. Da es sich bei den Ergebnissen dieser Arbeit nur um univariate Analysen handelt, können daraus keine weitreichenden klinischen oder biologischen Schlüsse gezogen werden. Zukünftige Arbeiten oder Metaanalysen können jedoch auf den Ergebnissen dieser Arbeit aufbauen, und überprüfen, ob die tendenziellen Ergebnisse ein statistisches Signifikanzniveau erreichen. Aufgrund der standardisierten und etablierten Methodik können auch die gewonnenen negativen Ergebnisse für folgende Arbeiten eine Orientierung liefern.

6.3 Einfluss von TNF- und IL-4-Rezeptorpolymorphismen auf die Serumkonzentrationen der entsprechenden Rezeptoren bei Patienten mit T-NHL

Es konnte in mehreren Publikationen wie oben beschrieben gezeigt werden, dass Genpolymorphismen mit der Expression von Rezeptoren assoziiert sein können. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb auch der Einfluss der Polymorphismen in TNF-Rezeptorgenen und im IL-4-Rezeptorgen auf die Serumkonzentrationen löslicher TNF-Rezeptoren bzw. löslicher IL-4-Rezeptoren bei Patienten mit peripheren T-NHL untersucht. Klinische Studien berichten über pathologisch erhöhte Serumkonzentrationen löslicher TNF-Rezeptoren bei Patienten mit malignen Lymphomen. Diese Konzentrationen korrelieren mit dem Krankheitsverlauf und scheinen von prognostischer Bedeutung zu sein (WARZOCHA ET AL. 1997*b*; WARZOCHA ET AL. 1997*a*; GOTO ET AL. 2006; SALLES ET AL. 1996). Um die Frage zu klären, ob die genetischen Varianten einen Einfluss auf die Serumkonzentration der Zytokinrezeptoren haben,

wurden in dieser Arbeit die Ergebnisse der Genotypisierung mit den per ELISA gemessenen Konzentrationen verglichen.

SNP -609 G/T im TNFRI-Gen und SNP M196 im TNFRII-Gen Es wurde eine durchschnittliche Serumkonzentration zwischen 1,9 und 2,1 ng/ml des löslichen TNFRI bei Patienten mit T-NHL gemessen. Die mittlere Serumkonzentration des löslichen TNFRII wurde zwischen 3,1 und 4,0 ng/ml bestimmt. Bezüglich des Promotorpolymorphismus TNFRI -609 G/T und dem Polymorphismus TNFRII M196R zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Serumkonzentration zwischen den Genotypen. Es wurde auch kein Trend bezüglich einer Assoziation dieser Polymorphismen mit der Konzentration festgestellt.

Diese Arbeit ist die erste, welche den Zusammenhang dieser Variationen und der Serumkonzentration an Patienten mit T-NHL untersucht hat. Es liegen mehrere Studien an Patienten mit verschiedenen Erkrankungen zu diesem Zusammenhang vor. Dabei konnte für manche Patientenkollektive eine Assoziation nachweisen werden, während für andere Erkrankungen — wie in der vorliegenden Arbeit — kein Zusammenhang gezeigt werden konnte.

So konnte bei einer Reihe von Erkrankungen ein Zusammenhang zwischen der Genvariation TNFR II M196R mit den Serumwerten gezeigt werden. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis konnte an Studien mit 151 bzw. 49 Patienten für Träger des mutierten Genotyps eine erniedrigte Serumkonzentration an löslichem TNFR gemessen werden (GLOSSOP ET AL. 2005; TOLUSSO ET AL. 2004). Entsprechende Einflüsse dieses SNPs konnten auch an Patienten mit GvHD, Osteoporose und familiärer Hyperlipidämie gezeigt werden (STARK ET AL. 2003; KIM H ET AL. 2009; GEURTS ET AL. 2000). Im Gegensatz zu diesen Publikationen konnte in Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen bei Patienten mit Sepsis in einer größeren Studie (n=213) für beide in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen kein Zusammenhang mit der Serumkonzentration ermittelt werden (GORDON ET AL. 2004). Auch für Patienten mit Endometriose konnte für den SNP TNFRII M196R keine Einfluss auf die Serumkonzentration des löslichen Rezeptors gefunden werden (n=105, CHAE ET AL. 2008). Weiterhin fand eine Studie an Patienten mit PCO-Syndrom keine Assoziation der Genvariation TNFII M196R und der Serumkonzentration (PERAL ET AL. 2002). Es ist noch nicht endgültig geklärt, warum die untersuchten SNPs auf die Serumkonzentration bei verschiedenen Erkrankungen unterschiedliche Relevanz haben. Die Assoziation des Polymorphismus TNFR M196R mit den Serumwerten des löslichen TNFRII wurde jedoch vor allem bei Autoimmunerkrankungen beobachtet. Bei dem in dieser Arbeit untersuchten T-NHL konnte keine Assoziation nachgewiesen werden. Möglicherweise dominiert bei Tumorerkrankungen der Einfluss anderer Faktoren auf die Konzentration löslicher TNFRII, sodass die genetischen Faktoren nicht zur Ausprägung kommen.

Der genaue Mechanismus, über welchen die Genvariante M196R einen Einfluss auf die Rezeptorkonzentration ausübt, wird derzeit diskutiert. Der Polymorphismus resultiert in einem Aminosäureaustausch an Position 196 von Arginin zu Methionin. Der SNP befindet sich in der Nähe des Prolinrests Pro 221, der als proteolytischer Spaltpunkt durch TACE-Protease vermutet wird (HERMAN UND CHERNAJOVSKY 1998). Der Ort und die Art des Austausches

deuten darauf hin, dass hierdurch die Verarbeitung des membrangebundenen TNFR_{II} durch die TACE-Protease beeinflusst werden kann. Jedoch zeigten funktionelle Analysen dieses Polymorphismus, dass dieser keinen Einfluss auf die Freisetzung von löslichem TNFR_{II}-Rezeptor von der Zelloberfläche hat und auch nicht das physiologische Bindevverhalten beeinflusst (MORITA ET AL. 2001). Die Ergebnisse dieser funktionellen Analyse stehen daher in Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, die ebenfalls keine Assoziation des SNPs mit der Konzentration des löslichen Rezeptors aufzeigen konnte.

SNPs I75V, S503P und Q576R im IL-4R-Gen Diese Arbeit ist die erste, welche den Zusammenhang von IL-4R-Genpolymorphismen mit dem Expressionslevel von löslichem IL-4R an Patienten mit T-NHL untersucht hat. Die gemessene mittlere Serumkonzentration bei den untersuchten T-NHL-Patienten betrug zwischen 0,070 und 0,131 ng/ml . Bezüglich der untersuchten SNPs im IL-4R-Gen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden. Andere Studien an anderen SNPs im IL-4R-Gen bei Patienten mit Asthma und an gesunden Probanden konnten einen Zusammenhang zwischen Genotyp und Expressionslevel zeigen (HACKSTEIN ET AL. 2001).

7 Zusammenfassung

Vorhergehende Forschungsarbeiten zeigen, dass bestimmte Genvariationen in Zytokinen und Zytokinrezeptoren mit der Suszeptibilität und Prognose von Lymphomen assoziiert sind. Dieser Zusammenhang ist vor allem für B-NHL beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob genetische Polymorphismen in Zytokinrezeptorgenen mit der Entstehung und der Prognose von T-NHL assoziiert sind, und ob diese mit dem Plasmaspiegel löslicher Zytokinrezeptoren korreliert sind.

Für die Analyse standen 117 DNA-Proben und 80 Serumproben von T-NHL-Patienten aus den NHL-B1/B2-Studien und der Ricover-60-Studie zur Verfügung. Diese wurden genotypisiert, und die Konzentration der löslichen Zytokinrezeptoren wurde ermittelt. Die Daten wurden mit den klinischen Parametern der Patienten verglichen und eine Überlebenszeitanalyse für die einzelnen Genotypen im Patientenkollektiv erstellt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Variante TNFI -609 T des Promotorpolymorphismus im TNFI-Rezeptorgen mit einem kürzeren EFS bei Patienten mit T-NHL assoziiert ist ($p = 0,041$). Für diese Genvariation konnte auch ein Trend zu kürzerem Gesamtüberleben ($p = 0,099$, n.s.) aufgezeigt werden. Ein weiterer Trend zeigte sich für die Genvariation TNFR2 M196R in Hinblick auf das ereignisfreie Überleben ($p = 0,066$).

Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal einen Einfluss der untersuchten Zytokinrezeptorpolymorphismen auf T-NHL. Die Studie kann mit einer Patientenzahl von 117 zu den größeren Studien über diese seltene Erkrankung gezählt werden. Weitere, größere Studien sollten diese Ergebnisse überprüfen und auch weitere SNPs in den untersuchten Zytokinsystemen mit einbeziehen. Sowohl diese positiven Ergebnisse wie auch die berichteten negativen Ergebnisse dieser Arbeit können für folgende Forschungsarbeiten eine wichtige Orientierung liefern. Die Erforschung genetischer Faktoren ist notwendig, um Krankheitsverläufe besser zu definieren und das Ansprechen auf Behandlungsmaßnahmen beim einzelnen Patienten einschätzbar zu machen. Außerdem kann die Kenntnis der Genmerkmale und der immunologischen Hintergründe neue pharmakologische Behandlungsstrategien eröffnen.

8 Literaturverzeichnis

- Aderka D (1996): The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 231–240
- Aganna E, Hammond L, Hawkins P, Aldea A, McKee S, Amstel H, Mischung C, Kusuhara K, Saulsbury F, Lachmann H et al. (2003): Heterogeneity among patients with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome phenotypes. *Arthritis Rheum* 48, 2632–2644
- Aggarwal B (2003): Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3, 745–756
- Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T (1990): Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J* 4, 2860–2867
- Aksentjevich I, Galon J, Soares M, Mansfield E, Hull K, Oh H, Goldbach-Mansky R, Dean J, Athreya B, Reginato A et al. (2001): The tumor-necrosis-factor receptor-associated periodic syndrome: new mutations in TNFRSF1A, ancestral origins, genotype-phenotype studies, and evidence for further genetic heterogeneity of periodic fevers. *Am J Hum Genet* 69, 301–314
- Allen R, Lee E, Roberts D, Park B, Pirmohamed M (2001): Polymorphisms in the TNF-alpha and TNF-receptor genes in patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest* 31, 843–851
- Andrews R, Burrell L, Rosa-Rosa L, Cunningham C, Brzezinski J, Bernstein J, Hershey G. K (2001): Analysis of the Ser786Pro interleukin-4 receptor alpha allelic variant in allergic and nonallergic asthma and its functional consequences. *Clin Immunol* 100, 298–304
- Antonarakis S (1998): Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat* 11, 1–3
- Armitage R (1994): Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol* 6, 407–413
- Asadullah K, Döcke W, Haeussler A, Sterry W, Volk H (1996): Progression of mycosis fungoides is associated with increasing cutaneous expression of interleukin-10 mRNA. *J Invest Dermatol* 107, 833–837
- Banner D, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld H, Broger C, Loetscher H, Lesslauer W (1993): Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73, 431–445

- Barton A, John S, Ollier W, Silman A, Worthington J (2001): Association between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor II, but not tumor necrosis factor receptor I, in Caucasians. *Arthritis Rheum* 44, 61–65
- Beltinger C, White P, Maris J, Sulman E, Jensen S, LePaslier D, Stallard B, Goeddel D, Sauvage F, Brodeur G (1996): Physical mapping and genomic structure of the human TNFR2 gene. *Genomics* 35, 94–100
- Bergin A.-M, Balder B, Kishore S, Swärd K, Hahn-Zoric M, Löwhagen O, Hanson L, Padyukov L (2006): Common variations in the IL4R gene affect splicing and influence natural expression of the soluble isoform. *Hum Mutat* 27, 990–998
- Bitter M, Franklin W, Larson R, McKeithan T, Rubin C, Beau M. L, Stephens J, Vardiman J (1990): Morphology in Ki-1(CD30)-positive non-Hodgkin's lymphoma is correlated with clinical features and the presence of a unique chromosomal abnormality, t(2;5)(p23;q35). *Am J Surg Pathol* 14, 305–316
- Bridges S, Jenq G, Moran M, Kuffner T, Whitworth W, McNicholl J (2002): Single-nucleotide polymorphisms in tumor necrosis factor receptor genes: definition of novel haplotypes and racial/ethnic differences. *Arthritis Rheum* 46, 2045–2050
- Canellos G, T. Andrew M. L, Young B: *The Lymphomas*. Saunders, Philadelphia 2006
- Cerhan J, Ansell S, Fredericksen Z, Kay N, Liebow M, Call T, Dogan A, Cunningham J, Wang A, Liu-Mares W et al. (2007a): Genetic variation in 1253 immune and inflammation genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 110, 4455–4463
- Cerhan J, Wang S, Maurer M, Ansell S, Geyer S, Cozen W, Morton L, Davis S, Severson R, Rothman N et al. (2007b): Prognostic significance of host immune gene polymorphisms in follicular lymphoma survival. *Blood* 109, 5439–5446
- Chae S, Kim H, Jee B, Suh C, Kim S, Kim J (2008): Tumor necrosis factor (TNF)-TNF receptor gene polymorphisms and their serum levels in Korean women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 60, 432–439
- Chakravarti A (1999): Population genetics—making sense out of sequence. *Nat Genet* 21, 56–60
- Chan A, Ho J, Chiang A, Srivastava G (1999): Phenotypic and cytotoxic characteristics of peripheral T-cell and NK-cell lymphomas in relation to Epstein-Barr virus association. *Histopathology* 34, 16–24
- Chan F, Chun H, Zheng L, Siegel R, Bui K, Lenardo M (2000): A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288, 2351–2354
- Chanock S (2001): Candidate genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the study of human disease. *Dis Markers* 17, 89–98

- Chomarat P, Banchereau J (1997): An update on interleukin-4 and its receptor. *Eur Cytokine Netw* 8, 333–344
- Constantin A, Dieudé P, Lauwers-Cancès V, Jamard B, Mazières B, Cambon-Thomsen A, Cornélis F, Cantagrel A (2004): Tumor necrosis factor receptor II gene polymorphism and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50, 742–747
- Cordingley F, Bianchi A, Hoffbrand A, Reittie J, Heslop H, Vyakarnam A, Turner M, Meager A, Brenner M (1988): Tumour necrosis factor as an autocrine tumour growth factor for chronic B-cell malignancies. *Lancet* 1998(1), 969–971
- Daley T, Metcalfe D, Akin C (2001): Association of the Q576R polymorphism in the interleukin-4 receptor alpha chain with indolent mastocytosis limited to the skin. *Blood* 98, 880–882
- Dancescu M, Rubio-Trujillo M, Biron G, Bron D, Delespesse G, Sarfati M (1992): Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J Exp Med* 176, 1319–1326
- Deichmann K, Bardutzky J, Forster J, Heinzmann A, Kuehr J (1997): Common polymorphisms in the coding part of the IL4-receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 696–697
- Dieudé P, Petit E, Cailleau-Moindrault S, Osorio J, Pierlot C, Martinez M, Fauré S, Alibert O, Lasbleiz S, Toma C. D et al. (2002): Association between tumor necrosis factor receptor II and familial, but not sporadic, rheumatoid arthritis: evidence for genetic heterogeneity. *Arthritis Rheum* 46, 2039–2044
- Drexler H, Gignac S, Wasielewski R, Werner M, Dirks W (2000): Pathobiology of NPM-ALK and variant fusion genes in anaplastic large cell lymphoma and other lymphomas. *Leukemia* 14, 1533–1559
- Duschl A, Sebald W (1996): Transmembrane and intracellular signalling by interleukin-4: receptor dimerization and beyond. *Eur Cytokine Netw* 7, 37–49
- Duyster J, Bai R, Morris S (2001): Translocations involving anaplastic lymphoma kinase (ALK). *Oncogene* 20, 5623–5637
- Fabris M, Tulusso B, Poi E. D, Assaloni R, Sinigaglia L, Ferraccioli G (2002): Tumor necrosis factor-alpha receptor II polymorphism in patients from southern Europe with mild-moderate and severe rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 29, 1847–1850
- Foss H, Marafioti T, Stein H (2000): Die vielen Gesichter des anaplastischen großzelligen Lymphoms. *Pathologe* 21, 124–136
- Galizzi J, Zuber C, Harada N, Gorman D, Djossou O, Kastelein R, Banchereau J, Howard M, Miyajima A (1990): Molecular cloning of a cDNA encoding the human interleukin 4 receptor. *Int Immunol* 2, 669–675

- Geurts J, Janssen R, Greevenbroek M, Kallen C, Cantor R, Bu X, Aouizerat B, Allayee H, Rotter J, Bruin T (2000): Identification of TNFRSF1B as a novel modifier gene in familial combined hyperlipidemia. *Hum Mol Genet* 9, 2067–2074
- Gisselbrecht C, Gaulard P, Lepage E, Coiffier B, Brière J, Haioun C, Cazals-Hatem D, Bosly A, Xerri L, Tilly H et al. (1998): Prognostic significance of T-cell phenotype in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood* 92, 76–82
- Glossop J, Dawes P, Nixon N, Matthey D (2005): Polymorphism in the tumour necrosis factor receptor II gene is associated with circulating levels of soluble tumour necrosis factor receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7, R1227–R1234
- Gordon A, Lagan A, Aganna E, Cheung L, Peters C, McDermott M, Millo J, Welsh K, Holloway P, Hitman G et al. (2004): TNF and TNFR polymorphisms in severe sepsis and septic shock: a prospective multicentre study. *Genes Immun* 5, 631–640
- Goto N, Tsurumi H, Takemura M, Hara T, Sawada M, Kasahara S, Kanemura N, Yamada T, Shimizu M, Takahashi T et al. (2006): Serum-soluble tumor necrosis factor receptor 2 (sTNF-R2) level determines clinical outcome in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 77, 217–225
- Greer J, Kinney M, Loughran T (2001): T cell and NK cell lymphoproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* , 259–281
- Groves F, Linet M, Travis L, Devesa S (2000): Cancer surveillance series: non-Hodgkin's lymphoma incidence by histologic subtype in the United States from 1978 through 1995. *J Natl Cancer Inst* 92, 1240–1251
- Gustafson T, He W, Craparo A, Schaub C, O'Neill T (1995): Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain. *Mol Cell Biol* 15, 2500–2508
- Habermann T, Wang S, Maurer M, Morton L, Lynch C, Ansell S, Hartge P, Severson R, Rothman N, Davis S et al. (2008): Host immune gene polymorphisms in combination with clinical and demographic factors predict late survival in diffuse large B-cell lymphoma patients in the pre-rituximab era. *Blood* 112, 2694–2702
- Hackstein H, Hecker M, Kruse S, Bohnert A, Ober C, Deichmann K, Bein G (2001): A novel polymorphism in the 5' promoter region of the human interleukin-4 receptor alpha-chain gene is associated with decreased soluble interleukin-4 receptor protein levels. *Immunogenetics* 53, 264–269
- Hackstein H, Klüter H, Fricke L, Hoyer J, Bein G (1999): The IL-4 receptor alpha-chain variant Q576R is strongly associated with decreased kidney allograft survival. *Tissue Antigens* 54, 471–477

- Harada N, Higuchi K, Wakao H, Hamasaki N, Izuhara K (1998): Identification of the critical portions of the human IL-4 receptor alpha chain for activation of STAT6. *Biochem Biophys Res Commun* 246, 675–680
- Harris N, Jaffe E, Stein H, Banks P, Chan J, Cleary M, Delsol G, Wolf-Peeters C. D, Falini B, Gatter K (1994): A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84, 1361–1392
- Hehlgans T, Pfeffer K (2005): The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115, 1–20
- Helms M, Mohamed A, MacEwan D (2001): Modulated kinase activities in cells undergoing tumour necrosis factor-induced apoptotic cell death. *FEBS Lett* 505, 68–74
- Herman C, Chernajovsky Y (1998): Mutation of proline 211 reduces shedding of the human p75 TNF receptor. *J Immunol* 160, 2478–2487
- Hershey G, Friedrich M, Esswein L, Thomas M, Chatila T (1997): The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med* 337, 1720–1725
- Hiddemann W, Dreyling M, Stein H: *Lymphome: neue Erkenntnisse und Therapiestrategien*. Thieme, Stuttgart 2004
- Hinds D, Stuve L, Nilsen G, Halperin E, Eskin E, Ballinger D, Frazer K, Cox D (2005): Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science* 307, 1072–1079
- Hoelzer D, Gökbüget N, Digel W, Faak T, Kneba M, Reutzel R, Romejko-Jarosinska J, Zwolinski J, Walewski J (2002): Outcome of adult patients with T-lymphoblastic lymphoma treated according to protocols for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 99, 4379–4385
- Hohjoh H, Terada N, Kawashima M, Honda Y, Tokunaga K (2000): Significant association of the tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) gene with human narcolepsy. *Tissue Antigens* 56, 446–448
- Hollegaard M, Bidwell J (2006): Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 3. *Genes Immun* 7, 269–276
- Howard T, Koppelman G, Xu J, Zheng S, Postma D, Meyers D, Bleeker E (2002): Gene-gene interaction in asthma: IL4RA and IL13 in a Dutch population with asthma. *Am J Hum Genet* 70, 230–236
- Hsu H, Xiong J, Goeddel D (1995): The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81, 495–504

- Hsu S, Hsu P (1994): Autocrine and paracrine functions of cytokines in malignant lymphomas. *Biomed Pharmacother* 48, 433–444
- Hsu S, Waldron J, Hsu P, Hough A (1993): Cytokines in malignant lymphomas: review and prospective evaluation. *Hum Pathol* 24, 1040–1057
- Idzerda R, March C, Mosley B, Lyman S, Bos T, Gimpel S, Din W, Grabstein K, Widmer M, Park L (1990): Human interleukin 4 receptor confers biological responsiveness and defines a novel receptor superfamily. *J Exp Med* 171, 861–873
- Ihle J, Kerr I (1995): Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 11, 69–74
- Isaacson P, Wright D (1978): Intestinal lymphoma associated with malabsorption. *Lancet* 1978(1), 67–70
- Ishikawa Y, Kashiwase K, Akaza T, Morishima Y, Inoko H, Sasazuki T, Kodera Y, Juji T (2002): Polymorphisms in TNFA and TNFR2 affect outcome of unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 29, 569–575
- Jaffe E (2006): Pathobiology of peripheral T-cell lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* , 317–322
- Jücker M, Abts H, Li W, Schindler R, Merz H, Günther A, Kalle C, Schaadt M, Diamantstein T, Feller A (1991): Expression of interleukin-6 and interleukin-6 receptor in Hodgkin's disease. *Blood* 77, 2413–2418
- Jung T, Schrader N, Hellwig M, Enssle K, Neumann C (1999): Soluble human interleukin-4 receptor is produced by activated T cells under the control of metalloproteinases. *Int Arch Allergy Immunol* 119, 23–30
- Jupp O, McFarlane S, Anderson H, Littlejohn A, Mohamed A, MacKay R, Vandenabeele P, MacEwan D (2001): Type II tumour necrosis factor-alpha receptor (TNFR2) activates c-Jun N-terminal kinase (JNK) but not mitogen-activated protein kinase (MAPK) or p38 MAPK pathways. *Biochem J* 359, 525–535
- Juszczynski P, Kalinka E, Bienvenu J, Woszczek G, Borowiec M, Robak T, Kowalski M, Lech-Maranda E, Baseggio L, Coiffier B et al. (2002): Human leukocyte antigens class II and tumor necrosis factor genetic polymorphisms are independent predictors of non-Hodgkin lymphoma outcome. *Blood* 100, 3037–3040
- Kadin M (1990): The spectrum of Ki-1+ cutaneous lymphomas. *Curr Probl Dermatol* 19, 132–143
- Kanemitsu S, Takabayashi A, Sasaki Y, Kuromaru R, Ihara K, Kaku Y, Sakai K, Hara T (1999): Association of interleukin-4 receptor and interleukin-4 promoter gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 42, 1298–1300

- Kari L, Loboda A, Nebozhyn M, Rook A, Vonderheid E, Nichols C, Virok D, Chang C, Horng W.-H, Johnston J et al. (2003): Classification and prediction of survival in patients with the leukemic phase of cutaneous T cell lymphoma. *J Exp Med* 197, 1477–1488
- Kemper O, Wallach D (1993): Cloning and partial characterization of the promoter for the human p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor. *Gene* 134, 209–216
- Kim E, Hess S, Richardson S, Newton S, Showe L, Benoit B, Ubriani R, Vittorio C, Junkins-Hopkins J, Wysocka M et al. (2005): Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J Clin Invest* 115, 798–812
- Kim H, Chun S, Ku S, Suh C, Choi Y, Kim J (2009): Association between polymorphisms in tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor genes and circulating TNF, soluble TNF receptor levels, and bone mineral density in postmenopausal Korean women. *Menopause* ,
- Kim J, Moon S, Ryu H, Kim J, Kim H, Park C, Kimm K, Oh B, Lee J (2005): Identification of regulatory polymorphisms in the TNF-TNF receptor superfamily. *Immunogenetics* 57, 297–303
- Kim S, Moon S, Kim Y, Kim J, Ryu H, Kim Y, Choi J, Park H, Kim D, Shin H et al. (2008): TNFR1 promoter -329G/T polymorphism results in allele-specific repression of TNFR1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 368, 395–401
- Knutsen A, Kariuki B, Consolino J, Warriar M (2006): IL-4 alpha chain receptor (IL-4Ralpha) polymorphisms in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Clin Mol Allergy* 4, 3
- Komata T, Tsuchiya N, Matsushita M, Hagiwara K, Tokunaga K (1999): Association of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 53, 527–533
- Krippner-Heidenreich A, Tübing F, Bryde S, Willi S, Zimmermann G, Scheurich P (2002): Control of receptor-induced signaling complex formation by the kinetics of ligand/receptor interaction. *J Biol Chem* 277, 44155–44163
- Krüger R, Hardt C, Tschentscher F, Jäckel S, Kuhn W, Müller T, Werner J, Voitalla D, Berg D, Kühnl N et al. (2000): Genetic analysis of immunomodulating factors in sporadic Parkinson's disease. *J Neural Transm* 107, 553–562
- Kruse S, Forster J, Kuehr J, Deichmann K (1999a): Characterization of the membrane-bound and a soluble form of human IL-4 receptor alpha produced by alternative splicing. *Int Immunol* 11, 1965–1970
- Kruse S, Japha T, Tedner M, Sparholt S, Forster J, Kuehr J, Deichmann K (1999b): The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with atopy and influence the signal transduction. *Immunology* 96, 365–371

- Kube D, Hua T, Bonin F, Schoof N, Zeynalova S, Klöss M, Gocht D, Potthoff B, Tzvetkov M, Brockmüller J et al. (2008): Effect of interleukin-10 gene polymorphisms on clinical outcome of patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma: an exploratory study. *Clin Cancer Res* 14, 3777–3784
- Kuo N, Lympny P, Menezes V, Lagan A, John S, Yeo T, Liyanage S, Bois R, Welsh K, Lightman S (2005): TNF-857T, a genetic risk marker for acute anterior uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 1565–1571
- Kutok J, Aster J (2002): Molecular biology of anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 20, 3691–3702
- Lainez B, Fernandez-Real J, Romero X, Esplugues E, Cañete J, Ricart W, Engel P (2004): Identification and characterization of a novel spliced variant that encodes human soluble tumor necrosis factor receptor 2. *Int Immunol* 16, 169–177
- Lan Q, Zheng T, Rothman N, Zhang Y, Wang S, Shen M, Berndt S, Zahm S, Holford T, Leaderer B et al. (2006): Cytokine polymorphisms in the Th1/Th2 pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 107, 4101–4108
- Lech-Maranda E, Baseggio L, Charlot C, Rigal D, Berger F, Jamrozik K, Warzocha K, Coiffier B, Salles G (2007): Genetic polymorphisms in the proximal IL-10 promoter and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 48, 2235–2238
- Letzelter F, Wang Y, Sebald W (1998): The interleukin-4 site-2 epitope determining binding of the common receptor gamma chain. *Eur J Biochem* 257, 11–20
- Malerba G, Pignatti P (2005): A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates. *J Appl Genet* 46, 93–104
- Mason D, Bastard C, Rimokh R, Dastugue N, Huret J, Kristoffersson U, Magaud J, Nezelof C, Tilly H, Vannier J (1990): CD30-positive large cell lymphomas ('Ki-1 lymphoma') are associated with a chromosomal translocation involving 5q35. *Br J Haematol* 74, 161–168
- Merz H, Houssiau F, Orscheschek K, Renaud J, Fliedner A, Herin M, Noel H, Kadin M, Mueller-Hermelink H, Snick J. V (1991): Interleukin-9 expression in human malignant lymphomas: unique association with Hodgkin's disease and large cell anaplastic lymphoma. *Blood* 78, 1311–1317
- Mestiri S, Bouaouina N, Ahmed S, Chouchane L (2005): A functional polymorphism of the tumor necrosis factor receptor-II gene associated with the survival and relapse prediction of breast carcinoma. *Cytokine* 30, 182–187
- Metkar S, Naresh K, Manna P, Srinivas V, Advani S, Nadkarni J (2000): Circulating levels of TNF alpha and TNF receptor superfamily members in lymphoid neoplasia. *Am J Hematol* 65, 105–110

- Mitrou P: *Non-Hodgkin-Lymphome*. Tumorzentrum Rhein-Main, Frankfurt / Main 2001
- Mitsuyasu H, Izuhara K, Mao X, Gao P, Arinobu Y, Enomoto T, Kawai M, Sasaki S, Dake Y, Hamasaki N et al. (1998): Ile50Val variant of IL4R alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. *Nat Genet* 19, 119–120
- Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K (1992): Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol* 10, 295–331
- Miyazaki T, Kawahara A, Fujii H, Nakagawa Y, Minami Y, Liu Z, Oishi I, Silvennoinen O, Witthuhn B, Ihle J (1994): Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science* 266, 1045–1047
- Morita C, Horiuchi T, Tsukamoto H, Hatta N, Kikuchi Y, Arinobu Y, Otsuka T, Sawabe T, Harashima S, Nagasawa K et al. (2001): Association of tumor necrosis factor receptor type II polymorphism 196R with Systemic lupus erythematosus in the Japanese: molecular and functional analysis. *Arthritis Rheum* 44, 2819–2827
- Müllberg J, Durie F, Otten-Evans C, Alderson M, Rose-John S, Cosman D, Black R, Mohler K (1995): A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the IL-6 receptor and the p60 TNF receptor. *J Immunol* 155, 5198–5205
- Murata T, Obiri N, Puri R (1998): Structure of and signal transduction through interleukin-4 and interleukin-13 receptors (review). *Int J Mol Med* 1, 551–557
- Naismith J, Sprang S (1998): Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci* 23, 74–79
- Nakamura E, Megumi Y, Kobayashi T, Kamoto T, Ishitoya S, Terachi T, Tachibana M, Matsushiro H, Habuchi T, Takechi Y et al. (2002): Genetic polymorphisms of the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with an increasing risk and a poor prognosis of sporadic renal cell carcinoma in a Japanese population. *Clin Cancer Res* 8, 2620–2625
- Nelms K, Keegan A, Zamorano J, Ryan J, Paul W (1999): The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 17, 701–738
- Nishimura M, Maeda M, Matsuoka M, Mine H, Saji H, Matsui M, Kuroda Y, Kawakami H, Uchiyama T (2000): Tumor necrosis factor, tumor necrosis factor receptors type 1 and 2, lymphotoxin-alpha, and HLA-DRB1 gene polymorphisms in human T-cell lymphotropic virus type I associated myelopathy. *Hum Immunol* 61, 1262–1269
- Noma T, Nakakubo H, Sugita M, Kumagai S, Maeda M, Shimizu A, Honjo T (1989): Expression of different combinations of interleukins by human T cell leukemic cell lines that are clonally related. *J Exp Med* 169, 1853–1858

- Ober C, Leavitt S, Tsalenko A, Howard T, Hoki D, Daniel R, Newman D, Wu X, Parry R, Lester L et al. (2000): Variation in the interleukin 4-receptor alpha gene confers susceptibility to asthma and atopy in ethnically diverse populations. *Am J Hum Genet* 66, 517–526
- Ohnishi K, Ichikawa A, Kagami Y, Nagasaka T, Niwa T, Hotta T, Saito H (1990): Interleukin 4 and gamma-interferon may play a role in the histopathogenesis of peripheral T-cell lymphoma. *Cancer Res* 50, 8028–8033
- Pantelidis P, Lympany P, Foley P, Fanning G, Welsh K, Bois R (1999): Polymorphic analysis of the high-affinity tumor necrosis factor receptor 2. *Tissue Antigens* 54, 585–591
- Papadavid E, Economidou J, Psarra A, Kapsimali V, Mantzana V, Antoniou C, Limas K, Stratigos A, Stavrianeas N, Avgerinou G et al. (2003): The relevance of peripheral blood T-helper 1 and 2 cytokine pattern in the evaluation of patients with mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Br J Dermatol* 148, 709–718
- Paul W (1991): Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 77, 1859–1870
- Peral B, Millán J, Castello R, Moghetti P, Escobar-Morreale H (2002): Comment: the methionine 196 arginine polymorphism in exon 6 of the TNF receptor 2 gene (TNFRSF1B) is associated with the polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3977–3983
- Perry R, Collins J, Wiener H, Acton R, Go R (2001): The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22, 873–883
- Pfreundschuh M: *Therapiefortschritte bei aggressiven Lymphomen*. Uni-MED, Bremen 2004
- Pfreundschuh M, Trümper L, Kloess M, Schmits R, Feller A, Rube C, Rudolph C, Reiser M, Hossfeld D, Eimermacher H et al. (2004a): Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of elderly patients with aggressive lymphomas: results of the NHL-B2 trial of the DSHNHL. *Blood* 104, 634–641
- Pfreundschuh M, Trümper L, Kloess M, Schmits R, Feller A, Rudolph C, Reiser M, Hossfeld D, Metzner B, Hasenclever D et al. (2004b): Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of young patients with good-prognosis (normal LDH) aggressive lymphomas: results of the NHL-B1 trial of the DSHNHL. *Blood* 104, 626–633
- Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, Schmits R, Mohren M, Lengfelder E, Reiser M, Nickenig C, Clemens M, Peter N et al. (2008): Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol* 9, 105–116
- Pierik M, Vermeire S, Steen K, Joossens S, Claessens G, Vlietinck R, Rutgeerts P (2004): Tumour necrosis factor-alpha receptor 1 and 2 polymorphisms in inflammatory bowel disease and their association with response to infliximab. *Aliment Pharmacol Ther* 20, 303–310

- Pimentel-Muñoz F, Seed B (1999): Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation. *Immunity* 11, 783–793
- Pitts S, Olomolaiye O, Elson C, Westacott C, Bidwell J (1998): Identification of a rare Bg/II polymorphism in the promoter region of the human TNF receptor type I (p55) gene. *Eur J Immunogenet* 25, 271–272
- Pritchard M, Baker E, Whitmore S, Sutherland G, Idzerda R, Park L, Cosman D, Jenkins N, Gilbert D, Copeland N (1991): The interleukin-4 receptor gene (IL4R) maps to 16p11.2-16p12.1 in human and to the distal region of mouse chromosome 7. *Genomics* 10, 801–806
- Prots I, Skapenko A, Wendler J, Mattyasovszky S, Yoné C, Spriewald B, Burkhardt H, Rau R, Kalden J, Lipsky P et al. (2006): Association of the IL4R single-nucleotide polymorphism I50V with rapidly erosive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54, 1491–1500
- Purdue M, Lan Q, Kricker A, Grulich A, Vajdic C, Turner J, Whitby D, Chanock S, Rothman N, Armstrong B (2007): Polymorphisms in immune function genes and risk of non-Hodgkin lymphoma: findings from the New South Wales non-Hodgkin Lymphoma Study. *Carcinogenesis* 28, 704–712
- Raziuddin S, Sheikha A, Abu-Eshy S, Al-Janadi M (1998): Regulation of interleukin-4 production and cytokine-induced growth potential in peripheral T-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Br J Haematol* 100, 310–316
- Rothman N, Skibola C, Wang S, Morgan G, Lan Q, Smith M, Spinelli J, Willett E, Sanjose S, Cocco P et al. (2006): Genetic variation in TNF and IL10 and risk of non-Hodgkin lymphoma: a report from the InterLymph Consortium. *Lancet Oncol* 7, 27–38
- Rüdiger T, Weisenburger D, Anderson J, Armitage J, Diebold J, MacLennan K, Nathwani B, Ullrich F, Müller-Hermelink H, Project N.-H. L. C (2002): Peripheral T-cell lymphoma (excluding anaplastic large-cell lymphoma): results from the Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol* 13, 140–149
- Ryan J, McReynolds L, Keegan A, Wang L, Garfein E, Rothman P, Nelms K, Paul W (1996): Growth and gene expression are predominantly controlled by distinct regions of the human IL-4 receptor. *Immunity* 4, 123–132
- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt S, Kakol J, Stein L, Marth G, Sherry S, Mullikin J, Mortimore B, Willey D et al. (2001): A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409, 928–933
- Salles G, Bienvenu J, Bastion Y, Barbier Y, Doche C, Warzocha K, Gutowski M, Rieux C, Coiffier B (1996): Elevated circulating levels of TNFalpha and its p55 soluble receptor are associated with an adverse prognosis in lymphoma patients. *Br J Haematol* 93, 352–359

- Sankar V, Girisha K, Gilmour A, Singh V, Sinha N, Tewari S, Ramesh V, Mastana S, Agrawal S (2005): TNFR2 gene polymorphism in coronary artery disease. *Indian J Med Sci* 59, 104–108
- Santee S, Owen-Schaub L (1996): Human tumor necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promoter characterization. *J Biol Chem* 271, 21151–21159
- Scheurer M, Amirian E, Cao Y, Gilbert M, Aldape K, Kornguth D, El-Zein R, Bondy M (2008): Polymorphisms in the interleukin-4 receptor gene are associated with better survival in patients with glioblastoma. *Clin Cancer Res* 14, 6640–6646
- Schoof N, Bonin F, Zeynalova S, Ziepert M, Jung W, Loeffler M, Pfreundschuh M, Trümper L, Kube D (2009): Favorable impact of the interleukin-4 receptor allelic variant I75 on the survival of diffuse large B-cell lymphoma patients demonstrated in a large prospective clinical trial. *Ann Oncol* 20, 1548–1554
- Schultz C, Izuhara K, Coffman R, Harada N (1995): The critical region in the cytoplasmic domain of human IL-4 receptor for induction of IgE synthesis. *Immunol Lett* 46, 215–219
- Schwartzbaum J, Ahlbom A, Malmer B, Lönn S, Brookes A, Doss H, Debinski W, Henriksson R, Feychting M (2005): Polymorphisms associated with asthma are inversely related to glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 65, 6459–6465
- Seidemann K, Zimmermann M, Book M, Meyer U, Burkhardt B, Welte K, Reiter A, Stanulla M (2005): Tumor necrosis factor and lymphotoxin alfa genetic polymorphisms and outcome in pediatric patients with non-Hodgkin's lymphoma: results from Berlin-Frankfurt-Münster Trial NHL-BFM 95. *J Clin Oncol* 23, 8414–8421
- Seitz C, Muller P, Krieg R, Mannel D, Hehlhans T (2001): A novel p75TNF receptor isoform mediating NFkappa B activation. *J Biol Chem* 276, 19390–19395
- Sherry S, Ward M, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski E, Sirotkin K (2001): dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 29, 308–311
- Shimada Y, Tai H, Endo M, Kobayashi T, Akazawa K, Yamazaki K (2004): Association of tumor necrosis factor receptor type 2 +587 gene polymorphism with severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 31, 463–469
- Stark G, Dickinson A, Jackson G, Taylor P, Proctor S, Middleton P (2003): Tumour necrosis factor receptor type II 196M/R genotype correlates with circulating soluble receptor levels in normal subjects and with graft-versus-host disease after sibling allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 76, 1742–1749
- Stephenson L, Johns M, Woodward E, Mora A, Boothby M (2004): An IL-4R alpha allelic variant, I50, acts as a gain-of-function variant relative to V50 for Stat6, but not Th2 differentiation. *J Immunol* 173, 4523–4528

- Sun X, Wang L, Zhang Y, Yenush L, Myers M, Glasheen E, Lane W, Pierce J, White M (1995): Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377, 173–177
- Tajima K, Kamura S, Ito S, Ito M, Nagatomo M, Kinoshita K, Ikeda S (1987): Epidemiological features of HTLV-I carriers and incidence of ATL in an ATL-endemic island: a report of the community-based co-operative study in Tsushima, Japan. *Int J Cancer* 40, 741–746
- Tancrède-Bohin E, Ionescu M, Salmonière P, Dupuy A, Rivet J, Rybojad M, Dubertret L, Bachelez H, Lebbé C, Morel P (2004): Prognostic value of blood eosinophilia in primary cutaneous T-cell lymphomas. *Arch Dermatol* 140, 1057–1061
- Till A, Rosenstiel P, Krippner-Heidenreich A, Mascheretti-Croucher S, Croucher P, Schäfer H, Scheurich P, Seegert D, Schreiber S (2005): The Met-196 -> Arg variation of human tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) affects TNF-alpha-induced apoptosis by impaired NF-kappaB signaling and target gene expression. *J Biol Chem* 280, 5994–6004
- Tolusso B, Sacco S, Gremese E, Torre G. L, Tomietto P, Ferraccioli G (2004): Relationship between the tumor necrosis factor receptor II (TNF-RII) gene polymorphism and sTNF-RII plasma levels in healthy controls and in rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 65, 1420–1426
- Tracey K, Wei H, Manogue K, Fong Y, Hesse D, Nguyen H, Kuo G, Beutler B, Cotran R, Cerami A (1988): Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J Exp Med* 167, 1211–1227
- Trümper L, Jung W, Dahl G, Diehl V, Gause A, Pfreundschuh M (1994): Interleukin-7, interleukin-8, soluble TNF receptor, and p53 protein levels are elevated in the serum of patients with Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 5 Suppl 1, 93–96
- Tsuchiya N, Komata T, Matsushita M, Ohashi J, Tokunaga K (2000): New single nucleotide polymorphisms in the coding region of human TNFR2: association with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 1, 501–503
- Tsuchiya N, Ohashi J, Tokunaga K (2002): Variations in immune response genes and their associations with multifactorial immune disorders. *Immunol Rev* 190, 169–181
- Tsukasaki K, Miller C, Kubota T, Takeuchi S, Fujimoto T, Ikeda S, Tomonaga M, Koeffler H (2001): Tumor necrosis factor alpha polymorphism associated with increased susceptibility to development of adult T-cell leukemia/lymphoma in human T-lymphotropic virus type 1 carriers. *Cancer Res* 61, 3770–3774
- Tweeddale M, Jamal N, Nguyen A, Wang X, Minden M, Messner H (1989): Production of growth factors by malignant lymphoma cell lines. *Blood* 74, 572–578

- Uyttenhove C, Druetz C, Renauld J, Hérin M, Noël H, Snick J (1991): Autonomous growth and tumorigenicity induced by P40/interleukin 9 cDNA transfection of a mouse P40-dependent T cell line. *J Exp Med* 173, 519–522
- Vogelstein B, Gillespie D (1979): Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 615–619
- Vowels B, Cassin M, Vonderheid E, Rook A (1992): Aberrant cytokine production by Sezary syndrome patients: cytokine secretion pattern resembles murine Th2 cells. *J Invest Dermatol* 99, 90–94
- Vowels B, Lessin S, Cassin M, Jaworsky C, Benoit B, Wolfe J, Rook A (1994): Th2 cytokine mRNA expression in skin in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 103, 669–673
- Wajant H, Scheurich P (2001): Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 19–32
- Wang H, Paul W, Keegan A (1996): IL-4 function can be transferred to the IL-2 receptor by tyrosine containing sequences found in the IL-4 receptor alpha chain. *Immunity* 4, 113–121
- Wang S, Cerhan J, Hartge P, Davis S, Cozen W, Severson R, Chatterjee N, Yeager M, Chanock S, Rothman N (2006): Common genetic variants in proinflammatory and other immunoregulatory genes and risk for non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Res* 66, 9771–9780
- Warzocha K, Salles G, Bienvenu J, Barbier Y, Bastion Y, Doche C, Rieux C, Coiffier B (1997a): Prognostic significance of TNF alpha and its p55 soluble receptor in malignant lymphomas. *Leukemia* 11 Suppl 3, 441–443
- Warzocha K, Salles G, Bienvenu J, Bastion Y, Dumontet C, Renard N, Neidhardt-Berard E, Coiffier B (1997b): Tumor necrosis factor ligand-receptor system can predict treatment outcome in lymphoma patients. *J Clin Oncol* 15, 499–508
- Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J, Roy P, Charlot C, Rigal D, Coiffier B, Salles G (1998): Genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome. *Blood* 91, 3574–3581
- Waschke K, Villani A, Vermeire S, Dufresne L, Chen T, Bitton A, Cohen A, Thomson A, Wild G (2005): Tumor necrosis factor receptor gene polymorphisms in Crohn's disease: association with clinical phenotypes. *Am J Gastroenterol* 100, 1126–1133
- Weinshenker B, Hebrink D, Wingerchuk D, Klein C, Atkinson E, O'Brien P, McMurray C (1999): Genetic variants in the tumor necrosis factor receptor 1 gene in patients with MS. *Neurology* 52, 1500–1503
- Whicher J, Evans S (1990): Cytokines in disease. *Clin Chem* 36, 1269–1281

- Wu X, Rienzo A, Ober C (2001): A population genetics study of single nucleotide polymorphisms in the interleukin 4 receptor alpha (IL4RA) gene. *Genes Immun* 2, 128–134
- Wysocka M, Zaki M, French L, Chehimi J, Shapiro M, Everetts S, McGinnis K, Montaner L, Rook A (2002): Sézary syndrome patients demonstrate a defect in dendritic cell populations: effects of CD40 ligand and treatment with GM-CSF on dendritic cell numbers and the production of cytokines. *Blood* 100, 3287–3294
- Youn J, Hwang S, Cho C, Min J, Kim W, Park S, Kim H (2000): Association of the interleukin-4 receptor alpha variant Q576R with Th1/Th2 imbalance in connective tissue disease. *Immunogenetics* 51, 743–746
- Zamorano J, Wang H, Wang L, Pierce J, Keegan A (1996): IL-4 protects cells from apoptosis via the insulin receptor substrate pathway and a second independent signaling pathway. *J Immunol* 157, 4926–4934
- Zhang Q, Nowak I, Vonderheid E, Rook A, Kadin M, Nowell P, Shaw L, Wasik M (1996): Activation of Jak/STAT proteins involved in signal transduction pathway mediated by receptor for interleukin 2 in malignant T lymphocytes derived from cutaneous anaplastic large T-cell lymphoma and Sezary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9148–9153

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Trümper dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Abteilung Hämatologie und Onkologie an der Universitätsklinik Göttingen zu promovieren und durch diese Arbeit einen Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten und Denken in der medizinischen Forschung zu gewinnen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dieter Kube für die Überlassung des interessanten Themas und die Betreuung dieser Arbeit. Für seine Geduld, Zeit und Mühe möchte ich ihm besonders danken. Weiterhin danke ich Herrn Dr. med. Wolfram Jung für seine Hilfsbereitschaft und freundliche Beratung.

Ganz herzlich danken möchte ich auch den Mitarbeitern meines Labors, insbesondere Frau Frederike von Bonin, die mich mit kompetentem fachlichen Rat in die Laborarbeit eingeführt hat.

Für die Unterstützung bei statistischen Fragestellungen danke ich Herrn Markus Kreuz aus dem IMISE-Institut Leipzig, und Herrn Rosenberger aus der Abteilung für Genetische Epidemiologie am Universitätsklinikum Göttingen.

Lebenslauf

Ich wurde am 26.08.1982 in Stepnogorsk, Kasachstan als Kind von Dipl.-Chem. Viktor Stoller und Frau Irene Stoller geboren. Nach der Grundschulzeit in Kasachstan besuchte ich das WERNER-VON-SIEMENS-GYMNASIUM in Bad Harzburg, Niedersachsen, an dem ich 2002 mit dem Abitur abschloss.

Anschließend studierte ich von 2002 bis 2009 Humanmedizin an der GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT Göttingen. Das praktische Jahr verbrachte ich in der Chirurgie am REGIONALSPITAL THUN, Schweiz, in der Inneren Medizin am SPITAL INTERLAKEN, Schweiz, und am Institut für Humangenetik der GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT Göttingen. Derzeit arbeite ich als Assistenzärztin in der Inneren Medizin am SPITAL ZOFINGEN, Schweiz.