

Aus dem  
CharitéCentrum für diagnostische und präventive Labormedizin  
Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Rudolf Tauber

## **Habilitationsschrift**

### **Risikofaktoren und Verlaufsmodulatoren komplexer Erkrankungen. Untersuchungen zur venösen Thromboembolie und zur rheumatoiden Arthritis.**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Experimentelle Laboratoriumsmedizin  
vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Dr. med. Berthold Hoppe  
aus Berlin

Eingereicht: Oktober 2008  
Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich  
1. Gutachter: Prof. Dr. K. Brand, Hannover  
2. Gutachter: Prof. Dr. H.-P. Brezinschek, Graz

| Inhaltsverzeichnis   | Seite |
|--|-------|
| <b>1. Stand der Forschung</b> .....  | 3     |
| 1.1. Einleitung.....   | 3     |
| 1.2. Heterogenität komplexer Erkrankungen.....   | 4     |
| 1.2.1. Heterogenität der venösen Thromboembolie.....   | 4     |
| 1.2.2. Heterogenität der rheumatoiden Arthritis.....   | 5     |
| 1.3. Venöse Thromboembolien und Atherosklerose.....  | 8     |
| 1.4. Ziele.....  | 9     |
| <b>2. Eigene Arbeiten</b> .....  | 10    |
| 2.1. Hereditäre Thrombophilie.....   | 10    |
| Gene polymorphisms implicated in influencing susceptibility to venous and arterial thromboembolism: frequency distribution in a healthy German population.<br>Hoppe B, et al. Thromb Haemost 2006; 96: 465-70.....   | 13    |
| 2.2. Die <i>Marburg I</i> Variante der Faktor VII aktivierenden Protease und venöse Thromboembolien.....   | 19    |
| Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease is associated with idiopathic venous thromboembolism.<br>Hoppe B, et al. Blood 2005; 105: 1549-51.....  | 23    |
| 2.3. Genetische Variabilität der Peptidylarginindeiminase Typ 4 (PADI4).....   | 26    |
| High variability of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) in a healthy white population: characterization of six new variants of PADI4 exons 2-4 by a novel haplotype-specific sequencing-based approach.<br>Hoppe B, et al. J Mol Med 2004; 82: 762-7..... | 29    |
| 2.4. Genetische Variabilität von PADI4 und das Risiko für rheumatoide Arthritis.....   | 35    |
| Detailed analysis of the variability of peptidylarginine deiminase type 4 in German patients with rheumatoid arthritis: a case-control study.<br>Hoppe B, et al. Arthritis Res Ther 2006; 8: R34.....  | 38    |
| 2.5. PADI4 Genotyp und Heterogenität der rheumatoiden Arthritis.....   | 44    |
| Influence of peptidylarginine deiminase type 4 genotype and shared epitope on clinical characteristics and autoantibody profile of rheumatoid arthritis.<br>Hoppe B, et al. Ann Rheum Dis 2008; doi: 10.1136/ard.2008.091983.....                          | 51    |
| <b>3. Abschließende Betrachtungen</b> .....  | 70    |
| <b>4. Literaturverzeichnis</b> .....   | 72    |
| <b>5. Danksagung</b> .....   | 82    |

## 1. STAND DER FORSCHUNG

### 1.1. Einleitung

Während bei *monogenen Erkrankungen* durch den Nachweis entsprechender genetischer Veränderungen das Auftreten der Erkrankung häufig mit großer Wahrscheinlichkeit vorhergesagt werden kann, ist eine vergleichbare Aussage für *komplexe Erkrankungen* nicht möglich (1). Bei dieser Erkrankungsgruppe, die auch als *multifaktoriell* bezeichnet wird und zu der unter anderem die venöse Thromboembolie (VTE) sowie die rheumatoide Arthritis (RA) gehören, entscheidet das bislang nicht ausreichend charakterisierbare Zusammenspiel eines genetischen Hintergrundes mit Umweltfaktoren, d.h. die Wechselwirkung zwischen *Disposition* und *Exposition*, über die Ausbildung des krankhaften Phänotyps (2). Durch die Entwicklung von pathogenetischen Modellen, in denen die jeweils bekannten Risikofaktoren in Hinblick auf ihre Auswirkung auf das Erkrankungsrisiko als solches, auf das Risiko für möglicherweise existierende Erkrankungssubgruppen sowie auf den Erkrankungsverlauf dargestellt sind, wird versucht, die prädiktiven Möglichkeiten für komplexe Erkrankungen zu erweitern. Das übergeordnete Ziel dieses wissenschaftlichen Gebietes besteht darin, präventive und therapeutische Ansätze durch eine bessere Effektabschätzung und eine Individualisierung der Maßnahmen zu verbessern (2-4).

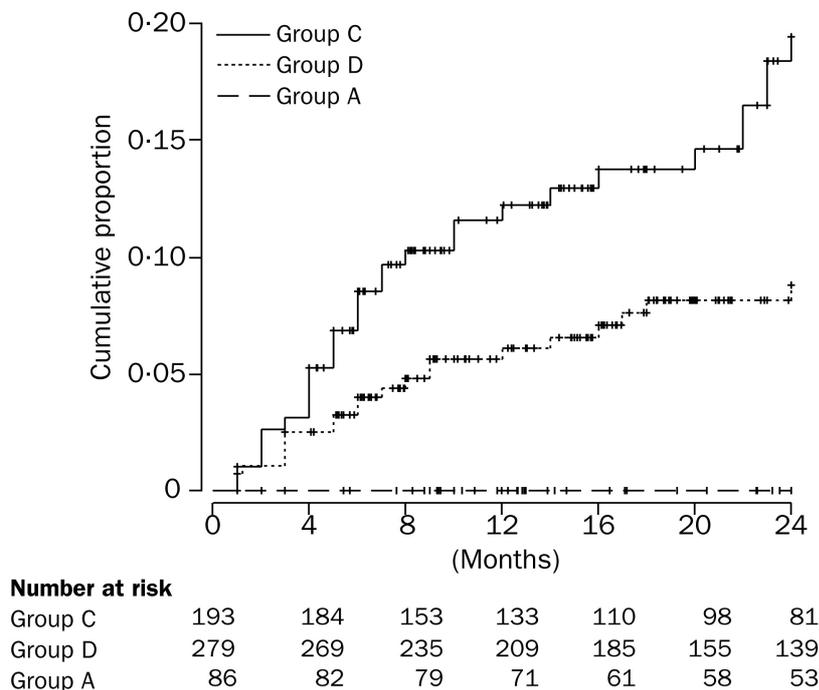
In den vergangenen Jahren konnte das Verständnis für die pathogenetischen Abläufe, welche die Entstehung und den Verlauf von VTE oder RA beeinflussen, wesentlich vertieft werden (5, 6). Dennoch ist man für diese wie auch für andere komplexe Erkrankungen von einem umfassenden pathogenetischen Konzept weit entfernt. In einer Vielzahl von Untersuchungen wurden Art und Bedeutung verschiedener genetischer und expositioneller Risikofaktoren von RA und VTE beschrieben (5-9). Wie und in welchem Umfang verschiedene dieser Faktoren mit einem relativen Risiko von häufig nur 1,5 bis 2 in die pathogenetischen Mechanismen eingebunden sind, kann zum jetzigen Zeitpunkt nur vermutet werden (2, 10, 11). Ein erweiterter Einblick in die verschiedenen Komponenten, welche das Risiko für und den Verlauf von komplexen Erkrankungen beeinflussen, wird von Genom-weiten Assoziationsstudien und deren systembiologischer Interpretation erwartet (4, 11, 12), in die neben den Indexerkrankungen auch verschiedene Erkrankungssubentitäten einbezogen werden (13).

## 1.2. Heterogenität komplexer Erkrankungen

Sowohl die VTE als auch die RA stellen keine homogenen Erkrankungen dar, sondern es lassen sich anhand klinisch oder labordiagnostisch fassbarer Parameter Subgruppen definieren, die sich beispielsweise ätiologisch oder prognostisch deutlich voneinander unterscheiden. Die Berücksichtigung derartiger Erkrankungssubgruppen in der wissenschaftlichen Betrachtung hat zu einer detaillierteren Einsicht in die Mechanismen der jeweiligen Krankheitsentstehung geführt. Ein dominierendes klinisches Ziel der Untersuchung der Heterogenität komplexer Erkrankungen besteht darin, charakteristische Signaturen einzelner Subgruppen zu identifizieren, die eine spezifischere Verlaufsprognose und Therapie ermöglichen (14-16).

### 1.2.1. Heterogenität der venösen Thromboembolie

Für die Erkrankungsgruppe der venösen Thromboembolien kann eine Form der phänotypischen Heterogenität am Beispiel des Rezidivrisikos unterschiedlicher, klinisch definierter VTE Subgruppen deutlich gemacht werden (**Abbildung 1**).



**Abbildung 1:** Kumulatives 2-Jahres-Rezidivrisiko für VTE nach dem Ende der Antikoagulation. **A:** Initial perioperative VTE, **C:** Initial idiopathische VTE, **D:** Initiale VTE mit nicht-chirurgischem Risikofaktor.

*Baglin T et al. Lancet 2003; 362, 523-6.*

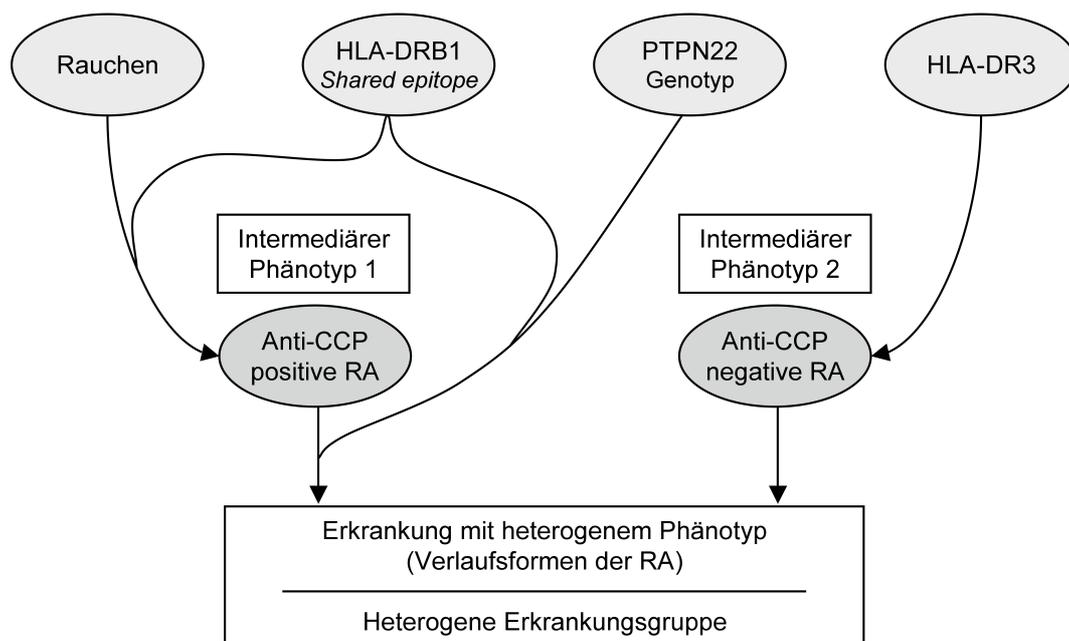
Copyright (2003), reprinted with permission from Elsevier.

Charakterisiert man, wie von Baglin und Mitarbeitern beschrieben, die kumulative Rezidivhäufigkeit bei Patienten mit VTE nach dem Ende der Antikoagulation unter Berücksichtigung klinisch definierter Subgruppen [u.a. (A) perioperative und (C) idiopathische Ereignisse], so werden zwischen diesen Subgruppen drastische Unterschiede im Rezidivrisiko deutlich (17). Während bei Patienten mit einem relevanten expositionellen Risikofaktor für das initiale Ereignis (Gruppe A) im Untersuchungszeitraum keine Rezidive beobachtet wurden, konnte der Gruppe der *idiopathischen* VTE (Gruppe C) – d.h. solchen Ereignissen, bei denen kein expositioneller Risikofaktor vorlag – eine kumulative 2-Jahres-Rezidivrate von 19,4% zugeordnet werden. Klinisch und wissenschaftlich ist wegen des hohen Rezidivrisikos die Gruppe der idiopathische VTE von besonderem Interesse. Dies umso mehr, da sie *per definitionem* keinem bekannten expositionellen Auslöser folgt und da sie bislang nicht ausreichend durch dispositionelle Faktoren charakterisiert werden kann. Von Tosetto und Mitarbeitern wurde jedoch als ein signifikanter Risikofaktor für idiopathische VTE eine positive Familienanamnese beschrieben (OR: 4,6; 95%CI: 2,2–9,6) – eine Assoziation, die für sekundäre Ereignisse nicht nachgewiesen werden konnte (18). Dieser Befund macht die Existenz einer relevanten hereditären Komponente für die Gruppe der idiopathischen VTE wahrscheinlich.

### **1.2.2. Heterogenität der rheumatoiden Arthritis**

Für das Krankheitsbild der RA ist die Existenz von zumindest zwei pathogenetisch distinkten Subgruppen, die durch unterschiedliche genetische und expositionelle Faktoren beeinflusst und durch laborchemische Parameter charakterisiert werden können, sehr gut belegt (9, 19). Das übergeordnete Charakteristikum der Subgruppenbildung ist die Präsenz von Antikörpern gegen citrullinierte Peptide (Anti-CCP), die sich als hochspezifisch für die RA erwiesen haben (20, 21). Der Nachweis von Anti-CCP ist ein gut charakterisiertes prognostisches Kriterium für einen schwereren Erkrankungsverlauf der RA (6). Während ursprünglich vermutet wurde, dass das sogenannte HLA-DRB1 *Shared Epitope* (SE) – der klassische genetische Risikofaktor für die RA, welcher durch ein bestimmtes HLA-DRB1 Sequenzmotiv gebildet wird, – primär mit der RA assoziiert sei (22, 23) und die zusätzliche Bildung von Anti-CCP begünstige (24, 25), geht man heute davon aus, dass umgekehrt das SE lediglich mit der Bildung von Anti-CCP Antikörpern gekoppelt ist, welche wiederum ihrerseits die Entwicklung der RA begünstigen und deren klinischen Verlauf

beeinflussen (9). Ein Effekt des SE bei der Anti-CCP negativen RA scheint weitestgehend zu fehlen (19, 26). Auch für einen zweiten, mittlerweile mehrfach bestätigten genetischen Risikofaktor der RA, die Protein Tyrosin Phosphatase N22 (PTPN22) Variante Arg620Trp (rs2476601), wurde eine hochsignifikante Heterogenität in der Assoziation mit RA zwischen der Anti-CCP positiven und negativen Subgruppe beschrieben. In Analogie zum SE beschränkt sich auch die Assoziation der PTPN22 Arg620Trp auf die Anti-CCP positive RA (27). Für die Anti-CCP negative RA wird das HLA Klasse II Merkmal HLA-DR3 als hereditärer Risikofaktor diskutiert (28). Diese Untersuchungsergebnisse können dahingehend interpretiert werden, dass sich die pathogenetischen Mechanismen der Anti-CCP positiven und negativen RA in wesentlichen Punkten voneinander unterscheiden. Ein auf Grundlage dieser Daten entwickeltes pathogenetisches Modell ist in **Abbildung 2** dargestellt (6, 9).

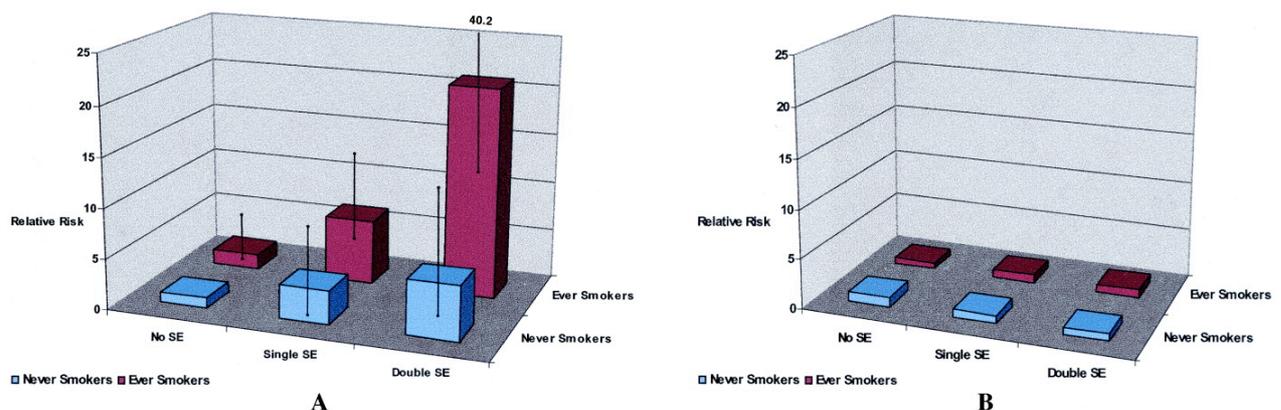


**Abbildung 2:** Modell zur Pathogenese der rheumatoiden Arthritis (RA). Der Einfluss verschiedener Risikofaktoren, welche das Risiko für die rheumatoide Arthritis bzw. deren Charakteristika beeinflussen, ist dargestellt.

Bei der Analyse der Risikobeeinflussung komplexer Erkrankungen sind *Interaktionen*, d.h. Wechselwirkungen verschiedener Risikofaktoren untereinander – beispielsweise in Form von Gen-Umwelt- oder Gen-Gen-Interaktionen –, zu berücksichtigen, da ansonsten die resultierenden Effekte deutlich unterschätzt werden können (29). Interaktive Effekte sind dadurch gekennzeichnet, dass das relative Risiko bei Vorliegen

einer Risikofaktor-Kombination signifikant von der Summe der relativen Risiken der isoliert betrachteten Faktoren abweicht (30).

Für die rheumatoide Arthritis existieren viele epidemiologische Studien, die unter anderem auch detailliert auf interaktive Effekte eingehen, wobei auch in diesen Arbeiten die Heterogenität der RA sehr deutlich wird. Besonderes Interesse fand in den vergangenen Jahren die Interaktion des Rauchens mit dem *Shared Epitope* (31-33). Wie bereits in der **Abbildung 2** angedeutet, unterscheiden sich auch in Hinblick auf diese Fragestellung die Anti-CCP positive und negative RA-Subgruppe deutlich voneinander. Der Raucher-Status beeinflusst das Risiko für die Anti-CCP negative RA nicht (**Abbildung 3B**). Im Gegensatz hierzu liegt in Hinblick auf das Risiko für die Anti-CCP positive RA eine hochsignifikante Interaktion zwischen Rauchen und der Präsenz des SE vor (**Abbildung 3A**). So besteht bei Trägern des SE zwischen *Rauchern* [**Abbildung 3A** (hintere rote Säulengruppe), 1 SE-Kopie: RR: 6,5; 95%CI: 3,8–11,4 — 2 SE-Kopien: RR: 21,0; 95%CI: 11,0–40,2] und *Nichtrauchern* [**Abbildung 3A** (vordere blaue Säulengruppe), 1 SE-Kopie: RR: 3,3; 95%CI: 1,8–5,9 — 2 SE-Kopien: RR: 5,4; 95%CI: 2,7–10,8] eine beträchtliche Differenz hinsichtlich des relativen Risikos für RA, wohingegen diese bei SE-negativen Individuen fehlt (32).



**Abbildung 3:** Interaktion von *Shared Epitope* (SE) und Rauchen in Hinblick auf das Risiko für rheumatoide Arthritis (RA). Dargestellt sind relatives Risiko und 95%CI für **(A)** die Anti-CCP positive und **(B)** die Anti-CCP negative RA in Abhängigkeit von SE und Raucher-Status.

*Klareskog L et al. Arthritis & Rheumatism 2006; 54, 38-46.*

Copyright © (2006, John Wiley & Sons, Inc.). Reprinted with permission of Wiley-Liss, Inc., a subsidiary of John Wiley & Sons, Inc.

Auch für die erwähnte Variante PTPN22 Arg620Trp wird eine Interaktion mit dem SE in Hinblick auf die Anti-CCP positive RA angenommen (31). Die Assoziation der Kombination von SE und PTPN22 Arg620Trp mit dem Risiko für Anti-CCP positive RA

(OR: 13,2; 95%CI: 10,2–17,2) ist signifikant stärker ausgeprägt als die Summe der Risikosteigerungen dieser beiden Risikofaktoren isoliert betrachtet (PTPN22 Arg620Trp: OR: 1,4; 95%CI: 1,0–2,1 — SE: OR: 6,1; 95%CI: 4,9–7,5) (31).

### **1.3. Venöse Thromboembolien und Atherosklerose**

Während für die RA – wie auch für andere chronisch entzündliche Erkrankungen – ein deutlich erhöhtes Risiko für atherosklerotische Veränderungen und Komplikationen lange bekannt ist (34), wurde erst vor wenigen Jahren eine Verbindung zwischen VTE und Atherosklerose beschrieben, die aktuell noch Gegenstand lebhafter Diskussionen ist (35). In dieser Arbeit von Prandoni und Mitarbeiter wiesen Patienten mit idiopathischer VTE verglichen mit Gesunden signifikant häufiger atherosklerotische Veränderungen auf (OR: 1,8; 95%CI: 1,1–2,9), wohingegen sich die Häufigkeit solcher Veränderungen bei Patienten mit *sekundären* – also durch einen expositionellen Risikofaktor bedingten – VTE nicht von der Gesunder unterschied (OR: 0,8; 95%CI: 0,5–1,3) (35). Ausgehend von diesen Befunden wurde die Hypothese aufgestellt, dass für beide Erkrankungsgruppen, für VTE und Atherosklerose, Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Risikofaktorprofile bestehen könnten. Unterstützt wurde diese Annahme durch zwei kürzlich erschienene Metaanalysen, welche einerseits den gut etablierten genetischen Risikofaktoren für VTE – dem Faktor *V Leiden* und der Prothrombin Variante 20210G>A – schwache aber hochsignifikante Assoziationen mit dem Risiko für koronare Herzerkrankung und akuten Myokardinfarkt zuschrieben (36). In einer zweiten Arbeit konnten signifikante Risikosteigerungen für VTE durch einige traditionelle Atherosklerose-Risikofaktoren, beispielsweise Hypertonus, Diabetes mellitus oder Hypertriglyzeridämie, nachgewiesen werden (37). Auch wenn in zumindest zwei anderen Arbeiten eine Beziehung von VTE und Atherosklerose nicht nachgewiesen werden konnte (38, 39), scheint zum jetzigen Zeitpunkt eine gewisse ätiologische Verwandtschaft von VTE und Atherosklerose recht wahrscheinlich zu sein (40).

#### 1.4. Ziele

Die in der vorliegenden Schrift zusammengefassten Arbeiten hatten zum Ziel, das Verständnis der Pathogenese zweier komplexer Erkrankungen – der venösen Thromboembolie und der rheumatoiden Arthritis – zu vertiefen. Die dargestellten Analysen berücksichtigten insbesondere die Heterogenität dieser beiden Erkrankungsgruppen. Besondere Beachtung fand in Hinblick auf die venöse Thromboembolie die *Marburg I* Variante der Faktor VII aktivierenden Protease (FSAP), für die rheumatoide Arthritis wurde der Schwerpunkt auf die genetische Variabilität der Peptidylarginindeiminase Typ 4 (PADI4) gelegt.

In initialen Arbeiten (**Abschnitte 2.1.** und **2.3.**) wurden zum einen gesunde Referenzkollektive molekulargenetisch charakterisiert und die so erhaltenen Daten in Beziehung zu denen anderer geographischer Regionen gesetzt. Außerdem wurden die diagnostischen Voraussetzungen für eine Haplotypen-getrennte Sequenzanalyse von PADI4 geschaffen.

Ziel der in **Abschnitt 2.2.** dargestellten Arbeit war die Identifizierung einer möglichen Verbindung hereditärer Atherosklerose-Risikofaktoren mit venösen Thromboembolien. Die Darstellung konzentriert sich auf die Variante FSAP *Marburg I* und deren Einfluss auf das Risiko für verschiedene Subgruppen der venösen Thromboembolie.

In den **Abschnitten 2.4.** und **2.5.** sind die Ergebnisse zweier Arbeiten wiedergegeben, die sich mit der Verbindung des PADI4 Genotyps mit dem Risiko für die rheumatoide Arthritis befassen. Während sich die Untersuchung aus **Abschnitt 2.4.** auf eine reine Assoziationsbetrachtung des PADI4 Genotyps mit dem RA-Risiko beschränkte, wobei eine Sequenzanalyse von PADI4 in die Analysen mit einging, umfasste die Arbeit aus **Abschnitt 2.5.** eine detaillierte serologische Charakterisierung. Außerdem konnte in letzterer Arbeit wegen der Größe der Studienpopulation der RA-Heterogenität sowie der Interaktion von PADI4 Genotyp und *Shared Epitope* Rechnung getragen werden.

## 2. EIGENE ARBEITEN

### 2.1. Hereditäre Thrombophilie

Gene polymorphisms implicated in influencing susceptibility to venous and arterial thromboembolism: frequency distribution in a healthy German population (41).

*Hoppe B, Tolou F, Dörner T, Kieseewetter H, Salama A*

*Thromb Haemost 2006; 96: 465-70*

Wie bei jeder Form der genetischen Variabilität existieren für die Faktoren der hereditären Thrombophilie, d.h. für *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) bzw. Insertions-/Deletionsvarianten, welche das Risiko für venöse und arterielle Thromboembolien beeinflussen, erhebliche ethnische und auch regionale Unterschiede hinsichtlich ihrer Häufigkeitsverteilungen (42). Die Ursachen dieser Frequenzunterschiede liegen primär in den geographischen Lokalisationen der sogenannten *Gründerpopulationen*, aus denen heraus die entsprechenden Varianten jeweils ihren Ursprung nahmen. Abhängig von ihren selektiven Vor- und Nachteilen sowie der Migration der entsprechenden Populationen ergeben sich die teilweise deutlichen Differenzen in den Genotyp-Häufigkeiten (42).

Für die Durchführung einer Assoziationsstudie für venöse Thromboembolien wurde von uns eine gesunde Referenzpopulation bestehend aus 282 Blutspendern molekulargenetisch charakterisiert. Diese Charakterisierung mit Hilfe eines zuvor entwickelten Panels Allel-spezifischer Primerpaare (43) umfasste unter anderem die folgenden (potentiellen) thrombophilen Risikofaktoren: Faktor V (FV) *Leiden* (1691G>A, rs6025), Prothrombin (PT) 20210G>A (rs1799963), FV 4070A>G (als Kennzeichen des Faktor V HR2 Haplotyps), Faktor VII (FVII) Arg353Gln (rs6046), Faktor XIII (FXIII) Val34Leu (rs5985), Faktor VII aktivierende Protease (FSAP) 1601G>A (rs7080536, *Marburg I*),  $\beta$ -Fibrinogen (FGB) -455G>A (rs1800790), *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) Intron 16 Insertion/Deletion, *Plasminogen Activator Inhibitor 1* (PAI-1) -675 Insertion/Deletion 5G/4G, *Tissue Plasminogen Activator* (tPA) Intron h Deletion/Insertion, Apolipoprotein  $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$  (rs7412 und rs429358), Glykoprotein Ia 807C>T, Methylentetrahydrofolat Reduktase (MTHFR) 677C>T (rs1801133).

Die in diesem Kollektiv ermittelten Allelfrequenzen, die tabellarisch im beigefügten Manuskript (**Seiten 13 bis 18**) aufgeführt sind, wiesen teilweise erhebliche Unterschiede

zu den korrespondierenden Daten auch geographisch nahe benachbarter Länder auf. Einige in diesem Zusammenhang auffällige Differenzen sind in **Tabelle 1** dargestellt.

**Tabelle 1:** Regionale Frequenzunterschiede thrombophiler Risikofaktoren

|   | Allelfrequenz (95%CI) | P ( $\chi^2$ ) |
|---|-----------------------|----------------|
| <b>FV 1691G&gt;A (<i>Leiden</i>)</b>      |                       |                |
| Referenz                                  | 3,9% (2,6–5,7)        |                |
| Niederlande (44)                          | 1,5% (0,71–2,2)       | 0,003          |
| Italien (45)                              | 1,8% (1,2–2,4)        | 0,003          |
| <b>FV 4070A&gt;G</b>                      |                       |                |
| Referenz                                  | 9,6% (7,4–12,3)       |                |
| Niederlande (46)                          | 4,1% (2,9–5,4)        | 0,001          |
| Italien (47)                              | 4,2% (2,4–6,0)        | 0,008          |
| <b>FXIII Val34Leu</b>                     |                       |                |
| Referenz                                  | 27,1% (23,6–31,0)     |                |
| Großbritannien (48)                       | 30,0% (26,0–34,0)     | NS             |
| Frankreich (49)                           | 28,8% (25,9–31,8)     | NS             |
| Italien (45)                              | 19,8% (18,2–21,4)     | 0,0001         |
| <b>FSAP 1601G&gt;A (<i>Marburg I</i>)</b> |                       |                |
| Referenz                                  | 1,6% (0,8–3,1)        |                |
| Niederlande (50)                          | 3,4% (2,2–4,6)        | 0,04           |
| Italien (51)                              | 2,5% (1,4–3,5)        | NS             |
| Italien (52)                              | 2,3% (1,6–3,1)        | NS             |
| Großbritannien (53)                       | 4,3% (3,6–4,9)        | 0,002          |

95%CI: 95% Konfidenzintervall; Referenz: Eigene Referenzpopulation (41); NS: nicht signifikant; P ( $\chi^2$ ): P-Wert des  $\chi^2$  Tests in Bezug auf die Referenzpopulation.

Die dargestellte Auswahl verdeutlicht, in welchem hochsignifikantem Umfang die Frequenzen thrombophiler Risikofaktoren – u.a. auch des klinisch relevanten Faktor V *Leiden* – zwischen eng benachbarten Regionen differieren können. Auch die

Untersuchungen des *Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC)*, in denen die regional gegliederten Ergebnisse von 500 K Mikroarray Analysen einer britischen Geburtskohorte dargestellt sind, belegen eine teilweise deutliche Heterogenität verschiedener Genotypverteilungen zwischen eng benachbarten Regionen innerhalb Großbritanniens (54).

Im Bezug auf die Auswahl von Referenzstudienpopulationen wird die Eignung von Blutspendekollektiven kritisch diskutiert, da für sie teilweise ein Selektionsbias und dementsprechend eine in Hinblick auf die allgemeine Bevölkerung unrepräsentative Genotypverteilung angenommen werden könnte. Diese Problematik ist auch im Falle der in **Tabelle 1** und im beigefügten Manuskript dargestellten Daten zu diskutieren, da es sich hierbei um auf unterschiedliche Weise ausgewählte Normalkollektive handelt. Interessanterweise bieten auch hierfür die Daten des *WTCCC* wichtige Informationen. Wegen des Fehlens signifikanter Unterschiede hinsichtlich der Verteilungen der ca. 500.000 SNPs umfassenden Mikroarray Analysen von zwei jeweils ungefähr 1.500 Individuen starken Kontrollpopulationen – im einen Fall einer 1958er Geburtskohorte, im anderen eines Blutspendekollektivs – gehen die Autoren dieser Arbeit davon aus, dass die Problematik der vermeintlichen „Übergesundheit“ von Blutspendekollektiven überbewertet sei und dass derartige Kollektive durchaus als Bezugsgröße für molekular-epidemiologische Untersuchungen verwendet werden können (54).

**Siehe:**

Gene polymorphisms implicated in influencing susceptibility to venous and arterial thromboembolism: frequency distribution in a healthy German population.

Hoppe B, Tolou F, Dörner T, Kiesewetter H, Salama A

Thromb Haemost 2006; 96: 465-70

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17003923](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17003923)











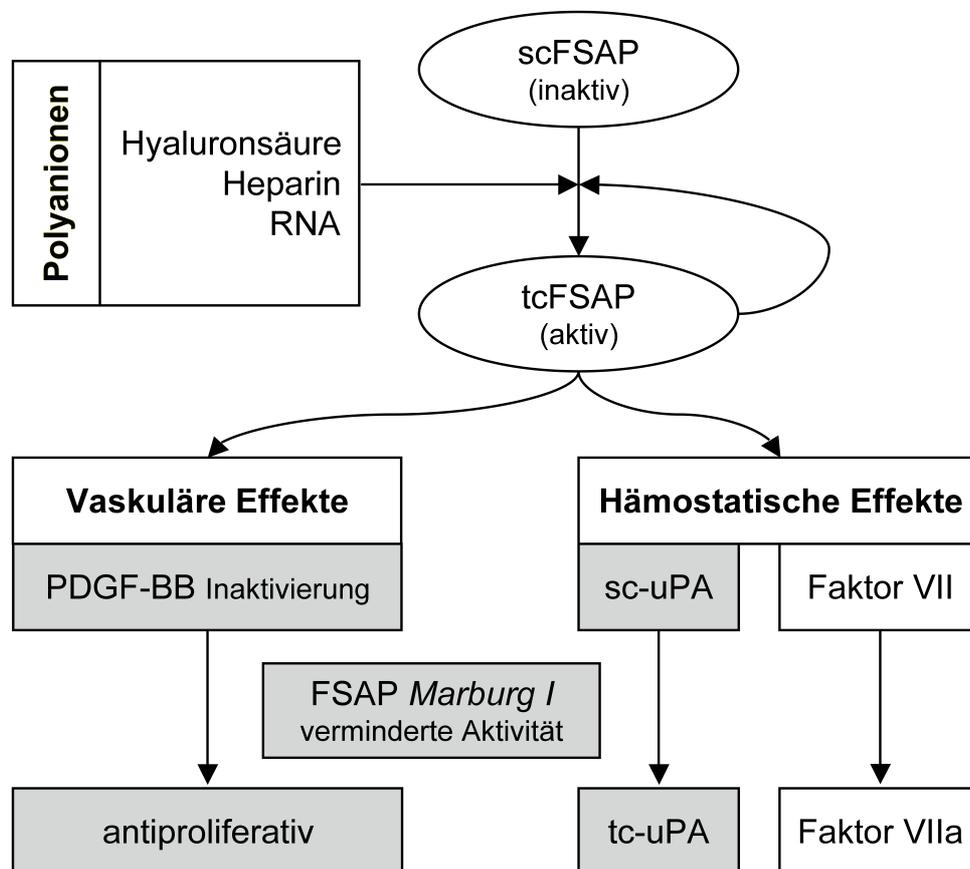
## 2.2. Die *Marburg I* Variante der Faktor VII aktivierenden Protease und venöse Thromboembolien

Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease is associated with idiopathic venous thromboembolism (55).

*Hoppe B, Tolou F, Radtke H, Kiesewetter H, Dörner T, Salama A  
Blood 2005; 105: 1549-51*

Im **Abschnitt 1.3.** sind die Arbeiten von Prandoni und Mitarbeitern dargestellt, die erstmals eine Assoziation von subklinischer Atherosklerose mit *idiopathischen* VTE beschrieben (35). Ausgehend von diesem Befund wurde von uns eine Untersuchung vorgenommen, um eine mögliche Beeinflussung des Risikos für VTE durch genetische Varianten, denen eine Bedeutung für Atherosklerose bzw. Atherothrombosen zugeordnet wird, zu identifizieren. Hierfür wurde ein zwischen Mai 2003 und Mai 2004 über die hämostaseologische Ambulanz des Instituts für Transfusionsmedizin (Charité – Universitätsmedizin Berlin) rekrutiertes Patientenkollektiv (n = 239) mit venösen thromboembolischen Ereignissen im Vergleich zu dem im **Abschnitt 2.1.** beschriebenen Kontrollkollektiv (n = 282) untersucht. Bei dem Patientenkollektiv handelte es sich um prävalente Fälle von VTE, wobei sowohl Erstereignisse als auch Rezidive in die Studie mit einbezogen wurden. Die VTE wurden als idiopathisch oder sekundär klassifiziert. Für sekundäre Ereignisse wurden als expositionelle bzw. erworbene Risikofaktoren Immobilität, Operationen, Verletzungen, Schwangerschaft sowie Malignome in einem Intervall von weniger als 3 Monaten vor dem Ereignis angenommen. Die Charakterisierung des Patientenkollektivs umfasste den FV Leiden, die PT Variante 20210G>A, die *Marburg I* Variante (rs7080536) der Faktor VII aktivierenden Protease (FSAP, MIM: 603924), die Aktivitäten bzw. Konzentrationen von Antithrombin, Protein S, Protein C und Anti-Cardiolipin Antikörpern sowie das Lupus Antikoagulanzen. Das Kontrollkollektiv wurde lediglich hinsichtlich der molekulargenetisch bestimmten Risikofaktoren charakterisiert. Die FSAP *Marburg I* betrifft eine plasmatische Serinprotease, die im hämostatischen System eine doppelte Funktion besitzt. Zum einen aktiviert FSAP unabhängig vom *Tissue Factor* den Faktor VII (56), zum anderen wirkt sie durch Überführung der Urokinase von der inaktiven (sc-uPA) in die aktive Form (tc-uPA) profibrinolytisch (57). Durch die Variante *Marburg I* wird die enzymatische Aktivität der FSAP in Bezug auf Urokinase deutlich vermindert, wohingegen der prokoagulatorische Effekt erhalten bleibt (58). Die FSAP *Marburg I*

wurde durch mittlerweile mehrere unabhängige Arbeiten mit dem Progress atherosklerotischer Veränderungen in Beziehung gebracht (52, 53, 59). Dieser Befund scheint aber weniger durch die hämostatische Funktion der FSAP erklärt werden zu können als durch deren Effekt auf vaskuläre Prozesse (59). So scheint von wesentlicher Bedeutung zu sein, dass FSAP die zum Teil durch den *Platelet derived growth factor-BB* (PDGF-BB) vermittelte Proliferation von vaskulären Muskelzellen als Schritt im Rahmen der Neointima-Bildung und Atherogenese hemmt und dass dieser protektive Mechanismus bei FSAP *Marburg I* vermindert ist (59). Diese funktionellen Aspekte sind neben dem durch Polyanyonien beschleunigten autokatalytischen Prozess der FSAP-Aktivierung in **Abbildung 4** dargestellt.



**Abbildung 4:** Darstellung der Aktivierung der Faktor VII aktivierenden Protease (FSAP) sowie der hämostatischen und vaskulären Effekte. Die bei Vorliegen der Variante FSAP *Marburg I* verminderten Aktivitäten sind grau schattiert. sc: single-chain, tc: two-chain.

In unserer Untersuchung erwies sich nun die FSAP *Marburg I* als signifikanter, von den anderen untersuchten Faktoren unabhängiger Risikofaktor für VTE (OR: 3,5; 95%CI:

1,2–10,0). In Analogie zu der Beschränkung der Beziehung von Atherosklerose und VTE auf idiopathische Ereignisse (35) war auch die Assoziation von FSAP *Marburg I* nur in Hinblick auf VTE *ohne* expositionellen Risikofaktor nachweisbar (OR: 6,2; 95%CI: 2,0–18,9). Eine Assoziation mit *sekundären* VTE konnte in unserem Kollektiv nicht nachgewiesen werden (OR: 1,8; 95%CI: 0,49–7,0), wobei eine Analyse hinsichtlich der FSAP *Marburg I* Frequenzunterschiede zwischen idiopathischen und sekundären VTE das Signifikanzniveau von  $P \leq 0,05$  knapp verfehlte ( $P = 0,06$ ) (55).

Ähnlich wie die erwähnte Assoziation von Atherosklerose und VTE (40) ist die Beziehung von FSAP *Marburg I* und VTE weiterhin Gegenstand der Diskussion. Arbeitsgruppen aus den Niederlanden bzw. aus Dänemark konnten eine Beziehung von FSAP *Marburg I* und tiefen Beinvenenthrombosen (TVT) nicht nachweisen, wobei die Heterogenität dieser Erkrankungsgruppe, d.h. die für die Interpretation unserer Arbeit essentielle Unterscheidung zwischen *idiopathischen* und *sekundären* Ereignissen, in diesen Untersuchungen nicht berücksichtigt wurde (50, 60). Eine von uns vorgenommene zweite Analyse mit einer alternativen Kontrollgruppe bestehend aus nicht-VTE Patienten konnte den ursprünglichen Befund – eine Assoziation von FSAP *Marburg I* mit VTE mit Beschränkung auf idiopathische Ereignisse – bestätigen (61). Zwei weitere Arbeitsgruppen analysierten die Beziehung von FSAP *Marburg I* und idiopathischen VTE. Während in der Untersuchung von Franchi und Mitarbeitern keine derartige Beziehung nachweisbar war (51), war in der Untersuchung von Weisbach und Mitarbeitern die Frequenz von FSAP *Marburg I* in der kleinen Gruppe der idiopathischen VTE ( $n = 58$ ) mit 10,3% deutlich aber nicht signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $n = 241$ ; 6,2%). Die statistische Power für die in dieser Untersuchung beschriebene OR von 1,7 lag bei weniger als 16% (62). Eine letzte Arbeit die in diesem Zusammenhang Erwähnung finden soll, ist die Untersuchung von Gulesserian und Mitarbeitern, die nicht die Assoziation von FSAP *Marburg I* mit VTE sondern den Einfluss dieser Variante auf das Rezidivrisiko nach initial idiopathischem Ereignis zum Thema hatte (63). Auch wenn das 3-Jahres-Rezidivrisiko bei Trägern der Variante mit 20,0% (95%CI: 5,3–34,6) nicht unwesentlich höher war als bei Patienten mit dem FSAP-Wildtyp (12,2%; 95%CI: 9,6–14,8), war der Unterschied zwischen beiden Gruppen statistisch nicht signifikant (63). Auch zur Thematik dieser Untersuchung ist aufgrund der niedrigen statistischen Power von ~15% eine endgültige Aussage nicht möglich (64).

Auf Grundlage der verfügbaren Daten zur Beziehung von FSAP *Marburg I* und idiopathischen VTE kann bislang ebenso wie für die Assoziation von Atherosklerose mit

idiopathischen VTE keine eindeutige Beurteilung des Stellenwerts dieser Verbindung vorgenommen werden. Die Vielzahl an weiteren Einflussfaktoren sowie die Heterogenität komplexer Erkrankungen – beides Komponenten, welche in weitergehenden Untersuchungen stärkere Berücksichtigung finden sollten – erschweren auch in diesem Fall eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Studienergebnisse. So kann das von uns verwendete Patientenkollektiv, das sich aus prävalenten Fällen mit teilweise rekurrierenden Ereignissen zusammensetzt und welches wegen der Funktion der die Studienpopulationen einschließenden Ambulanz als hämostaseologische Spezialeinrichtung vermutlich einen überproportional hohen Anteil an multimorbiden Patienten aufweist, nicht ohne weiteres mit inzidentellen VTE-Kollektiven – bestehend aus Patienten mit einem frisch diagnostizierten Initialereignis – verglichen werden (30).

**Siehe:**

Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease is associated with idiopathic venous thromboembolism.

Hoppe B, Tolou F, Radtke H, Kieseewetter H, Dörner T, Salama A

Blood 2005; 105: 1549-51

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15486068](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15486068)



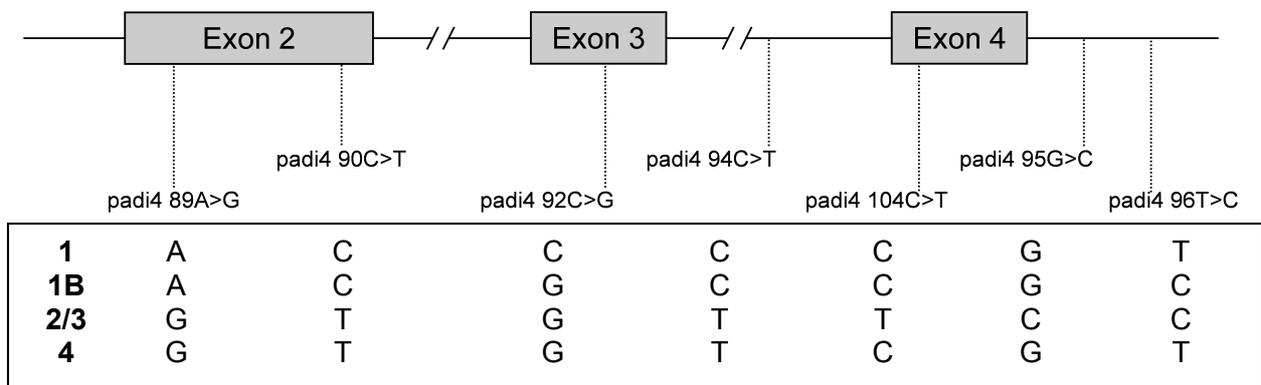


### 2.3. Genetische Variabilität der Peptidylarginindeiminase Typ 4 (PADI4)

High variability of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) in a healthy white population: characterization of six new variants of PADI4 exons 2-4 by a novel haplotype-specific sequencing-based approach (65).

*Hoppe B, Heymann GA, Tolou F, Kieseewetter H, Dörner T, Salama A  
J Mol Med 2004; 82: 762-7*

Die genetische Variabilität der Peptidylarginindeiminase Typ 4 (PADI4, MIM: 605847) wurde in einer Arbeit von Suzuki und Mitarbeitern erstmals in Zusammenhang mit dem Risiko für die rheumatoide Arthritis gebracht (66). Dieses Enzym, das überwiegend nukleär in Zellen der hämatopoetischen Linien lokalisiert ist, deiminiert proteingebundene Arginin-Reste und überführt sie damit in die nicht proteinogene Aminosäure Citrullin. Über die physiologische Bedeutung von PADI4 ist bislang wenig bekannt. Wegen der PADI4-abhängigen Deiminierung von Histonproteinen an bestimmten Arginin-Resten und dem funktionellen Antagonismus gegenüber der Arginin-Methylierung wird eine Bedeutung von PADI4 bei der Transkriptionskontrolle angenommen (67). PADI4 weist eine ausgesprochen starke genetische Variabilität auf. Für die Krankheitsassoziation relevant sind insbesondere die Varianten, die in den Exonen 2-4 und den angrenzenden nicht-codierenden Bereichen liegen (**Abbildung 5**). Durch sie werden verschiedene Haplotypen definiert, von denen die Haplotypen 2, 3 und 4 (nach der Bezeichnung von Suzuki et al.) mit dem Risiko für RA assoziiert zu sein scheinen (66).



**Abbildung 5:** Organisation des PADI4 Gens im Bereich von Exon 2 bis Exon 4. Benennung der PADI4-Haplotypen (**1**, **1B**, **2/3** und **4**) nach Suzuki et al. (66).

In allen zuvor erschienenen molekulargenetischen Arbeiten, die sich mit der Charakterisierung von PADI4 Genotypen befassten, wurden die analysierten SNPs mit Hilfe von *Expectation-Maximization*-Algorithmen den wahrscheinlichen Haplotypen zugeordnet. Eine sichere Zuordnung der cis-trans-Kopplung der untersuchten SNPs war hierdurch nicht möglich.

Ziel der hier aufgeführten Arbeit war es, eine Haplotyp-spezifische Sequenzieretechnik für den in Frage stehenden Abschnitt des PADI4 Gens zu entwickeln und diese Technik an einer Gruppe gesunder Individuen anzuwenden, um so einerseits die Anwendbarkeit überprüfen zu können und andererseits die genetische Variabilität des PADI4 Gens an eindeutig identifizierten Haplotypen zu charakterisieren. Als Bezugsgröße wurden die SNPs durch konventionelle Sequenzieretechniken ermittelt und durch anschließende Berechnung in den wahrscheinlichen haplotypischen Kontext gestellt.

Für die Haplotyp-spezifische Sequenzierung entwickelten wir zunächst ein Protokoll für die Haplotyp-spezifische Amplifikation eines 5,3 kb großen, den nach Suzuki et al. (66) relevanten Abschnitt des PADI4 Gens umfassenden Fragments. Für die diesen Abschnitt in 5' bzw. 3' Richtung flankierenden SNPs *padi4\_89A>G* und *padi4\_96T>C* (**Abbildung 5**) wurden Haplotyp-spezifische Primerpaare entwickelt, wobei sich – wie im beigefügten Manuskript beschrieben (**Seiten 29 bis 34**) – für die ausreichende Amplifikation dieses Fragments die Verwendung eines speziellen PCR-Ansatzes mit *Taq* DNA Polymerase und einem *Proofreading* Enzym, der *Pyrococcus species* GB-D Polymerase, als notwendig erwies (65). Die Anwesenheit eines *Proofreading* Enzyms mit 3'→5' Exonuklease-Aktivität ist in Hinblick auf Allel-spezifische Amplifikationen als kritisch zu betrachten, da das diskriminierende 3' Ende eines Allel-spezifischen Primers beim Fehlen des korrespondierenden Bindungspartners durch diese Aktivität gespalten werden und der derart verkürzte Primer eine *Allel-unspezifische* Amplifikationsreaktion unterstützen könnte. Dass dieses Hindernis bei der von uns etablierten Sequenzierstrategie ohne Bedeutung war, ist vermutlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass für diese Technik *beidseits* Allele-spezifische Primerpaare verwendet wurden, d.h. dass jeweils sowohl die vorwärts als auch die rückwärts orientierten Primer eine Allel-Spezifität aufwiesen. Die für die Spezifität der Amplifikationsreaktion kritische Konstellation, dass ein DNA-Strang durch die konzertierte Aktion eines verkürzten Vorwärts- und eines verkürzten Rückwärtsprimers synthetisiert würde, ist wegen des erheblichen Überschuss an ungekürztem Primer sehr unwahrscheinlich.

Durch elektrophoretische Separation der resultierenden Amplifikationsprodukte konnte die Spezifität der Amplifikationsreaktionen belegt werden – allein anhand dieses analytischen Schritts war die eindeutige Identifizierung der jeweils vorliegenden PADI4 Haplotypen möglich (**Figure 1, Seite 39**). Die Sequenzierung mit Hilfe innerhalb des Fragments bindender Sequenzierprimer ermöglichte es, alle detektierten SNPs – einschließlich neu identifizierter Varianten – hinsichtlich ihrer cis-trans-Kopplung aufzulösen (**Figure 2, Seite 33**). Durch diese Arbeit konnte eine deutliche zusätzliche genetische Variabilität des PADI4 Gens festgestellt werden, die insbesondere den risikoassoziierten Haplotypen 2 und 3 zuzuordnen war (65). Bei 11 von insgesamt 102 mit dieser Technik untersuchten gesunden Probanden konnten insgesamt 6 neue PADI4-Varianten nachgewiesen und in einen eindeutigen haplotypischen Kontext gestellt werden (65). Hierbei handelte es sich um 3 nicht-synonyme exonische Varianten sowie 3 intronische SNPs, die jeweils in der Nähe der Intron-Exon-Grenzen lokalisiert waren. Unter Verwendung der Sequenziererergebnisse der nicht Haplotyp-spezifischen Referenztechnik und der nachfolgenden Berechnung der wahrscheinlich vorliegenden PADI4 Haplotypen war eine eindeutige Charakterisierung für die neu identifizierten Varianten PADI4 R131T (acc#: AJ715939) und PADI4 390194C>T (acc#: AJ715938) nicht möglich (65).

**Siehe:**

High variability of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) in a healthy white population: characterization of six new variants of PADI4 exons 2-4 by a novel haplotype-specific sequencing-based approach.

Hoppe B, Heymann GA, Tolou F, Kiesewetter H, Dörner T, Salama A

J Mol Med 2004; 82: 762-7

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15338034](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15338034)









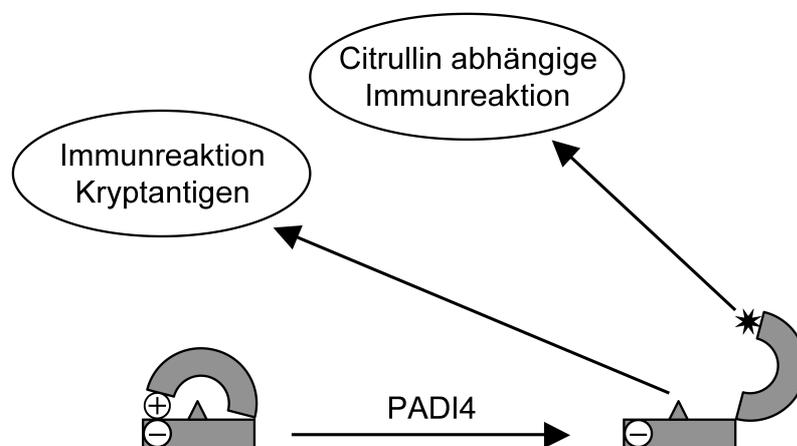


## 2.4. Genetische Variabilität von PADI4 und das Risiko für rheumatoide Arthritis

Detailed analysis of the variability of peptidylarginine deiminase type 4 in German patients with rheumatoid arthritis: a case-control study (68).

*Hoppe B, Häupl T, Gruber R, Kiesewetter H, Burmester GR, Salama A, Dörner T  
Arthritis Res Ther 2006; 8: R34*

Wie im **Abschnitt 2.3.** ausgeführt, wurden am PADI4 Gen Haplotypen beschrieben, die das Risiko für rheumatoide Arthritis steigern (66). Transkripte dieser sogenannten risikoassoziierten Haplotypen 2, 3 und 4 weisen eine größere Halbwertszeit auf als die des entsprechenden Wildtyps. Es wurde angenommen, dass durch die größere Transkript-Stabilität der Anteil citrullinierten Proteins erhöht wird (66). Da die zumindest für eine RA-Subentität pathognomonischen Anti-CCP Antikörper gegen citrullinierte Epitope gerichtet sind, war und ist der wahrscheinlichste Mechanismus, über den eine Assoziation des PADI4 Genotyps mit dem RA-Risiko erklärt werden kann, die Beeinflussung der Bildung von Anti-CCP Antikörpern bzw. von entsprechenden Antigen-Antikörper-Komplexen (69, 70). Durch die Deiminierung positiv geladener Arginin-Reste zu ungeladenem Citrullin werden die physikochemischen Eigenschaften an diesen Positionen wesentlich verändert (71). Hierdurch kann die Tertiärstruktur betroffener Proteine signifikant verändert werden, so dass als mögliche Mechanismen für Autoimmunreaktionen einerseits solche in Frage kommen, die direkt gegen citrullinierte Epitope gerichtet sind. Andererseits sind durch die Änderungen der Proteinfaltung Autoimmunreaktionen gegen neu exponierte, nicht citrullinierte Epitope des betreffenden Moleküls möglich (**Abbildung 6**) (71).



**Abbildung 6:** Die Peptidylarginindeiminase 4 (PADI4) abhängige Überführung von proteingebundenem Arginin (⊕) in Citrullin (\*), die resultierenden Konformationsänderungen sowie mögliche Immunreaktionen sind dargestellt.

Diese Hypothesen werden durch verschiedene Untersuchungen unterstützt. Durch die Applikation citrullinierten Albumins konnte im Tiermodell die immunologische Toleranz durchbrochen und die Bildung von Antikörpern gegen citrulliniertes aber auch gegen natives Albumin induziert werden. Bei Patienten mit RA war der intrazelluläre Nachweis citrullinierter Proteine in Synovia-Biopsaten positiv mit der Konzentration von Anti-CCP Antikörpern gekoppelt (72). Eine Beziehung der Menge intrazellulärer citrullinierter Proteine zum PADI4 Genotyp konnte allerdings bislang nicht nachgewiesen werden (73, 74). Ebenso ist die Zahl der Arbeiten, die einen allgemeinen (66) oder einen auf bestimmte RA-Subgruppen limitierten (75) Einfluss des PADI4 Genotyps auf die Präsenz bzw. die Konzentration von Anti-CCP Antikörpern beschreiben, sehr begrenzt. Dominierend für die Entwicklung von Anti-CCP Antikörpern ist mit Sicherheit der Effekt des *Shared Epitope* (**Abschnitt 1.2.2.**) (24, 25).

Nach der ersten Beschreibung einer Assoziation des PADI4 Genotyps mit dem Risiko für RA durch Suzuki und Mitarbeiter (66) beschäftigten sich verschiedene Arbeitsgruppen mit diesem Thema. Interessanterweise beschränkten sich die Studien, welche diese Assoziation bestätigen konnten, zunächst auf den asiatischen Raum (76-78). Demgegenüber konnte eine entsprechende Assoziation in europäischen Kollektiven durch Arbeitsgruppen aus Großbritannien (79), Frankreich (80), Spanien (81) und Schweden (27) nicht nachgewiesen werden.

Unter Verwendung des in **Abschnitt 2.3.** beschriebenen gesunden Kollektivs (n = 102) wurde von uns eine Assoziationsstudie zur Beziehung des PADI4 Genotyps mit RA durchgeführt. In diese Studie wurden 102 RA Patienten über die Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie (Charité – Universitätsmedizin Berlin) eingeschlossen. Der PADI4 Genotyp der gesamten Studienpopulation wurde durch die erwähnte Haplotyp-spezifische Sequenzierung charakterisiert. Außerdem erfolgte eine hoch auflösende Analyse des HLA-DRB1 Genorts, um das *Shared Epitope* nachweisen zu können. Der Status des *Shared Epitope* wurde anhand des folgenden HLA-DRB1 Motivs festgemacht: DRβ1 (67Leu – 69Glu – 71Lys oder Arg – 74Ala – 86Gly oder Val) (82). Weitere ermittelte Charakteristika der RA-Population umfassten die Konzentration der Anti-CCP Antikörper sowie einen Aktivitäts-Score für die RA (Disease Activity Score 28) (83). In die Analysen dieser Arbeit wurde neben den bereits beschriebenen PADI4 Haplotypen auch die zusätzliche genetische Variabilität dieses Genorts einschließlich ihrer haplotypischen Zuordnung einbezogen.

In dieser Studienpopulation differierten die PADI4 Genotypen zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv teilweise erheblich voneinander. Ein ausreichendes Signifikanz-Niveau im  $\chi^2$  Test erreichten die Unterschiede in der Frequenz (Kontrollen: 7,8%; Patienten: 14,7%;  $P = 0,04$ ) und im Träger-Status des PADI4 Haplotyp 4 (Kontrollen: 13,7%; Patienten: 27,5%;  $P = 0,02$ ). Bei einer Betrachtung der isolierten SNP-Frequenzen waren *padi4\_89A>G*, *padi4\_90C>T* und *padi4\_94C>T* mit einer Odds Ratio (OR) von jeweils 1,6 (95%CI: 1,1–2,3) bei RA Patienten im Vergleich zum Kontrollkollektiv signifikant überrepräsentiert. Eine Beziehung des PADI4 Genotyps zu Anti-CCP Antikörpern oder zum DAS28 lies sich in unseren Untersuchungen nicht nachweisen. Auch wenn in unserem RA-Kollektiv durch die detaillierte molekulargenetische Charakterisierung der Exone 2, 3 und 4 des PADI4 Gens fünf der in **Abschnitt 2.3.** (65) erwähnten bislang unbekanntes Varianten sowie eine weitere neue, nicht-synonyme Variante, PADI4 Thr79Arg (acc#: AJ966355), nachgewiesen werden konnte, zeigten sich im Vergleich zum Kontrollkollektiv keine signifikanten Unterschiede in der zusätzlichen genetischen Variabilität. Auch mögliche Abweichung hinsichtlich der haplotypischen Organisation der bekannten SNPs im PADI4 Gen zwischen RA Patienten und Kontrollen konnten ausgeschlossen werden.

Lediglich in einer weiteren kaukasischen Assoziationsstudie, die am Kollektiv des *North American Rheumatoid Arthritis Consortium (NARAC)* durchgeführt wurde, konnte eine signifikante Beziehung zwischen dem die risikoassoziierten PADI4-Haplotypen ausreichend charakterisierenden SNP *padi4\_94C>T* und RA festgestellt werden (27). Die Ergebnisse dieser Untersuchung waren mit denen der oben erwähnten eigenen Arbeit gut vergleichbar (NARAC: OR: 1,24; 95%CI: 1,08–1,42).

Drei bislang veröffentlichte Metaanalysen konnten unter Verwertung aller zu den entsprechenden Zeitpunkten verfügbaren Daten europäischer bzw. europäisch-stämmiger Kollektive eine signifikante Assoziation des risikoassoziierten PADI4 Genotyps mit RA nachweisen (27, 84, 85). Der Effekt der PADI4-Variabilität auf das Risiko für RA scheint daher in der Tat nicht nur auf den asiatischen Raum begrenzt zu sein, wenn auch ihre Bedeutung in asiatischen Populationen im Vergleich zu europäischen deutlich stärker ausgeprägt ist.

**Siehe:**

Detailed analysis of the variability of peptidylarginine deiminase type 4 in German patients with rheumatoid arthritis: a case-control study.

Hoppe B, Häupl T, Gruber R, Kiesewetter H, Burmester GR, Salama A, Dörner T  
Arthritis Res Ther 2006; 8: R34

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16469113](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16469113)











## 2.5. PADI4 Genotyp und Heterogenität der rheumatoiden Arthritis

Influence of peptidylarginine deiminase type 4 genotype and shared epitope on clinical characteristics and autoantibody profile of rheumatoid arthritis (86).

Hoppe B, Häupl T, Egerer K, Gruber R, Kiesewetter H, Salama A, Burmester GR, Dörner T

*Ann Rheum Dis* 2008; doi: 10.1136/ard.2008.091983

Die derzeitige Datenlage zur Verbindung des PADI4 Genotyps mit dem Risiko für RA ist heterogen (**Abschnitt 2.4.**). Während für diese Beziehung in asiatischen Populationen kein Zweifel besteht, und für Kaukasier bei allen verfügbaren metaanalytischen Betrachtungen eine schwächere aber signifikante Assoziation nachgewiesen werden konnte (27, 84, 85), gibt es für die zwischen verschiedenen kaukasischen Kollektiven differierenden Ergebnisse bislang keine explizite Erklärung. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den verschiedenen untersuchten kaukasischen RA-Kollektiven besteht in ihren klinischen Charakteristika. Aus grundsätzlichen Erwägungen werden zur Erfassung von Einflussfaktoren für das Risiko des *Auftretens* einer Erkrankung *inzidentelle Fälle* bevorzugt, da bei diesen ein Einfluss des Risikofaktors auf den Erkrankungsverlauf – insbesondere die Erkrankungsdauer – weniger stark zur Geltung kommt als bei *prävalenten Fällen*. Bei letzteren kann der Zeitpunkt der Diagnosestellung lange zurückliegen (30). Eine ausreichende Beschreibung dieser klinischen Charakteristika in den bisherigen Studien zur Beziehung des PADI4 Genotyps zur RA wird lediglich von Plenge et al. gegeben (**Tabelle 2**) (27).

**Tabelle 2:** Charakteristika des *Swedish Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis (EIRA)* und des *North American Rheumatoid Arthritis Consortium (NARAC)* Kollektivs (27).

|                             | EIRA            | NARAC                                  |
|-----------------------------|-----------------|--|
| <b>Selektion</b>            | Inzidentelle RA | Prävalente RA, $\geq 1$ RA Geschwister |
| <b>Erkrankungsdauer [a]</b> | < 3             | 16,2 $\pm$ 11,8                        |
| <b>Präsenz von</b>          |                 |  |
| Rheumafaktor                | 66,2%           | 78,2%                                  |
| Anti-CCP                    | 60,9%           | 77,8%                                  |
| <i>Shared Epitope</i>       | 49%             | 62%                                    |
| padi4_94T                   | 41%             | 46%                                    |
| Erosionen                   | nicht angegeben | 95,3%                                  |

Während im *EIRA* Kollektiv keine Assoziation zwischen dem Risiko für RA und dem PADI4 Genotyp nachgewiesen werden konnte (OR: 1,01; P = 0,47), war dieser Genotyp im *NARAC* Kollektiv hochsignifikant mit RA gekoppelt (OR: 1,24; P = 0,001) (27). Wie in der **Tabelle 2**, welche einige ausgewählte Details der von Plenge et al. untersuchten RA-Kollektive darstellt, beschrieben ist, existieren deutliche Unterschiede zwischen beiden RA-Kollektiven hinsichtlich ihrer klinischen Charakteristika. Im *EIRA* Kollektiv wurden ausschließlich inzidentelle Fälle mit einer mittleren Erkrankungsdauer von weniger als 3 Jahren eingeschlossen, wohingegen das *NARAC* Kollektiv durch prävalente Fälle von RA (mittlere Erkrankungsdauer: 16,2 Jahre) gebildet wurde, bei denen außerdem mindestens ein Geschwister ebenfalls an RA erkrankt sein musste. Zwischen beiden Kollektiven bestanden für die Präsenz des Rheumafaktors ( $P < 10^{-9}$ ), der Anti-CCP Antikörper ( $P < 10^{-16}$ ) und des *Shared Epitope* ( $P < 10^{-8}$ ) hochsignifikante Unterschiede. Diese Differenzen zwischen zwei RA-Kollektiven kaukasischen Ursprungs, von denen das eine keine, das andere eine hochsignifikante Assoziation des PADI4 Genotyps mit dem Risiko für RA zeigte, machen Unterschiede hinsichtlich der klinischen Charakteristika der jeweiligen Kollektive zu einer potentiellen Erklärung für die allgemeine Heterogenität der Ergebnisse der bislang vorliegenden Studien zu diesem Thema.

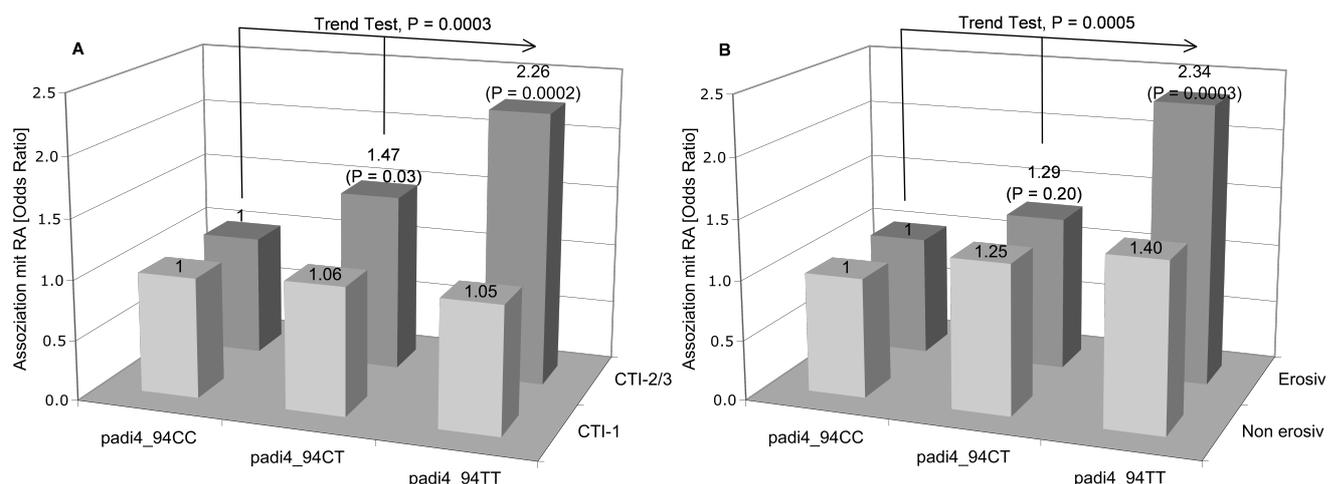
Um diese Hypothese überprüfen zu können, wurde das unter **Abschnitt 2.4.** beschriebene RA-Studienkollektiv (68) erheblich vergrößert (Patienten: n = 373, Kontrollen: n = 617) (86). Außerdem wurde eine detaillierte Charakterisierung vorgenommen, die verschiedene serologische Parameter – u.a. Anti-CCP Antikörper und antinukleäre Antikörper (ANA) – und klinische Aspekte umfasste. Neben dem üblicherweise zur Bemessung der RA Erkrankungsschwere genutzten und gut etablierten *Steinbrocker Score* (87), der eine ordinale Kategorisierung der Gelenkdestruktion erlaubt, wurde von uns zusätzlich ein vergleichsweise neuer klinischer Parameter zum RA-Verlauf, die sogenannte *kumulative Therapieintensität* (CTI), verwendet (88). Hierfür erfolgte eine ordinale Kategorisierung der im RA-Kollektiv verwendeten RA-spezifischen Medikamente, wobei diese *a priori* in eine niedrige (CTI-1), eine mittlere (CTI-2) bzw. eine hohe Therapieintensitätskategorie (CTI-3) eingestuft wurden (**Methods, Seite 55**). Die Zuordnung der Patienten zu einer dieser Kategorien erfolgte unter Berücksichtigung der gesamten verfügbaren Medikamentenanamnese nach demjenigen Wirkstoff, welcher der höchsten CTI-Kategorie entsprach. Da der Umfang der Gelenkdestruktion von vielen unterschiedlichen Variablen – unter anderem

der Erkrankungsdauer, dem Beginn der spezifischen RA-Therapie sowie der Therapiestrategie (89) – abhängig ist, stellt die kumulative Therapieintensität eine gute, wenn nicht essentielle Ergänzung dar, um den klinischen Verlauf der RA zu beschreiben.

Aus der beigefügten Arbeit sollen hier drei zentrale Befunde erwähnt werden.

*(i) Der PADI4 Genotyp ist mit dem Risiko für RA assoziiert*

Der PADI4 Genotyp – in diesem Fall der SNP padi4\_94C>T (rs2240340) – war auch in diesem deutlich vergrößerten prävalenten RA-Kollektiv (mittlere Erkrankungsdauer: 8,1 Jahre) signifikant mit RA assoziiert (OR: 1,38; P = 0,02), wobei der Effekt wegen der hochsignifikanten Abhängigkeit von der padi4\_94T Alleldosis [Trend Test, P = 0,005: padi4\_94CC: OR: 1 (Referenzgruppe) — 1 Kopie (CT): OR: 1,28; P = 0,09 — 2 Kopien (TT): OR: 1,70; P = 0,006] einem kodominanten Modell zuzuordnen war. Diese Assoziation zeigte darüber hinaus eine bemerkenswerte Beschränkung auf die Patientengruppe mit einem schwereren Erkrankungsverlauf – im einen Fall gemessen an der kumulativen Therapieintensität (CTI  $\geq 2$ ) (**Abbildung 7A**, hintere Säulengruppe), im anderen am Erosionsstatus (*Steinbrocker Score*  $\geq$  II) (**Abbildung 7B**, hintere Säulengruppe).



**Abbildung 7:** Assoziation von padi4\_94C>T mit dem Risiko für RA in Abhängigkeit vom Erkrankungsschweregrad. Für die aufgeführten Analysen diente der Wildtyp (padi4\_94CC) als Referenzgruppe. Die Assoziationsteste sind **(A)** nach der kumulativen Therapieintensität (CTI-1 v. CTI-2/3) bzw. **(B)** nach dem Erosionsstatus [Steinbrocker < II (non erosiv) v.  $\geq$  II (erosiv)] stratifiziert. Die signifikante Assoziation des PADI4 Genotyps mit RA beschränkte sich auf die Gruppe mit CTI-2/3 bzw. erosivem Gelenkstatus.

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass der PADI4 Genotyp nicht ausschließlich bzw. bei Kaukasiern nicht im Wesentlichen das RA-Erkrankungsrisiko beeinflusst, sondern dass durch ihn der klinische Verlauf der RA moduliert wird.

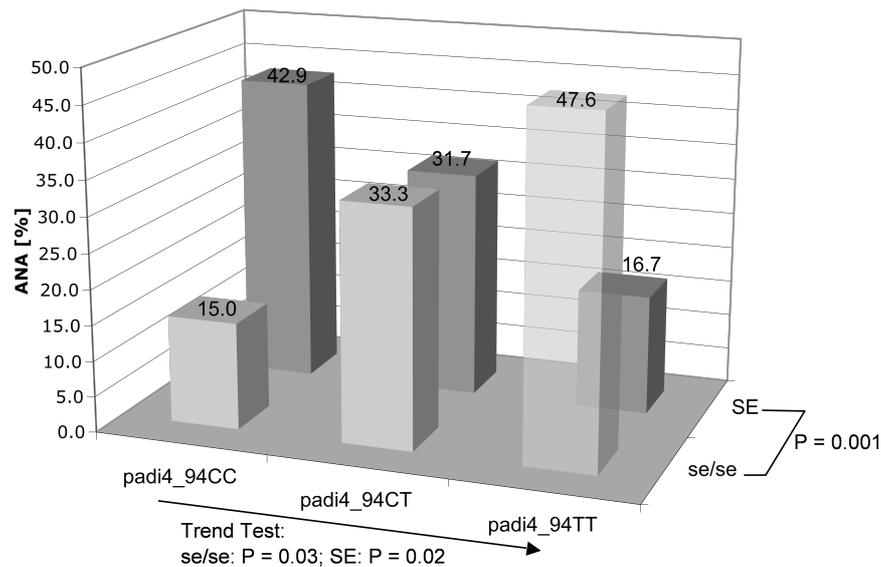
*(ii) Der PADI4 Genotyp beeinflusst die Erkrankungsschwere der RA*

Das Tragen der padi4\_94T Variante war in unserem RA-Kollektiv mit signifikant höheren *Steinbrocker Scores* assoziiert [Trend Test, 1 Kopie (CT):  $P < 0,004$  — 2 Kopien (TT):  $P < 10^{-5}$ ], wobei der Anteil von Trägern des padi4\_94TT Genotyps vom Kontrollkollektiv (14,4%) über die *Steinbrocker Scores* I (17,1%), II (19,2%), III (34,2%) und IV (41,7%) kontinuierlich und deutlich anstieg (**Figure 2, Seite 68**).

Auch in unserer Studienpopulation waren Anti-CCP Antikörper ein Indikator für einen schwereren Erkrankungsverlauf. So bestand eine positive Assoziation von Anti-CCP mit einer höheren kumulativen Therapieintensität (CTI-2/3) (OR: 1,69;  $P < 0,02$ ). Diese Beziehung war jedoch signifikant vom PADI4 Genotyp abhängig, d.h. zwischen Anti-CCP und PADI4 Genotyp bestand eine signifikante Interaktion in Hinblick auf die CTI (**Figure 1, Seite 67**). Dies wurde daran deutlich, dass sich die Assoziation von Anti-CCP mit CTI-2/3 auf Träger der Variante padi4\_94T (OR: 2,00;  $P = 0,01$ ) beschränkte. Am stärksten ausgeprägt war diese Beziehung bei Homozygotie für die Variante (padi4\_94TT: OR: 5,20;  $P = 0,002$ ) (**Table 2, Seite 58**).

*(iii) PADI4 und Shared Epitope interagieren in Hinblick auf antinukleäre Antikörper*

Der in Hinblick auf die Heterogenität der RA auffälligste Befund stammt von den Analysen der serologischen Charakteristika des RA-Kollektivs in Abhängigkeit von PADI4 Genotyp und *Shared Epitope*. Antinukleäre Antikörper (ANA) sind in den wenigen RA-Studienkollektiven, die hinsichtlich dieser Autoantikörperspezifität charakterisiert wurden, mit einer Frequenz von bis zu 50% nachweisbar (90). Diese Tatsache und eine mögliche Bedeutung dieses serologischen Parameters für die RA werden bislang in den Studien weitgehend ausgeblendet. In der von uns vorgenommenen Analyse, deren Ergebnisse in **Abbildung 8** dargestellt sind, konnte ein hochsignifikanter interaktiver Effekt von PADI4 Genotyp und SE in Hinblick auf die Ausbildung von ANA nachgewiesen werden.



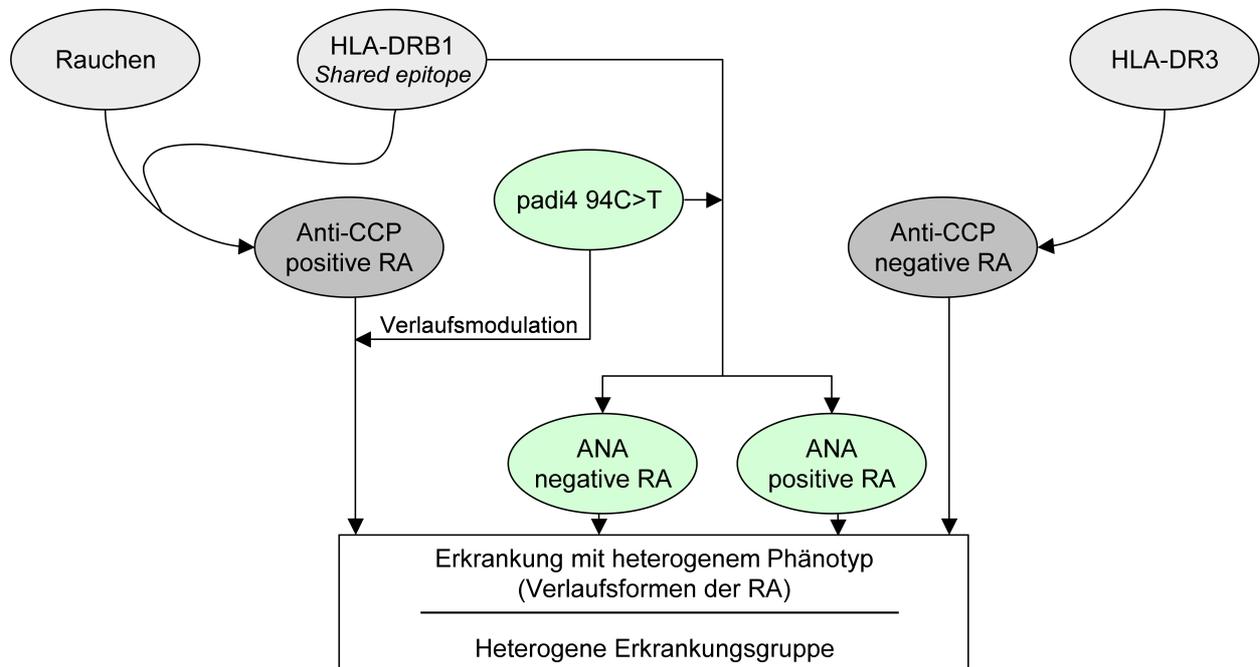
**Abbildung 8:** Antinukleäre Antikörper (ANA) in Abhängigkeit von *Shared Epitope* (SE) und PADI4 Genotyp. Die Frequenz von ANA in RA Subgruppen definiert durch den padi4\_94C>T Genotyp und den SE-Status ist dargestellt. Trend Test: Linearer Trend Test der *log odds* über der padi4\_94T Alleldosis im SE-negativen (se/se) und SE-positiven (SE) Stratum.

Während bei Trägern des SE der PADI4 Genotyp Alleldosis-abhängig *negativ* mit dem Auftreten antinukleärer Antikörper assoziiert war (Trend Test: P = 0,02), zeigte sich in der SE-negativen Gruppe (se/se) ein exakt gegenläufiger Effekt, d.h. eine vom PADI4 Genotyp Alleldosis-abhängige, *positive* Assoziation mit ANA (Trend Test: P = 0,03). Die Heterogenität hinsichtlich der Beziehung von padi4\_94C>T und ANA zwischen dem SE-positiven und dem SE-negativen Stratum war hochsignifikant (P = 0,001).

Ausgehend von den hier beschriebenen Ergebnissen kann das im **Abschnitt 1.2.2.** beschriebene hypothetische Modell der RA-Pathogenese (**Abbildung 2**) um einige weitere, ebenfalls hypothetische Aspekte ergänzt werden, die in **Abbildung 9** aufgenommen sind.

Zum einen kann der PADI4 Genotyp als ein möglicher Modulator des Effektes der Anti-CCP Antikörper auf den klinischen Verlauf der RA angenommen werden. Nach diesem Modell ist eine Kategorisierung hinsichtlich des Anti-CCP Status sinnvoll, eine genauere Information hinsichtlich der Bedeutung dieses Antikörpers für die Erkrankungsschwere wäre jedoch durch Hinzunahme des PADI4 Genotyps zu erhalten. Eine Übertragung von Ergebnissen einer retrospektiven Studie auf derartige prognostische Ansätze ist

selbstverständlich mit genügender Vorsicht zu betrachten und durch prospektive Arbeiten zu bestätigen.



**Abbildung 9:** Erweitertes Modell zur Pathogenese der rheumatoiden Arthritis (RA). Die Beziehung verschiedener Risikofaktoren zur RA ist dargestellt. Der mögliche Einfluss des PADI4 Genotyps (padi4\_94C>T) auf den Verlauf der Anti-CCP positiven RA sowie – in Abhängigkeit vom Vorhandensein des *Shared Epitope* – auf die Entwicklung von antinukleären Antikörpern (ANA) ist angedeutet.

Eine zweite Ergänzung bezieht sich auf eine mögliche weitere Diversifizierung der RA in Hinblick auf den ANA-Status (**Abbildung 9**). So mag es wegen der in unserem Kollektiv eindeutig nachweisbaren Wechselwirkung zwischen dem *Shared Epitope* und dem PADI4 Genotyp in Hinblick auf die Entwicklung von ANA zulässig sein, die Hypothese aufzustellen, dass durch das Wechselspiel beider Genotypen zwei weitere RA-Subgruppen – eine ANA-negative und eine ANA-positive Form der RA – ausgebildet werden.

Inwieweit der Einfluss des PADI4 Genotyps auf die klinischen Charakteristika der RA mit der Heterogenität hinsichtlich der Präsenz antinukleärer Antikörper in Zusammenhang steht – dies in Analogie beispielsweise zur Anti-CCP positiven und negativen RA (19) – kann aufgrund der bislang vorliegenden Daten ebenfalls noch nicht entschieden werden. Die beschriebenen Befunde legen aber nahe, dass sowohl der

PADI4 Genotyp als auch der Nachweis von antinukleären Antikörpern in weitergehenden Studien Berücksichtigung finden sollten.

**Siehe:**

Influence of peptidylarginine deiminase type 4 genotype and shared epitope on clinical characteristics and autoantibody profile of rheumatoid arthritis.

Hoppe B, Häupl T, Egerer K, Gruber R, Kiesewetter H, Salama A, Burmester GR, Dörner T

Ann Rheum Dis 2008; doi: 10.1136/ard.2008.091983

bzw.

Ann Rheum Dis 2009; 68: 898-903

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18633125](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18633125)





































### 3. ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNGEN

Molekular-epidemiologische Untersuchungen komplexer Erkrankungen können gewissermaßen als Bindeglied zwischen klinischer und Grundlagen-orientierter Forschung aufgefasst werden. Auf der einen Seite steht das Ziel, die Beziehung eines Merkmals zum Erkrankungsrisiko selbst oder zu einem bestimmten Erkrankungsverlauf für prophylaktische oder therapeutische Entscheidungen nutzbar zu machen (2, 91). Andererseits verlangt der Nachweis einer derartigen Beziehung die Aufklärung des zugrundeliegenden biologischen Mechanismus (92).

Insbesondere von einer Überführung molekular-epidemiologischer Untersuchungsergebnisse in klinische Diagnose- und Behandlungsabläufe ist man heute noch weit entfernt (91). Dies liegt unter anderem an der beträchtlichen Heterogenität der einzelnen komplexen Erkrankungen, deren Umfang sich zunehmend erschließt, sowie an der interaktiven Art und Weise, wie verschiedene Risikofaktoren in die pathogenetischen Mechanismen eingebunden sind.

Die in unseren Arbeiten zur rheumatoiden Arthritis (RA) dargestellten Befunde, die den PADI4 Genotyp als Risikofaktor für diese Erkrankung beschreiben (65, 68), die darauf hinweisen, dass diese Assoziation auf solche Patienten mit einem schweren Erkrankungsverlauf beschränkt ist (86), die den PADI4 Genotyp als signifikanten Modulator des den Krankheitsverlauf beeinflussenden Effekts der Anti-CCP Antikörper identifizieren (86) und die eine Gen-Gen-Interaktion zwischen dem HLA-DRB1 *Shared Epitope* und dem PADI4 Genotyp in Hinblick auf die Entwicklung von antinukleären Antikörpern (ANA) nachweisen (86), ein Befund, welcher die Hypothese zweier weiterer RA Subgruppen – einer ANA positiven und einer ANA negativen – nahe legt, stellen exemplarisch die Vielschichtigkeit dieser Erkrankung dar. Auch die von uns beschriebene Beziehung der *Marburg 1* Variante der FSAP mit venösen Thromboembolien (55), die sich auf die Subgruppe der idiopathischen Ereignisse beschränkt (61), verdeutlicht die Notwendigkeit, bei Untersuchungen zu komplexen Erkrankungen die Erkrankungsheterogenität in angemessener Weise zu berücksichtigen.

Wegen der ausgesprochenen Komplexität solcher vieldimensionaler Betrachtungen überrascht es nicht, dass für die Risiko- und Verlaufsabschätzung vieler komplexer Erkrankungen die Familienanamnese als Synthese aus Exposition und Disposition – aus genetischen und Umweltfaktoren sowie aus familiär geprägten Verhaltensweisen –

dem Großteil auch gut charakterisierter genetischer Risikofaktoren heute noch deutlich überlegen ist (1, 93, 94). Dies ist vielmehr als Hinweis auf die Notwendigkeit weitergehender Bemühungen in der molekular-epidemiologischen Forschung zu werten.

#### 4. LITERATURVERZEICHNIS

1. The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005;437:1299-320.
2. de Vries N, van Riel PL, van de Putte LB. Research in complex diseases. *Lancet*. 2002;359:1243-5.
3. Bowcock AM. Genomics: guilt by association. *Nature*. 2007;447:645-6.
4. Carlson CS, Eberle MA, Kruglyak L, et al. Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. *Nature*. 2004;429:446-52.
5. Kyrle PA, Eichinger S. Deep vein thrombosis. *Lancet*. 2005;365:1163-74.
6. van der Helm-van Mil AH, Huizinga TW, de Vries RR, et al. Emerging patterns of risk factor make-up enable subclassification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56:1728-35.
7. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum*. 2000;43:30-7.
8. Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood*. 2000;95:1517-32.
9. Klareskog L, Ronnelid J, Lundberg K, et al. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:651-75.
10. Glazier AM, Nadeau JH, Aitman TJ. Finding genes that underlie complex traits. *Science*. 2002;298:2345-9.
11. Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, et al. A vision for the future of genomics research. *Nature*. 2003;422:835-47.
12. Sauer U, Heinemann M, Zamboni N. Genetics. Getting closer to the whole picture. *Science*. 2007;316:550-1.

13. Benjamin EJ, Dupuis J, Larson MG, et al. Genome-wide association with select biomarker traits in the Framingham Heart Study. *BMC Med Genet.* 2007;8 Suppl 1:S11.
14. Aletaha D, Smolen JS. Challenges of predicting treatment response in patients with rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2005;1:62-3.
15. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2001;358:903-11.
16. Goldhaber SZ. Prevention of recurrent idiopathic venous thromboembolism. *Circulation.* 2004;110:IV20-4.
17. Baglin T, Luddington R, Brown K, et al. Incidence of recurrent venous thromboembolism in relation to clinical and thrombophilic risk factors: prospective cohort study. *Lancet.* 2003;362:523-6.
18. Tosetto A, Frezzato M, Rodeghiero F. Prevalence and risk factors of non-fatal venous thromboembolism in the active population of the VITA Project. *J Thromb Haemost.* 2003;1:1724-9.
19. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, et al. The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:1117-21.
20. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, et al. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest.* 1998;101:273-81.
21. Vincent C, Nogueira L, Sebbag M, et al. Detection of antibodies to deiminated recombinant rat filaggrin by enzyme-linked immunosorbent assay: a highly effective test for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;46:2051-8.
22. de Vries N, Tijssen H, van Riel PL, et al. Reshaping the shared epitope hypothesis: HLA-associated risk for rheumatoid arthritis is encoded by amino acid substitutions at positions 67-74 of the HLA-DRB1 molecule. *Arthritis Rheum.* 2002;46:921-8.

23. Stastny P. Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1976;57:1148-57.
24. Goldbach-Mansky R, Lee J, McCoy A, et al. Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Res.* 2000;2:236-43.
25. Hill JA, Southwood S, Sette A, et al. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1\*0401 MHC class II molecule. *J Immunol.* 2003;171:538-41.
26. Cantaert T, De Rycke L, Bongartz T, et al. Citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: crucial...but not sufficient! *Arthritis Rheum.* 2006;54:3381-9.
27. Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, et al. Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. *Am J Hum Genet.* 2005;77:1044-60.
28. Verpoort KN, van Gaalen FA, van der Helm-van Mil AH, et al. Association of HLA-DR3 with anti-cyclic citrullinated peptide antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005;52:3058-62.
29. Marchini J, Donnelly P, Cardon LR. Genome-wide strategies for detecting multiple loci that influence complex diseases. *Nat Genet.* 2005;37:413-7.
30. Schlesselman JJ. *Case-Control Studies. Design, Conduct, Analysis.* New York, Oxford: Oxford University Press; 1982.
31. Kallberg H, Padyukov L, Plenge RM, et al. Gene-Gene and Gene-Environment Interactions Involving HLA-DRB1, PTPN22, and Smoking in Two Subsets of Rheumatoid Arthritis. *Am J Hum Genet.* 2007;80:867-75.
32. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum.* 2006;54:38-46.

33. Pedersen M, Jacobsen S, Garred P, et al. Strong combined gene-environment effects in anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis: A nationwide case-control study in Denmark. *Arthritis Rheum.* 2007;56:1446-53.
34. Wolfe F, Mitchell DM, Sibley JT, et al. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1994;37:481-94.
35. Prandoni P, Bilora F, Marchiori A, et al. An association between atherosclerosis and venous thrombosis. *N Engl J Med.* 2003;348:1435-41.
36. Ye Z, Liu EH, Higgins JP, et al. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls. *Lancet.* 2006;367:651-8.
37. Ageno W, Becattini C, Brighton T, et al. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism: a meta-analysis. *Circulation.* 2008;117:93-102.
38. Reich LM, Folsom AR, Key NS, et al. Prospective study of subclinical atherosclerosis as a risk factor for venous thromboembolism. *J Thromb Haemost.* 2006;4:1909-13.
39. van der Hagen PB, Folsom AR, Jenny NS, et al. Subclinical atherosclerosis and the risk of future venous thrombosis in the Cardiovascular Health Study. *J Thromb Haemost.* 2006;4:1903-8.
40. Prandoni P. Venous thromboembolism and atherosclerosis: is there a link? *J Thromb Haemost.* 2007;5 Suppl 1:270-5.
41. Hoppe B, Tolou F, Dorner T, et al. Gene polymorphisms implicated in influencing susceptibility to venous and arterial thromboembolism: frequency distribution in a healthy German population. *Thromb Haemost.* 2006;96:465-70.
42. Race Ethnicity and Genetics Working Group. The use of racial, ethnic, and ancestral categories in human genetics research. *Am J Hum Genet.* 2005;77:519-32.

43. Hoppe B, Heymann GA, Koscielny J, et al. Screening for multiple hereditary hypercoagulability factors using the amplification refractory mutation system. *Thromb Res.* 2003;111:115-20.
44. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, et al. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood.* 1995;85:1504-8.
45. Martini CH, Doggen CJ, Cavallini C, et al. No effect of polymorphisms in prothrombotic genes on the risk of myocardial infarction in young adults without cardiovascular risk factors. *J Thromb Haemost.* 2005;3:177-9.
46. de Visser MC, Guasch JF, Kamphuisen PW, et al. The HR2 haplotype of factor V: effects on factor V levels, normalized activated protein C sensitivity ratios and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 2000;83:577-82.
47. Bernardi F, Faioni EM, Castoldi E, et al. A factor V genetic component differing from factor V R506Q contributes to the activated protein C resistance phenotype. *Blood.* 1997;90:1552-7.
48. Catto AJ, Kohler HP, Coore J, et al. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with venous thrombosis. *Blood.* 1999;93:906-8.
49. Elbaz A, Poirier O, Canaple S, et al. The association between the Val34Leu polymorphism in the factor XIII gene and brain infarction. *Blood.* 2000;95:586-91.
50. van Minkelen R, de Visser MC, Vos HL, et al. The Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease is not associated with venous thrombosis. *Blood.* 2005;105:4898.
51. Franchi F, Martinelli I, Biguzzi E, et al. Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease and risk of venous thromboembolism. *Blood.* 2006;107:1731.
52. Willeit J, Kiechl S, Weimer T, et al. Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease: A prominent risk predictor of carotid stenosis. *Circulation.* 2003;107:667-70.

53. Ireland H, Miller GJ, Webb KE, et al. The factor VII activating protease G511E (Marburg) variant and cardiovascular risk. *Thromb Haemost.* 2004;92:986-92.
54. The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007;447:661-78.
55. Hoppe B, Tolou F, Radtke H, et al. Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease is associated with idiopathic venous thromboembolism. *Blood.* 2005;105:1549-51.
56. Romisch J, Feussner A, Vermohlen S, et al. A protease isolated from human plasma activating factor VII independent of tissue factor. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1999;10:471-9.
57. Romisch J, Vermohlen S, Feussner A, et al. The FVII activating protease cleaves single-chain plasminogen activators. *Haemostasis.* 1999;29:292-9.
58. Romisch J, Feussner A, Stohr HA. Quantitation of the factor VII- and single-chain plasminogen activator-activating protease in plasmas of healthy subjects. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2001;12:375-83.
59. Kanse SM, Parahuleva M, Muhl L, et al. Factor VII-activating protease (FSAP): vascular functions and role in atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2008;99:286-9.
60. Sidelmann JJ, Vitzthum F, Funding E, et al. Factor VII-activating protease in patients with acute deep venous thrombosis. *Thromb Res.* 2008.
61. Hoppe B, Heymann GA, Radtke H, et al. Association of Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease with venous thromboembolism is limited to idiopathic events. *Blood.* 2005;105:4899.
62. Weisbach V, Ruppel R, Eckstein R. The Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease and the risk of venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2007;97:870-2.

63. Gulesserian T, Hron G, Endler G, et al. Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease and risk of recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2006;95:65-7.
64. Hoppe B, Dorner T, Kiesewetter H, et al. Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease and risk of recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2006;95:907-8.
65. Hoppe B, Heymann GA, Tolou F, et al. High variability of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) in a healthy white population: characterization of six new variants of PADI4 exons 2-4 by a novel haplotype-specific sequencing-based approach. *J Mol Med.* 2004;82:762-7.
66. Suzuki A, Yamada R, Chang X, et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2003;34:395-402.
67. Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, et al. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell.* 2004;118:545-53.
68. Hoppe B, Haupl T, Gruber R, et al. Detailed analysis of the variability of peptidylarginine deiminase type 4 in German patients with rheumatoid arthritis: a case-control study. *Arthritis Res Ther.* 2006;8:R34.
69. Worthington J, John S. Association of PADI4 and rheumatoid arthritis: a successful multidisciplinary approach. *Trends Mol Med.* 2003;9:405-7.
70. Yamada R, Suzuki A, Chang X, et al. Peptidylarginine deiminase type 4: identification of a rheumatoid arthritis-susceptible gene. *Trends Mol Med.* 2003;9:503-8.
71. Suzuki A, Yamada R, Yamamoto K. Citrullination by peptidylarginine deiminase in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1108:323-39.
72. De Rycke L, Nicholas AP, Cantaert T, et al. Synovial intracellular citrullinated proteins colocalizing with peptidyl arginine deiminase as pathophysiologically relevant antigenic determinants of rheumatoid arthritis-specific humoral autoimmunity. *Arthritis Rheum.* 2005;52:2323-30.

73. Cantaert T, Coucke P, De Rycke L, et al. Functional haplotypes of PADI4: relevance for rheumatoid arthritis specific synovial intracellular citrullinated proteins and anticitrullinated protein antibodies. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:1316-20.
74. Chang X, Yamada R, Suzuki A, et al. Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44:40-50.
75. Cha S, Choi CB, Han TU, et al. Association of Anti-Cyclic citrullinated peptide antibody levels with PADI4 haplotypes in early rheumatoid arthritis and with shared epitope alleles in very late rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56:1454-63.
76. Ikari K, Kuwahara M, Nakamura T, et al. Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: a replication study. *Arthritis Rheum*. 2005;52:3054-7.
77. Kang CP, Lee HS, Ju H, et al. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans. *Arthritis Rheum*. 2006;54:90-6.
78. Takata Y, Inoue H, Sato A, et al. Replication of reported genetic associations of PADI4, FCRL3, SLC22A4 and RUNX1 genes with rheumatoid arthritis: results of an independent Japanese population and evidence from meta-analysis of East Asian studies. *J Hum Genet*. 2008;53:163-73.
79. Barton A, Bowes J, Eyre S, et al. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population is not associated in a United Kingdom population. *Arthritis Rheum*. 2004;50:1117-21.
80. Caponi L, Petit-Teixeira E, Sebbag M, et al. A family based study shows no association between rheumatoid arthritis and the PADI4 gene in a white French population. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:587-93.
81. Martinez A, Valdivia A, Pascual-Salcedo D, et al. PADI4 polymorphisms are not associated with rheumatoid arthritis in the Spanish population. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44:1263-6.

82. Harney S, Wordsworth BP. Genetic epidemiology of rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*. 2002;60:465-73.
83. Prevoo ML, van't Hof MA, Kuper HH, et al. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995;38:44-8.
84. Iwamoto T, Ikari K, Nakamura T, et al. Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45:804-7.
85. Lee YH, Rho YH, Choi SJ, et al. PADI4 polymorphisms and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis. *Rheumatol Int*. 2007;27:827-33.
86. Hoppe B, Häupl T, Egerer K, et al. Influence of peptidylarginine deiminase type 4 genotype and shared epitope on clinical characteristics and autoantibody profile of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008;doi: 10.1136/ard.2008.091983.
87. Steinbrocker O, Traeger CH, Batterman RC. Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. *JAMA*. 1949;140:659-62.
88. Cabral D, Katz JN, Weinblatt ME, et al. Development and assessment of indicators of rheumatoid arthritis severity: results of a Delphi panel. *Arthritis Rheum*. 2005;53:61-6.
89. Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, et al. Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid arthritis (the BeSt study): A randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2008;58:S126-35.
90. Turesson C, Jacobsson LT, Sturfelt G, et al. Rheumatoid factor and antibodies to cyclic citrullinated peptides are associated with severe extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2007;66:59-64.
91. O'Dell JR. It is the best of times; it is the worst of times: is there a way forward? A plethora of treatment options for rheumatoid arthritis, but critical trial design issues. *Arthritis Rheum*. 2007;56:3884-6.

92. Baker M. Genome studies: genetics by numbers. *Nature*. 2008;451:516-8.
93. Khoury MJ. Genetics and genomics in practice: the continuum from genetic disease to genetic information in health and disease. *Genet Med*. 2003;5:261-8.
94. Yoon PW, Scheuner MT, Peterson-Oehlke KL, et al. Can family history be used as a tool for public health and preventive medicine? *Genet Med*. 2002;4:304-10.

## **5. DANKSAGUNG**

Siehe gedruckte Habilitationsschrift.

## Erklärung

### § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

22. Oktober 2008

Datum

.....  
Unterschrift