

**Association of the -2849
Interleukin-10 Promoter Polymorphism With
Joint Destruction in Rheumatoid Arthritis**

Thesis

***Submitted for Partial Fulfillment for the M.D. Degree
in Clinical and Chemical Pathology***

By

**Dina Ahmed Soliman
M.B.B., Ch, M.Sc.**

Under supervision of

Professor Doctor/ Manal Zaghloul Mahran

Professor of Clinical and Chemical Pathology
Faculty of Medicine, Ain Shams University

Doctor/ Salwa Ibrahim Bakr

Assistant Professor of Clinical and Chemical Pathology
Faculty of Medicine, Ain Shams University

Doctor/ Afaf Abdel Alim Mostafa

Assistant Professor of Clinical and Chemical Pathology
Faculty of Medicine, Ain Shams University

Doctor/ Ola Abdel Nasser

Assistant Professor of Physical Medicine Rheumatology & Rehabilitation
Faculty of Medicine, Ain Shams University

**Faculty of Medicine
Ain Shams University
2007**

ارتباط التعدد الشكلي للجين المحرض 2849 للإنترلوكين عشرة بتدمير المفاصل في مرضى الرثية الروماتيزمية

رسالة

مقدمة توطئة للحصول على درجة الدكتوراة في
الباثولوجيا الإكلينيكية والكيميائية

مقدمة من

الطبيبة/ دينا أحمد سليمان
بكالوريوس الطب والجراحة
ماجستير في الباثولوجيا الإكلينيكية والكيميائية

تحت إشراف

الأستاذ الدكتور/ منال زغول مهران
أستاذ الباثولوجيا الإكلينيكية والكيميائية
كلية الطب . جامعة عين شمس

الدكتور/ سلوى إبراهيم بكر
أستاذ مساعد الباثولوجيا الإكلينيكية والكيميائية
كلية الطب . جامعة عين شمس

الدكتور/ عفاف عبد العليم مصطفى
أستاذ مساعد الباثولوجيا الإكلينيكية والكيميائية
كلية الطب . جامعة عين شمس

الدكتور/علا عبد الناصر
أستاذ مساعد الطب الطبيعي . الروماتيزم والتاهيل
كلية الطب . جامعة عين شمس

كلية الطب . جامعة عين شمس
2007

Association of the -2849 Interleukin-10 Promoter Polymorphism With Joint Destruction in Rheumatoid Arthritis

Introduction:

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease characterized by joint inflammation and joint destruction. Cell types that are thought to play a role in the pathophysiologic mechanism leading to joint destruction in RA are B-cells, T-cells, synoviocytes, macrophages and osteoclast (*Lassere et al., 2002*).

The immunoregulatory cytokine interleukin-10 (IL-10) increases autoantibody production by B-cells from RA patients (*Reparon et al., 2001*). IL-10 stimulates B cell survival, proliferation, differentiation and antibody isotype switching. Aside from this immunostimulatory function, IL-10, inhibits the activation and effector functions of T -cells, macrophages and monocytes (*Moore et al., 2001*).

In the effector phase of RA, the joint is destroyed by the interplay of invading lymphocytes, monocytes, macrophages and proliferating fibroblast-like synoviocyte (FLS). Experiments on joint tissue have indicated that IL-10 inhibits the production of proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and IL-1, and decreases levels of matrix

metalloproteinases produced by macrophages and FLS. Thus, the immune response suppressing effect suggests that high levels of IL-10 might protect against RA (*Van Roon et al., 2001*).

Different studies from various laboratories have demonstrated that the. -2849 gene polymorphism has been associated with low production of IL-10 and this could influence the RA disease progression (*Lassere et al., 2002*).

Aim of the study:

The present study aims to examine the influence of IL-10 promoter polymorphism on the pathophysiology of RA disease.

Patients and Methods:

This study will comprise 35 patients with RA as well as 15 age and sex matched healthy controls in Ain Shams University Hospital.

They will be subjected to the following:

1. Full history taking and clinical examination.
2. IL-10 -2849 gene polymorphism by PCR.

ارتباط التعدد الشكلي للجين المحرض 2849 للإنترلوكين عشرة بتدمير المفاصل في مرضى الرثية الروماتيزمية

المقدمة:

إن مرض الرثية الروماتيزمية مرض مناعي مزمن يتصف بالتهاب وتدمير المفاصل، الخلايا التي تلعب دور في فسيولوجية المرض وتؤدي إلى تدمير المفاصل في مرض الرثية الروماتيزمية هي الخلايا الليمفاوية "ب" والخلايا الليمفاوية ت، خلايا الغشاء المزلق، الخلايا البلعومية الكبيرة والخلايا كاسرة العظم.

المنظمات المناعية السيتوكينات الإنترلوكين عشرة تزيد إفراز الأجسام المضادة من الخلايا الليمفاوية ب في مرضى الرثية الروماتيزمية كما أن الأنترلوكين عشرة يساعد الخلايا الليمفاوية ب على التكاثر والتميز والتحول النمطي للأجسام المضادة. إلى جانب هذه الوظيفة التنبيهية للإنترلوكين عشرة فإنه يهبط من نشاط وفعالية الخلايا الليمفاوية ت، الخلايا البلعومية الكبيرة والكريه موحدة النواة.

في المرحلة الفعالة في مرض الرثية الروماتيزمية، تدمير المفاصل يحدث باقتحام الخلايا الليمفاوية، الكريه موحدة النواة، الخلية البلعومية الكبيرة وخلايا الغشاء المزلق الشبيهة بخلايا النسيج الضام.

الدراسات المختلفة على أنسجة المفصل أثبتت أن الأنترلوكين عشرة يهبط إنتاج سيتوكينات ما قبل الالتهاب كعامل محلل الأورام الفا والأنترلوكين واحد والميتالوبروتينيز الذي تنتجه الخلايا البلعومية الكبيرة وخلايا الغشاء المزلق الشبيهة بخلايا النسيج الضام.

إن هذا التأثير المناعي القمعي يرجح أن زيادة الأنترلوكين عشرة ممكن أن يحمي من الرثية الروماتيزمية. كما أن أبحاث مختلفة أوضحت أن التنوع الشكلي لجين 2849 للإنترلوكين عشرة مرتبط بانخفاض إنتاج الأنترلوكين عشرة وهذا من الممكن أن يؤثر على التطور المرضي للرثية الروماتيزمية.

الهدف من البحث:

هذا البحث يهدف إلى دراسة تأثير التعدد الشكلي الجيني للإنترلوكين عشرة والتطور المرضي لمرضى الرثية الروماتيزمية.

الحالات وطرق البحث:

سوف يتم انتقاء 35 حالة مصابة بالرثية الروماتيزمية بالإضافة إلى 15 حالة من الأصحاء في مستشفيات جامعة عين شمس.

وسوف يتم عمل الفحوصات التالية لهم:

- 1- التاريخ المرضي والفحص الإكلينيكي.
- 2- التنوع الشكلي الجيني 2849 للإنترلوكين عشرة بالتفاعل التسلسلي البلمري.

Acknowledgment

First and foremost I feel always indebted to Allah. The most kind and the most merciful.

*It is a great honour for me to express my most profound gratitude and appreciation to **Prof.Dr. Manal Zaghloul Mahran** ,Professor of Clinical and Chemical Pathology , Faculty of Medicine ,Ain Shams University ,for granting me the privilege of working under her supervision . She kindly helped me and never been except an ideal professor.*

*I would like to express my deep appreciation and my great admire and respect to **Dr.Safwa Ibrahim Bakr** , Assistant Professor of Clinical and Chemical Pathology, Faculty of Medicine ,Ain Shams University, for her noble character ,kind guidance and her continuous support all through this work .She never accept any thing except excellence ,her great experience added much to my knowledge ,her fruitful advice helped me ,supported me to achieve what I aspire .I really found no words except a many lot of thanks .*

*My deepest thanks and gratefulness to **Dr. Afaf Abdel Alim Mostafa** , Assistant Professor of Clinical and Chemical Pathology ,Faculty of Medicine , Ain Shams University, for her generous help and continuous encouragement.She provided me with invaluable comments, knowledge , and experience necessary for achieving this work.*

*I am also profoundly grateful to **Dr. Ola Abdel Nasser** ,Assistant Professor of Physical Medicine, Rheumatology and Rehabilitation , Faculty of Medicine, Ain Shams University, for her great and sincere help and effort during this work .*

*I owe a lot of thanks to **Dr. Nermeen Tayseer Aly** ,Assistant Professor of Clinical and Chemical Pathology, Faculty of Medicine, Ain Shams University, who kindly motivated the performance of this study with indispensable advice. I wish also to express my sincere thanks to **Dr. Kawther Mohamed Abdo** ,Assistant Professor of Clinical and Chemical Pathology ,Faculty of Medicine , Ain Shams University ,for her valuable support and cooperation .*

Last but not least, I would like to thank my patients and wish them all the best of health .



Thank You

*I would like to dedicate this study to
my Dear Parents for their great
encouragement and support , for their
help through the rough time*

*To my Husband for his endless
patience and his tolerance to my
absences ,physically and emotionally .*

*To my kids whom missed me all
through this time .*

*To them all I owe this success
many many thanks*

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

قالوا سبحانك لا علم لنا إلا ما
علمتنا إنك أنت العليم الحكيم

صدق الله العظيم

سورة البقرة الآية (32)

LIST OF Abbreviations

A	: Adenine
ADCC	:Antibody dependent cell mediated cytotoxicity.
APC	: Antigen presenting cell
Blys	: B lymphocytes stimulator
C	: Cytokine
cAMP	: Cyclic adenosine monophosphate
CBC	: Complete blood count
CCP	: Cyclic citrullinated peptide
CD	: Cluster of differentiation
cDNA	: Complementary deoxyribonucleic acid
CRP	: C-reactive protein
CS-1	: Connecting segment-one
CSIF	: Cytokine synthesis inhibitory factor
CTLA4	: Cytotoxic T- lymphocyte antigen 4
d NTP	: Deoxynucleotide triphosphate
DAS	: Disease activity score
DC	: Dendritic cell
DNA	: Deoxyribonucleic acid
EAM	: Extra-articular manifestation
EDTA	: Ethylene diamine tetra-acetic
ESR	: Erythrocyte sedimentation rate
Fc	: Crystallizable fragment
Fc ϵ RII	: Fc epsilon receptor type II
FGF	: Fibroblast growth Factors
FISH	: Fluorescence insitu hybridization
FLS	: Fibroblast-like synoviocyte
G	: Guanine
GM-CSF	: Granulocyte macrophage colony stimulating factor
Hap – Map	: Haplotype map
HBGF-1	: Heparin binding growth factor one
hIL-10	: Human Interleukin ten

HLA : Human leukocyte antigen
 HSPs : Heat shock proteins.
 ICAM-1 : Intracellular adhesion molecule one.
 IFNR : Interferon receptor
 IFN- γ : Interferon gamma
 Ig : Immunoglobulin
 IL : Interleukin
 IL-1 β : Interleukin one beta
 IL-1 α : Interleukin one alpha
 IL-1 β : Interleukin one beta
 IL-10 R : Interleukin ten receptor
 IL-10 : Interleukin ten
 IL-1ra : Interleukin one receptor antagonist
 IP-10 : Interferon gamma inducible protein-10
 Kb : Kilobase
 Kd : Dissociation constant
 LFA : Lymphocyte function associated antigen
 LIF : Leukemia inhibitory factor
 LPS : Lipopolysaccharide
 MAb : Monoclonal antibody
 MAP : Mitogen activated protein
 MCP : Monocyte chemoattractant protein
 MDC : Macrophage derived chemokine
 MHC : Major histocompatibility complex
 MIG : Monokine induced by interferon gamma
 MIL-10 : Mouse Interleukin ten
 MIP : Macrophage inflammatory protein
 MIP-1 : Macrophage inhibitory protein-one
 MMPs : Matrix metalloproteinases
 mRNA : Messenger RNA
 NF κ B : Nuclear factor kappa B
 NK : Natural killer

ORF : Open reading frames.
 PAF : Platelet activating factor
 PCR : Polymerase chain reaction
 PDGF : Platelet derived growth factor
 PG : Prostaglandin
 PMNL : Polymorphonucleav leukocyte
 RA : Rheumatoid arthritis
 RANTES: Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted.
 RF : Rheumatoid factor
 RFLP : Restriction fragment length polymorphism
 RNA : Ribonucleic acid
 RT-PCR : Reverse transcriptase polymerase chain reaction
 SDF-1 : Stromal cell-derived factor-1
 SLE : Systemic lupus erythematosus
 SNPs : Single nucleotide polymorphisms
 SSLP : Simple sequence length polymorphism
 STAT-1 : Signal transducer and activator of transcription-1
 T : Thymine
 TACI : Transmembrane activator and cellular interactor
 Taq polymerase: *Thermus aquaticus* polymerase
 TCR : T cell receptor
 TGF : Transforming growth factor.
 TGF-B : Transforming growth factor Beta.
 Th : T helper
 TIMP : Tissue inhibitor of metalloproteinases
 TLR : Toll like receptor
 TNF- α :Tumor necrosis factor – alpha
 VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule-1
 VIL-10 : Viral Interleukin ten
 VLA : Very late activation antigen

List of Figures

Fig. No.	Fig No	Page No
	1- Inflammation of the rheumatoid joint	9
	2- Antigen presenting cell and T cell interaction in the synovium.	13
	3- Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis.	17
	4- The cytokine network in rheumatoid arthritis	30
	5- IL-1 plays a major role in rheumatoid arthritis.	36
	6- Role of IL-1 and TNF- α in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.	38
	7- A schematic depiction of IL-10's role in regulating the innate and adaptive immune responses to infection.	57
	8- Examples of IL-10 promoter gene polymorphism.	70
	9- DNA extraction procedure.	86
	10- PCR amplified product of IL-10 – 2849 promoter gene detection by gel electrophoresis	94
	11- IL-10 –2849 promoter gene Polymorphism analysis by gel electrophoresis	94